

PAULA PEIXOTO ASSEMANY

**VALORIZAÇÃO ENERGÉTICA DE BIOMASSA ALGAL CULTIVADA
EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS VIA DIGESTÃO ANAERÓBIA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

A844v
2017
Assemany, Paula Peixoto, 1986-
Valorização energética de biomassa algal cultivada em
águas residuárias via digestão anaeróbia / Paula Peixoto
Assemany. – Viçosa, MG, 2017.
xix, 156f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Maria Lúcia Calijuri.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Bioenergia. 2. Microalgas. 3. Efluentes. 4. Biogás.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Engenharia
Civil. Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil.
II. Título.

CDD 22. ed. 662.88

PAULA PEIXOTO ASSEMANY

VALORIZAÇÃO ENERGÉTICA DE BIOMASSA ALGAL CULTIVADA EM
ÁGUAS RESIDUÁRIAS VIA DIGESTÃO ANAERÓBIA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 06 de março de 2017.



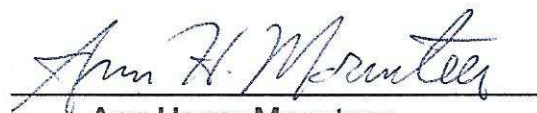
Maria do Carmo Calijuri



Rejane Helena Ribeiro da Costa



Alberto José Delgado do Reis



Ann Honor Mounteer
(Coorientadora)



Maria Lúcia Calijuri
(Orientadora)

Aos meus pais.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meu pais, Cassiana e Renato, pela compreensão da distância e apoio incondicional.

À Universidade Federal de Viçosa pelas oportunidades.

A professora Lúcia pela orientação, amizade e acolhida durante todos esses anos. Por acreditar em mim e sempre me incentivar a dar mais um passo a frente.

À Dra. Isabel Marques por me receber de braços abertos, por toda a orientação e valiosas contribuições que muito enriqueceram esse trabalho.

Ao Dr. Alberto Reis, pelas contribuições e aceite em participar das bancas de qualificação e defesa. Por abrir as portas do Laboratório Nacional de Energia e Geologia - LNEG, pela paciência, apoio e orientação. Por ser parte da família enquanto estive longe.

À professora Ann por me apresentar pela primeira vez o caminho da pesquisa, pelas contribuições e aceite em participar das bancas de qualificação e defesa.

À professora Rejane da Costa pelas contribuições e aceite em participar das bancas de qualificação e defesa.

À professora Maria do Carmo Calijuri pela prontidão em ajudar, pelo apoio, contribuições e aceite em participar das bancas de qualificação e defesa.

Ao professor Paulo Roberto Cecon pela amizade, exemplo de superação e ajuda nas análises estatísticas.

Aos órgãos de fomento CAPES, FAPEMIG e CNPq pela concessão das bolsas de estudo, tanto no Brasil (CAPES), quanto no exterior (CNPq) e pelos recursos destinados à realização dessa pesquisa.

Ao Laboratório de Engenharia Sanitária e Ambiental – LESA/UFV, em especial à Priscila, pelo apoio nas atividades experimentais.

Ao Serviço Autônomo de Água e Esgoto de Viçosa – SAAE, pela parceria e auxílio com o transporte do esgoto.

À SCC-Sociedade Central de Cervejas e Bebidas S.A pela autorização e suporte na coleta do efluente.

Ao LNEG, especialmente à equipe do Edifício G, pela fraterna acolhida, pelo apoio e acesso a toda infraestrutura. Especialmente à Graça Freitas e Natércia Santos pelo carinho, conselhos e ajuda perene no laboratório e experimentos. À Dra. Teresa Silva pela ajuda nas análises de citometria de fluxo. À Dra. Paula Passarinho pelos ensinamentos e suporte nos procedimentos analíticos. À Dra. Belina Ribeiro e Céu Penedo pela ajuda nas análises de fósforo e de cromatografia líquida. Ao Dr. Luís Ramalho pelo apoio nas análises de cromatografia gasosa. À Dra. Luisa Gouveia, Dra. Cristina Oliveira e Dra. Paula Marques pela atenção e simpatia.

Aos amigos do LNEG, Diana, Leonilde, Ricardo, Alice e Henrique, pela acolhida e carinhosa convivência, fundamentais para amenizar a saudade do dia-a-dia.

A todos do LNEG - Bioenergia que tornaram a estadia em Lisboa inesquecível.

À Fernanda pela dedicação e ajuda na coleta de dados e monitoramento dos experimentos.

Aos amigos do Laboratório nPA, Juliana, Mauro Henrique, Mateus, Jackeline, Letícia, Sabrina e Mariana pelo aprendizado diário, companhia e momentos de descontração.

Ao Eduardo pelo apoio e motivação incansáveis. Por ser minha inspiração e parte essencial dessa etapa.

BIOGRAFIA

Paula Peixoto Assemany, filha de Renato Assemany e Cassiana Ribeiro Peixoto, nasceu em Cataguases-MG, em 19 de dezembro de 1986. Coursou ensino fundamental e parte do ensino médio no “Instituto Nossa Senhora do Carmo”, entre 1998 e 2003. Em 2004, ingressou no “Colégio Opção Vestibulares”, onde concluiu o terceiro ano do ensino médio. Em 2005 iniciou o curso de Engenharia Ambiental, na UFV, onde formou-se em julho de 2010. Em janeiro de 2013 defendeu sua dissertação de mestrado frente ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da UFV. Iniciou as atividades de doutorado em abril de 2013. Em 2015, realizou doutorado sanduíche no Laboratório de Energia e Geologia de Portugal (LNEG), em Lisboa. Em março de 2017 defende sua tese perante o Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da UFV.

RESUMO

ASSEMANY, Paula Peixoto, D.Sc, Universidade Federal de Viçosa, março de 2017. **Valorização energética de biomassa algal cultivada em águas residuárias via digestão anaeróbia.** Orientadora: Maria Lúcia Calijuri. Coorientadora: Ann Honor Munteer.

Várias abordagens têm sido feitas de forma a confirmar o potencial atrativo das microalgas como matéria prima para a produção de biogás. No entanto, limitações advindas do substrato biomassa algal são ainda na atualidade descritas. As maiores complexidades da digestão anaeróbia da biomassa algal são reportadas como sendo a baixa digestibilidade da parede celular das algas e a inibição do processo pela presença de amônia. De forma a propor estratégias de superação dessas limitações, esse estudo teve como objetivo avaliar o potencial energético de biomassa algal cultivada em efluentes a partir da digestão anaeróbia. Estratégias de pré-tratamentos (térmico e prévia extração lipídica) e complementariedade de substratos foram aplicadas. A extração lipídica aumentou o rendimento da produção de biogás em até 10 vezes, tornando mais disponível o conteúdo intracelular. No entanto, após análise energética, concluiu-se pelo pouco ganho energético acumulado da etapa de extração lipídica, devido principalmente ao baixo acúmulo lipídico da biomassa produzida em efluentes. O aproveitamento lipídico da biomassa se mostrou inviável energeticamente e a geração de biogás da biomassa bruta foi a rota energética mais favorável, tanto para biomassa produzida em lagoas de alta taxa com esgoto doméstico, como para biomassa cultivada em fotobiorreator coluna de bolhas com efluentes da indústria de processamento de carnes. A complementariedade de substratos foi avaliada utilizando-se efluente da indústria de extração de azeite (água ruça) na digestão anaeróbia de biomassa algal produzida em lagoa de alta taxa (LAT) utilizando efluente da indústria cervejeira e esgoto doméstico como meios de cultivo. Adicionalmente, a geração de biogás e a eficiência de degradação da matéria orgânica foram monitoradas ao longo de três fases (72 dias) de operação de um reator híbrido anaeróbio, caracterizadas pelo também uso da água ruça como um substrato complementar à biomassa algal e à aplicação de um pré-tratamento térmico para ruptura da parede celular da biomassa algal. Análises de citometria de fluxo foram realizadas para estimar a integridade da membrana e viabilidade metabólica das células algais de forma a mensurar a eficiência do pré-tratamento aplicado. A água ruça se mostrou um substrato complementar eficiente para digestão anaeróbia da biomassa algal, permitindo melhorar rendimento do processo, além de economia de recursos, facilidade operacional e aproveitamento energético de mais de um resíduo. Para os testes em batelada, o

rendimento da digestão foi 36% maior para os testes com 10% de água ruça adicionada à biomassa algal cultivada em esgoto doméstico. Para biomassa cultivada em efluente da indústria cervejeira, valores de até 20% de água ruça puderam ser adicionados à biomassa algal, no entanto, teste utilizando somente a biomassa algal como substrato apresentou os melhores resultados de produção de biogás. Mesmo com a aplicação de pré-tratamento térmico, o melhor rendimento do reator híbrido foi obtido quando operado com 10% de água ruça, cerca de 3 vezes superior ao rendimento obtido somente com biomassa algal. Acredita-se que através do presente estudo foi possível avaliar uma rota promissora de produção de biocombustíveis a partir do tratamento de efluentes, elucidando limitações importantes para a aplicação e ampliação do processo. Temas emergentes e de grande importância no contexto mundial e principalmente nacional foram abordados, nomeadamente o aproveitamento de resíduos e a questão energética, tornando o saneamento ambiental mais atrativo dos pontos de vista econômico e de sustentabilidade, e propondo alternativas de diversificação da matriz energética com o uso de biocombustíveis oriundos de biomassa algal.

ABSTRACT

ASSEMANY, Paula Peixoto, D.Sc, Universidade Federal de Viçosa, March, 2017. **Energetic valorization by anaerobic digestion of algal biomass cultivated in wastewater.** Adviser: Maria Lúcia Calijuri. Co-adviser: Ann Honor Mounteer.

Several approaches to confirm the attractive potential of microalgae as a feedstock for biogas production have been undertaken. However, limitations arising from the algal biomass substrate are still described today. The main complicators of anaerobic digestion of algal biomass are reported to be the low digestibility of the algal cell wall and the inhibition of the process by ammonia. In order to propose strategies to overcome these limitations, this study aimed to evaluate the energy potential of anaerobic digestion of algal biomass grown in wastewaters. Thermal and lipid extraction pre-treatments and complementarity of substrates were evaluated. Lipid extraction increased biogas yield ten-fold, by making intracellular content more available. However, an energy analysis showed the lipid extraction stage produced only a small accumulated energy gain, mainly due to the low lipid accumulation in the biomass produced in wastewaters. Utilization of biomass lipid was shown to be energy-infeasible and biogas generation from the crude biomass was the most favorable energy route, both for biomass produced in high rate ponds with domestic sewage and for biomass cultured in a bubble column photobioreactor with effluents from the meat processing industry. The complementarity of substrates was evaluated using olive mill wastewater in the anaerobic digestion of algae biomass produced in a high rate algal pond using effluents from the brewery industry and domestic sewage as culture media. In addition, biogas production and organic matter degradation efficiency were monitored during three phases (72 days) of an anaerobic hybrid reactor, characterized by the use of the olive mill wastewater as a complementary substrate to the algal biomass and the application of a thermal pretreatment for algal biomass cell wall rupture. Algal cell membrane integrity and metabolic viability were analyzed through flow cytometry in order to measure pretreatment efficiency. Olive mill wastewater proved to be an efficient complementary substrate for anaerobic digestion of the algal biomass, allowing better process efficiency, both in batch and semi-continuous feeding modes of the hybrid reactor, as well as resource savings, operational ease and energy utilization of more than one waste. For batch tests, digestion yield was 36% greater when using 10% of olive mill wastewater together with algal biomass grown in domestic sewage. Values of up to 20% of olive mill wastewater could be added to algal biomass grown in brewery wastewater, however, tests using only algal biomass as the substrate showed the best biogas production results. Even with the application of thermal pretreatment, the best

performance of the hybrid reactor was obtained when operated with 10% olive mill wastewater, resulting in about 3 fold higher yield than obtained with algal biomass alone. Through the present study, it was possible to evaluate a promising route for biofuels production through wastewater treatment and identify important limitations to the application and expansion of the process. Emerging issues of great importance worldwide and especially at the national level were addressed, namely waste reuse and renewable energy, making environmental sanitation more attractive from both the economic and sustainability points of view, and alternatives for diversifying the energy matrix with the use of biofuels from algal biomass were proposed.

LISTA DE FIGURAS

Figura 5.1 - Distribuição global de empresas privadas que produzem derivados de microalgas para alimentação comercial e para suplementos alimentícios. Fonte: Adaptado de Vignani et al. (2015).....	10
Figura 5.2 - Degradação da matéria orgânica pela digestão anaeróbica. Fonte: Adaptado de Li et al. (2011).	13
Figura 5.3 – Digestão anaeróbica como principal processo de uma biorrefinaria de microalgas inserida em uma estação de tratamento de efluentes.	37
Figura 5.4 – Etapas de aproveitamento do biogás oriundo da digestão anaeróbica de biomassa algal produzida durante o tratamento de efluentes. Fonte: Adaptado de Metcalf e Eddy (2013).	38
Figura 6.1 - Produção acumulada de biogás para as biomassas: antes (BB, n=4) e após (BR, n=2) a extração de lipídeos (barras verticais representam o desvio padrão).	58
Figura 6.2 - Superfície resposta ajustado a partir da variação das concentrações de glicose e biomassa algal.	60
Figura 6.3 - NER e produtividade específica de biomassa para as diferentes rotas energéticas.	62
Figura 7.1 - Produção de metano ao longo do período de incubação para as biomassas antes e após a extração lipídica cultivadas em ambos os efluentes (média e desvio padrão).	77
Figura 8.1 - Resultados de produção acumulada de biogás ao longo do tempo para as condições experimentais do Ensaio 2. (a) Substrato BE; (b) Substrato BC (barras verticais representam desvio padrão, n=3)	98
Figura 9.1 - Reator coluna de bolhas utilizado para cultivo de biomassa algal em efluente da indústria cervejeira.	112
Figura 9.2 - Esquema experimental do reator híbrido anaeróbico: (1) bomba peristáltica; (2) reator híbrido; (3) saída de biogás; (4) selo hidráulico; e (5) gasômetro. Pontos de amostragens: P3 - 7,5 cm, P2 - 31cm, P1 - 41 cm. Fonte: Adaptado de Gonçalves et al. (2012a).	114
Figura 9.3 - Produção de biogás do reator híbrido anaeróbico para as três fases de operação.	120
Figura 9.4 - Resultados do perfil do reator para as três fases de operação do reator híbrido anaeróbico (F1= substrato biomassa algal; F2= substratos biomassa algal +10% (v/v) água ruça; F3= biomassa algal pré-tratada + 10% (v/v) água ruça): a) DQO total; b) DQO solúvel; c) pH; d) ácidos orgânicos voláteis (AOVs).....	124
Figura 9.5 - Citometria de fluxo para as células algais na entrada e saída do reator híbrido em cada fase de operação. a) % de células sem atividade enzimática; i, ii, iii, iv, v e vi	

correspondem à análise microscópica (x100); I, II, III, IV, V e VI correspondem aos gráficos de densidade; Quadrante A corresponde à região do citograma não marcada (sem atividade enzimática) pelo corante cFDA; Quadrante B corresponde à região do citograma marcada pelo corante cFDA. b) % de células com membrana permeabilizada; VII, VIII, IX, X, XI e XII correspondem aos gráficos de densidade; Região R-1 corresponde à região do citograma não marcada (células impermeáveis) pelo corante IP; Região R-2 corresponde à região do citograma marcada pelo corante IP. 128

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Algumas empresas que comercializam combustíveis de algas.....	11
Tabela 5.2 - Condições experimentais e conversão de metano de diversos estudos com digestão anaeróbia de biomassa algal.	16
Tabela 6.1 - Resultados de caracterização da biomassa algal utilizada como substrato nos testes anaeróbios (média e desvio padrão).	56
Tabela 6.2 - Resultados dos testes de biodegradabilidade anaeróbia e PPB para as biomassas provenientes da LAT, antes e após a extração lipídica (n=4 para BB e n= 2 para BR, média e desvio padrão).	59
Tabela 7.1 - Caracterização da biomassa cultivada nos efluentes primário e secundário (média e desvio padrão).	71
Tabela 7.2 - Caracterização dos efluentes primário e secundário, afluente e efluente ao FBR (média e desvio padrão).....	72
Tabela 7.3 - Lipídeos totais e produtividade lipídica de ambos os meios de cultivo (média e desvio padrão).	76
Tabela 7.4 - Biodegradabilidade anaeróbia e PPM das biomassas de ambos os efluentes antes e após a extração lipídica (média e desvio padrão).....	78
Tabela 7.5 - NER e produtividade específica de biomassa para as rotas estudadas de aproveitamento energético.	80
Tabela 8.1 - Descrição dos ensaios de digestão anaeróbia realizados em batelada.	89
Tabela 8.2 - Caracterização do substrato água ruça e do inóculo utilizado nos testes de digestão anaeróbia.	92
Tabela 8.3 - Composição química dos substratos utilizados nos testes anaeróbios.....	93
Tabela 8.4 - Resultados de produção acumulada de biogás e rendimentos em metano das diferentes condições experimentais do Ensaio 1.....	94
Tabela 8.5 - Resultados de produção acumulada de biogás e rendimentos em metano das diferentes condições experimentais do Ensaio 2.....	96
Tabela 8.6 - - Resultados de caracterização da entrada e da saída dos reatores antes e após o Ensaio 2.....	103
Tabela 9.1 - Diferentes configurações e parâmetros de operação de reatores anaeróbios para digestão de biomassa algal.	110
Tabela 9.2 - Caracterização do efluente da indústria cervejeira e da água ruça.	113
Tabela 9.3 - Condições operacionais aplicadas ao reator híbrido.....	115

Tabela 9.4 - Composição química da biomassa algal utilizada como substrato do reator anaeróbio híbrido.	118
Tabela 9.5 - Desempenho de remoção do reator para as variáveis monitoradas nas diferentes fases de operação.....	122

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- AGCM – ácidos graxos de cadeia média
- AME – atividade metanogênica específica
- AnMBR – bioreator anaeróbio a membranas
- AOV – ácidos orgânicos voláteis
- AR – água ruça, efluente da indústria de extração de azeite
- BB – biomassa bruta
- BC – biomassa cultivada em efluente da indústria de cerveja
- BE – biomassa cultivada em esgoto doméstico
- BR – biomassa residual após a extração lipídica
- C/N – relação carbono-nitrogênio
- CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- cFDA - esterase diacetato de carboxifluoresceína
- CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- CNTP – condições normais de temperatura e pressão
- COD – carbono orgânico dissolvido
- C_{OP} – consumo energético em cada operação
- COV – carga orgânica volumétrica
- CSTR – *continous stirred tank reactor*
- CT – consumo anual de energia
- DA – digestão anaeróbia
- DQO – demanda química de oxigênio
- DQOs – demanda química de oxigênio solúvel
- DQOt – demanda química de oxigênio total
- E_C – input energético
- E_G – energia a partir da digestão anaeróbia da biomassa
- E_L – energia a partir dos lipídeos extraídos da biomassa
- ETE – estação de tratamento de esgoto
- F1 – fase 1 de operação do reator híbrido anaeróbio
- F2 – fase 2 de operação do reator híbrido anaeróbio

F3 – fase 3 de operação do reator híbrido anaeróbio

FAPEMIG - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

FBR – fotobiorreator

HPLC – *high-performance liquid chromatography*

HRAP – *high rate algal pond*

I – inóculo

IP – iodeto de propídio

LAT – lagoa de alta taxa

LNEG – Laboratório Nacional de Energia e Geologia de Portugal

n – número de amostras

ND – não detectado

NER – *net energy ratio*

NTK – nitrogênio total kjeldahl

OD – oxigênio dissolvido

P1 – ponto de amostragem do reator anaeróbio híbrido, localizado no meio do leito filtrante

P2 - ponto de amostragem do reator anaeróbio híbrido, localizado imediatamente abaixo da zona de filtração

P3 - ponto de amostragem do reator anaeróbio híbrido, localizado na manta de lodo

P_B – produtividade de biomassa

P_B/E_C – produtividade específica de biomassa

PE – pós-extração lipídica

PG – produção anual de biogás

PHAs – polihidroxialcanoatos

PHB – polihidroxibutirato

PL - produção anual de lipídeos

P_{ot} – potência

PPB – potencial de produção de biogás

PPM – potencial de produção de metano

Ps – fósforo solúvel

Pt – fósforo total

SSF – sólidos suspensos fixos

SSV – sólidos suspensos voláteis

ST – sólidos totais

STV – sólidos totais voláteis

T – temperatura

TDH – tempo de detenção hidráulica

UASB – *upflow anaerobic sludge blanket reactor*

UFV – Universidade Federal de Viçosa

v/v – volume/volume

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO.....	1
2. INTRODUÇÃO GERAL.....	3
3. HIPÓTESES	6
4. OBJETIVOS	7
4.1. Objetivo Geral	7
4.2. Objetivos Específicos	7
Capítulo 5 – CULTIVO DE MICROALGAS EM EFLUENTES: BIORREFINARIA BASEADA NA DIGESTÃO ANAERÓBIA.....	8
5.1. Introdução	8
5.2. Digestão anaeróbia.....	12
5.3. Digestão anaeróbia de biomassa algal.....	13
5.3.1. Composição da biomassa algal	14
5.3.2. Configuração de reatores e parâmetros de operação.....	15
5.3.3. Inibições provocadas com a utilização de microalgas como substrato	21
5.3.4. Melhoria da digestão anaeróbia de biomassa algal	24
5.4. Digestão anaeróbia de biomassa algal cultivada em efluentes.....	27
5.5. Biorefinaria baseada na digestão anaeróbia	31
5.5.1. Plataforma de ácidos orgânicos voláteis (AOVs)	32
5.5.2. Plataforma de biogás	33
5.5.3. Plataforma de digeridos.....	34
5.6. Papel da digestão anaeróbia em uma biorrefinaria de microalgas cultivadas em efluentes.....	34
5.7. Considerações finais.....	40
5.8. Referências bibliográficas	40
Capítulo 6 - RECUPERAÇÃO ENERGÉTICA EM LAGOAS DE ALTA TAXA USADAS PARA TRATAMENTO DE ESGOTO DOMÉSTICO	50
6.1. Introdução.....	50
6.2. Materiais e Métodos	52
6.2.1. Unidade de produção de biomassa.....	52
6.2.2. Caracterização da biomassa	52
6.2.3. Lipídeos.....	53
6.2.4. Biogás.....	53
6.2.5. Análise energética	55
6.3. Resultados e Discussão	56

6.3.1.	Caracterização da biomassa	56
6.3.2.	Ganho de energia.....	57
6.3.3.	Análise energética	62
6.4.	Conclusões.....	64
6.5.	Referências Bibliográficas.....	64
Capítulo 7 - POTENCIAL ENERGÉTICO DE BIOMASSA CULTIVADA EM EFLUENTE DE INDÚSTRIA DE PROCESSAMENTO DE CARNES EM FOTOBIOREATOR COLUNA DE BOLHAS.....		68
7.1.	Introdução	69
7.2.	Materiais e Métodos	71
7.2.1.	Cultivo.....	71
7.2.2.	Valorização energética.....	72
7.2.3.	Análise energética	74
7.2.4.	Manipulação dos dados e replicação experimental.....	75
7.3.	Resultados e Discussão	75
7.3.1.	Valorização energética.....	75
7.3.2.	Viabilidade energética.....	79
7.4.	Conclusões.....	81
7.5.	Referências Bibliográficas.....	82
Capítulo 8 - COMPLEMENTARIEDADE DE SUBSTRATOS E INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTIVO NA DIGESTÃO ANAERÓBIA DE BIOMASSA ALGAL.....		85
8.1.	Introdução.....	85
8.2.	Materiais e Métodos	87
8.2.1.	Substratos e Inóculo	87
8.2.2.	Digestão anaeróbia: modo de funcionamento e configuração experimental	88
8.2.3.	Métodos analíticos e cromatográficos.....	90
8.3.	Resultados e Discussão	91
8.3.1.	Substratos e inóculo	91
8.3.2.	Digestão anaeróbia	94
8.4.	Conclusões.....	104
8.5.	Referências Bibliográficas.....	105
Capítulo 9 - VALORIZAÇÃO ENERGÉTICA DE BIOMASSA ALGAL EM UM REATOR HÍBRIDO ANAERÓBIO.....		107
9.1.	Introdução.....	108

9.2.	Materiais e Métodos	111
9.2.1.	Substratos	111
9.2.2.	Digestão anaeróbia: modo de funcionamento e configuração experimental 113	
9.2.3.	Métodos analíticos, cromatográficos e de citometria de fluxo	115
9.3.	Resultados e Discussão	118
9.3.1.	Substratos	118
9.3.2.	Desempenho do reator híbrido anaeróbio nas diferentes fases de operação 119	
9.4.	Conclusões.....	129
9.5.	Referências Bibliográficas.....	130
10.	CONCLUSÃO GERAL.....	133
11.	SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS	134
12.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	136
13.	ANEXOS	139

1. APRESENTAÇÃO

A presente pesquisa foi desenvolvida como continuidade dos estudos realizados no Núcleo de Pesquisas Ambientais Avançadas (nPA) do Departamento de Engenharia Civil da Universidade Federal de Viçosa (UFV), que abrangem a produção de biomassa algal e tratamento de efluentes, além dos benefícios oriundos dessa integração, com destaque para a geração de biocombustíveis. Pesquisas anteriores abordaram o efeito da radiação solar e da pré-desinfecção do efluente com radiação ultravioleta na eficiência do tratamento do esgoto doméstico, na produtividade de biomassa e de lipídeos (Santiago, 2013; Assemany, 2013; Santiago et al., 2013; Assemany et al., 2014; Assemany et al., 2015). Efeito de diferentes profundidades na produtividade de biomassa e no tratamento de esgoto doméstico em lagoas de alta taxa (LATs) foi também abordado, além de estudo de valorização da biomassa produzida através do processo de liquefação hidrotérmica (Couto, 2016). Outros estudos do mesmo grupo de pesquisa dizem respeito à produção de biomassa algal em reatores híbridos, que compreendem o crescimento disperso e aderido (Assis, 2016), o aproveitamento da biomassa a partir da produção de briquetes (Costa, 2016a; Costa et al., 2016), a aplicação da biomassa no solo, com vistas ao desenvolvimento de um biofilme atuante como fertilizante e na liberação de gases de efeito estufa (Castro, 2016; Castro et al., 2017) e o estudo de LATs e fotobiorreator coluna de bolhas no tratamento de efluente agro-industrial e na produção de biomassa algal (Tango, 2015; Costa, 2016b).

Resultados demonstraram o baixo acúmulo lipídico (~ 10% de lipídeos neutros) da biomassa produzida em efluentes, seja em LAT ou em fotobiorreator e também apontaram um elevado teor de cinzas (~ 40%) da biomassa produzida em esgoto doméstico. As rotas de valorização energética a partir da produção de briquetes e da liquefação hidrotérmica se mostraram de grande interesse para a biomassa produzida, com rendimentos satisfatórios e dentro do esperado para o substrato utilizado. No entanto, a colheita e concentração dessa biomassa continuam representando o principal obstáculo para o seu aproveitamento. Assim, rotas como a liquefação e a digestão anaeróbia se mostram de grande aplicabilidade.

De forma a ampliar o leque de utilização da biomassa de microalgas, acredita-se que a viabilidade técnica e econômica da produção dessa biomassa para fins energéticos está em consonância com o conceito de biorrefinaria e de sustentabilidade com a produção em efluentes, o presente estudo visa destacar a digestão anaeróbia como opção de valorização

energética. Estratégias de melhoria do processo foram abordadas, dando ênfase à superação da difícil degradabilidade dessa biomassa por meio de pré-tratamentos (extração lipídica e pré-tratamento térmico), e à superação da desbalanceada composição química dessa biomassa, nomeadamente da baixa relação carbono/nitrogênio da biomassa algal através do uso de efluente da extração de azeite (água ruça) como substrato complementar. A ampliação de escala do processo foi também abordada com a operação e monitoramento de um reator híbrido anaeróbio.

Esse documento foi organizado em cinco capítulos principais, além de introdução geral, hipóteses, objetivos e conclusão geral. O primeiro capítulo diz respeito a uma revisão bibliográfica sobre os assuntos que permeiam o tema avaliado. O segundo e o terceiro capítulos tratam de uma análise energética com a definição do melhor uso da biomassa cultivada, respectivamente, em lagoa de alta taxa utilizando esgoto doméstico e fotobioreator coluna de bolhas utilizando efluentes da indústria de processamento de carne. O quarto avalia a complementariedade de substrato na digestão anaeróbia de biomassas algais com diferentes composições químicas (biomassas produzidas em LATs utilizando esgoto doméstico e efluente da indústria cervejeira como meios de cultivo). O último capítulo aborda a operação e monitoramento de um reator híbrido utilizado na digestão anaeróbia de biomassa algal produzida em efluente da indústria cervejeira. Os dois últimos capítulos dizem respeito à parte do estudo realizada no Laboratório de Energia e Geologia de Portugal (LNEG), mediante bolsa de doutorado sanduíche pleiteada frente ao CNPq (Processo 234510/2014-5) pela autora do trabalho. Com essa organização foi possível avaliar uma rota promissora de produção de biocombustíveis a partir do tratamento de efluentes, elucidando limitações importantes para a aplicação e ampliação do processo.

2. INTRODUÇÃO GERAL

Os biocombustíveis de primeira geração, como são chamados os biocombustíveis oriundos de fontes comestíveis, como soja, girassol, palma, canola, dentre outros são responsáveis por mais de 95% do total do biodiesel comercializado no mundo. No entanto, seu uso está associado a vários problemas, principalmente devido a seu impacto no mercado global de alimentos e segurança alimentar (Brennan e Owende, 2010). Adicionalmente, problemas ambientais como desmatamentos e elevada demanda de áreas férteis, também são associados com o cultivo em larga escala para a produção de biocombustíveis. Assim, de forma a diminuir a dependência dos combustíveis de primeira geração, matérias primas alternativas começaram a ser estudadas nos últimos anos (Ahmad et al., 2011). Os biocombustíveis de segunda geração são os oriundos de culturas não comestíveis, como biomassa lignocelulósica, óleo de cozinha usado, resíduos oleosos oriundos de animais, dentre outros. Apesar da não competição por áreas férteis e pela produção de alimento, esse tipo de biocombustível nunca será abundante o suficiente para atender toda a demanda por combustíveis do setor de transportes, por exemplo (Ahmad, et al, 2011). Portanto, os biocombustíveis de terceira geração surgem como alternativa viável para a crise energética (Silva et al., 2012). Esse tipo de biocombustível é oriundo de microorganismos e é fonte renovável de energia, além de não conter enxofre e ser altamente biodegradável (González-Delgado e Kafarov, 2011).

As microalgas são consideradas como alternativa não alimentícia para a produção de bioenergia, podendo ser classificadas como fonte de biocombustível de terceira geração. Além de água e sol, necessitam também de nutrientes como qualquer planta superior para seu desenvolvimento. Em tese, a biotecnologia de microalgas é uma forma mais sofisticada de agricultura, na qual se utilizam reatores especialmente dimensionados, nos quais ocorrem trocas gasosas (sequestro de dióxido de carbono e liberação de oxigênio) com produção intensiva de biomassa. O cultivo de microalgas em efluentes garante maior sustentabilidade, tanto econômica quanto ambiental, ao processo de obtenção de biocombustíveis. Por outro lado, o uso de efluentes para o cultivo de microalgas, seja em sistemas abertos ou fechados de produção, cria um ambiente competitivo. Há a presença de sólidos suspensos que impedem a penetração de radiação solar, de substâncias tóxicas e de outros microrganismos que requerem espaço e nutrientes, dificultando o desenvolvimento da biomassa algal em condições potenciais, se comparado com meio de cultivo sintético. Dessa forma, a composição química da biomassa algal e

consequentemente o seu aproveitamento futuro, além de variar entre espécies diferentes, se torna intimamente dependente do meio de cultivo utilizado e das condições de *stress* que a cultura algal é submetida durante seu crescimento.

A digestão anaeróbia é bastante estudada e difundida na literatura, sendo possível afirmar, que para determinados resíduos, o processo, se não totalmente, é em grande parte conhecido e otimizado, como ocorre com os resíduos sólidos urbanos e lodos de estações de tratamento de esgoto doméstico, por exemplo. A biomassa algal, consiste basicamente em carboidratos, lipídeos e proteínas e pode ser aproveitada para a digestão anaeróbia, seja bruta ou após a extração desses componentes, contribuindo para garantir a viabilidade econômica da cadeia produtiva de microalgas. O biogás produzido pode ser utilizado como fonte primária de energia para grande parte do processo de produção de biomassa algal, reduzindo assim, os custos de produção do biodiesel e dos demais produtos de alto valor agregado (Yang et al., 2011). Mais do que isso, Sialve et al. (2009) estimam que a digestão anaeróbia desse substrato para a geração de metano, a partir do controle dos diversos parâmetros envolvidos, pode gerar tanta energia quanto a extração de lipídeos.

A digestão anaeróbia de biomassa algal tem sido pesquisada desde os anos de 1950. O assunto foi originalmente publicado por Golueke et al. (1957). Em 1960, Oswald e Golueke propuseram um processo integrado, associando a produção de biomassa algal em lagoas para tratamento de esgoto e a recuperação energética através da digestão anaeróbia da biomassa (Chen e Oswald, 1998). O desenvolvimento da digestão da biomassa algal recebeu atenção continuada nos anos seguintes, incluindo estudos de Uziel (1978) e Eisenberg et al. (1981). Ambos os autores concluíram que se adequadamente projetados e operados, sistemas de crescimento de microalgas são capazes de converter 2,5% do total de energia solar em energia contida na biomassa algal.

Recentemente, várias abordagens têm sido feitas de forma a confirmar o potencial atrativo das microalgas como matéria prima para a produção de biogás. No entanto, limitações advindas do substrato biomassa algal são ainda na atualidade descritas. As maiores complexidades da digestão anaeróbia da biomassa algal são reportadas como sendo a baixa digestibilidade da parede celular das algas e a inibição do processo pela presença de amônia (Mussnug et al., 2010; Sialve et al., 2009). Devido a elevadas concentrações de proteínas, as microalgas podem apresentar baixa relação carbono-nitrogênio (C/N), comprometendo o desempenho da digestão anaeróbia. Nesse caso, de acordo com Brennan e Owende (2010), a solução pode ser a co-digestão com produtos que possuem

elevada relação C/N. Adicionalmente, de forma a se obter quantidades consideráveis de biogás e alto grau de degradação da biomassa algal, altos tempos de detenção hidráulica são exigidos (entre 20 e 30 dias) sob condições mesofílicas (Zamalloa et al., 2012). A resistência causada pela parede celular durante o processo de digestão é a principal causa da baixa biodegradabilidade e dos altos tempos de detenção aplicados. Microalgas são intimamente comparadas com plantas, portanto, uma parede celular composta de celulose/hemicelulose é usualmente reportada (Ververis et al., 2007; Fu et al., 2010).

Avanços ainda precisam ser feitos para consolidação do processo e superação das limitações mencionadas. Estudos recentes concentram esforços na co-digestão da biomassa (Wang et al., 2013; Ramos-Suárez e Carreras, 2014) e pré-tratamentos (Alzate et al., 2012; Passos et al., 2013; Zhao et al., 2014). De forma geral, as perspectivas futuras da digestão anaeróbia da biomassa algal são dependentes do custo-benefício do processo em uma escala industrial. Diversos estudos baseados no estado da arte de tecnologias indicam que o sistema pode não ser viável economicamente (Kwietniewska e Tys, 2014). O consumo energético e o impacto ambiental associado são gargalos a serem superados. As principais dificuldades são as tecnologias ainda imaturas para separação da biomassa algal (Collet et al., 2011), e particularmente, os altos custos de confecção e operação dos fotobioreatores e a baixa produtividade das lagoas de alta taxa. Adicionalmente, reporta-se que a viabilidade e sustentabilidade do processo só serão alcançadas se a produção de biogás for combinada com uma prévia recuperação do biodiesel (Sialve et al., 2009; Collet et al., 2011; Harun et al., 2011) ou de outros produtos valorados.

3. HIPÓTESES

A extração de lipídeos se caracteriza como um pré-tratamento da biomassa, influenciando positivamente na produção de biogás a partir de biomassa algal.

A complementariedade de substratos, através da adição de água ruça, se caracteriza como uma estratégia utilizada de forma a evitar qualquer pré-tratamento ou correção dos substratos no processo de digestão anaeróbia da biomassa algal, influenciando positivamente na produção de biogás.

O reator híbrido anaeróbio representa uma alternativa tecnicamente viável para a recuperação energética da biomassa algal.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar a digestão anaeróbia como rota para valorização energética de biomassa algal cultivada em efluentes.

4.2. Objetivos Específicos

- Determinar o potencial de produção de biogás e a biodegradabilidade anaeróbia da biomassa, antes e após a extração lipídica;
- Definir o uso energeticamente mais favorável da biomassa cultivada em lagoa de alta taxa e fotobiorreatores coluna de bolha;
- Aplicar o conceito de complementariedade de substratos para avaliar se a biomassa algal cultivada em efluentes e a água ruça podem ser anaerobiamente digeridas;
- Avaliar o desempenho de um reator híbrido na digestão anaeróbia de biomassa algal cultivada em efluente da indústria cervejeira.

Capítulo 5 – CULTIVO DE MICROALGAS EM EFLUENTES: BIORREFINARIA BASEADA NA DIGESTÃO ANAERÓBIA

Resumo

O cultivo de microalgas aliado ao tratamento de efluentes, além de reduzir os custos da produção de biomassa com a economia de insumos, pode ser encarado como uma opção eficiente para o gerenciamento de energia em uma estação de tratamento de efluentes. A digestão anaeróbia assume um importante papel na biorrefinaria de microalgas cultivadas em efluentes, pois supera a etapa crítica de secagem e o baixo conteúdo lipídico da biomassa, além de ser um processo de simples operação. Adicionalmente à geração de bioenergia, outros potenciais produtos como biofertilizantes, ração para alimentação animal e produtos intermediários podem ser obtidos. Em um contexto de biorrefinaria, a digestão anaeróbia já é empregada como tecnologia auxiliar para valorizar correntes residuais, no entanto, deve-se potencializar seu uso como tecnologia principal. No entanto, limitações advindas do substrato biomassa algal são ainda na atualidade descritas. As maiores complexidades da digestão anaeróbia da biomassa algal são reportadas como sendo a baixa digestibilidade da parede celular das algas e a inibição do processo pela presença de amônia. Considerando a produção de biomassa algal através da utilização de efluentes e a abordagem da biorrefinaria como principais formas de superar as limitações da produção de microalgas para fins energéticos, esse capítulo pretende abordar a digestão anaeróbia como principal meio de valorização energética da biomassa algal produzida em efluentes.

Palavras-chave: bioenergia, biogás, estação de tratamento de efluentes, recuperação de recursos, valorização de resíduos.

5.1. Introdução

O termo microalga, apesar de não apresentar valor taxonômico, pode ser definido como “microrganismos que podem crescer fotossinteticamente” (Sheehan, 1998). Podem apresentar metabolismo autotrófico, possuindo a capacidade de converter CO₂ e energia solar em biomassa. Existem milhares de espécies de microalgas de água doce e marinhas, que atualmente vem recebendo grande atenção, devido ao grande potencial para a indústria de biotecnologia, atribuído graças as características como a maior taxa de crescimento em relação a outras espécies vegetais, a possibilidade de cultivo ao longo de

todo o ano, a capacidade de crescerem em áreas impróprias para a agricultura e a habilidade de se desenvolverem nos mais diferentes climas (Savage e Hestekin, 2013). Dentre algumas classes de interesse, citam-se: diatomáceas (Classe *Bacillariophyceae*), algas verdes (Classe *Chlorophyceae*) e algas douradas (Classe *Chrysophyceae*).

Há muito tempo, as microalgas vêm sendo exploradas como fonte de alimentação humana e animal. Nos anos 1950, Burlew (1953) propôs o uso de microalgas como fonte alternativa de proteínas frente a demanda mundial por alimentos. Em 1960, o Japão começou a construção da primeira planta industrial de produção de *Chlorella* para a alimentação humana (Vigani et al., 2015). Nos anos 1980 haviam 46 fábricas em larga escala na Ásia com produções mensais superiores a 100 quilos, principalmente de microalgas do gênero *Chlorella*. A produção de cianobactérias em larga escala, por sua vez, começou também no continente asiático, mais precisamente na Índia, também nos anos 1980. Várias plantas produzindo *Haematococcus pluvialis* como fonte de astaxantina foram estabelecidas nos EUA e na Índia. Assim, em um período de 30 anos, a indústria de biotecnologia de microalgas adquiriu crescente e significativa diversidade (Olaizola, 2003).

No contexto das energias renováveis, de acordo com Huang et al. (2010), estudos com combustíveis líquidos oriundos de microalgas se intensificaram no meio da década de 1980. Durante a segunda guerra mundial, cientistas alemães tentaram extrair lipídeos de diatomáceas com objetivo de solucionar a crise energética (Cohen et al., 1995). Logo após, as pesquisas foram continuadas nos Estados Unidos, no Instituto de Carnegie em Washington. Os resultados foram publicados em um livro intitulado “*Algal Culture from Laboratory to Pilot Plant*” (Burlew, 1953). Todavia, as tecnologias de produção de combustíveis advindos de microalgas ainda não foram totalmente exploradas.

Atualmente, as microalgas são comercialmente cultivadas para fabricação de produtos de elevado valor nutricional tanto para seres humanos como para animais, pois são conhecidos efeitos antioxidantes, imunológicos e anticancerígenos, sendo fonte de produtos de alto valor agregado como carotenoides e ômega 3. Benemann (2009) estima que a produção anual em todo o mundo seja em torno de 10.000 toneladas. Os principais gêneros cultivados são *Spirulina*, *Chlorella*, *Dunaliella* e *Haematococcus*. Quase metade da produção de microalgas está situada na China continental, com a maior parte do restante no Japão, Taiwan, EUA, Índia e Austrália, com pequenos produtores em outros países. A Figura 5.1 apresenta os países produtores de biomassa algal para fins

alimentícios. A maioria dos países produz biomassa para alimentação humana, seca ou em pasta, além da produção para extração de produtos de alto valor agregado e como alimento para aquicultura.

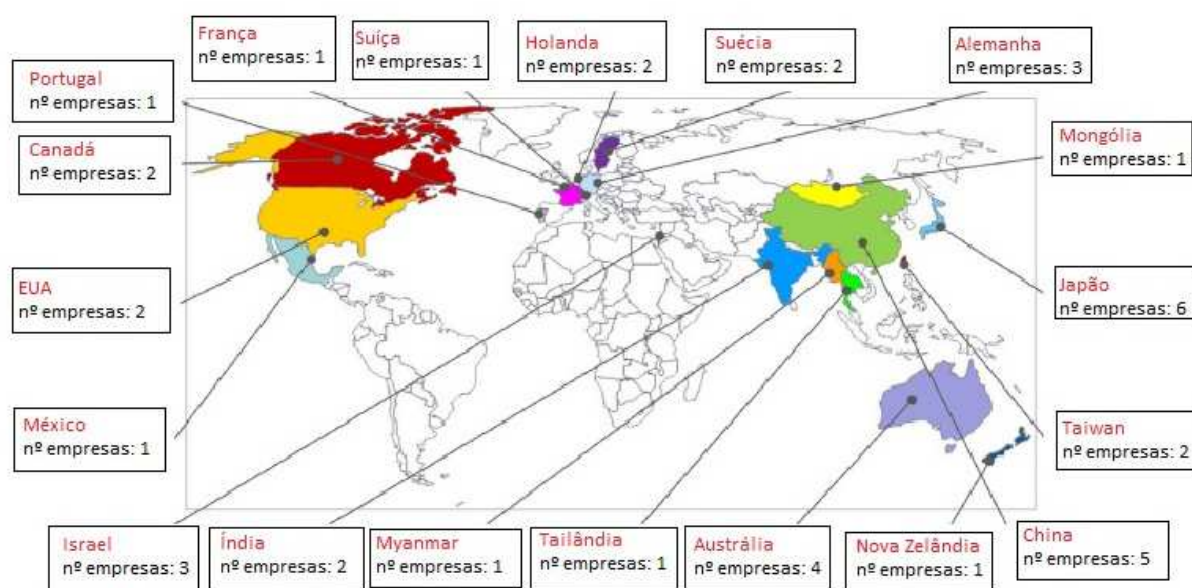


Figura 5.1 - Distribuição global de empresas privadas que produzem derivados de microalgas para alimentação comercial e para suplementos alimentícios. Fonte: Adaptado de Vigani et al. (2015).

Em relação à produção de microalgas para biocombustíveis, um número crescente de empresas está envolvido em testes para desenvolvimento de combustíveis para aviação à base de biocombustível de algas. Em julho de 2010 foi realizado o primeiro voo de uma aeronave movida por combustível produzido à base de algas. O voo foi feito em um Diamond Aircraft DA42 Nova Geração, avião de hélice dupla, na Exposição Internacional Aeroespacial de Berlim. Outro exemplo da aplicação real é o acordo feito em dezembro de 2011 entre a empresa aérea Lufthansa com a Empresa Algae Tec® para avaliar o potencial das algas como matéria prima para a produção de biocombustíveis para a aviação. A Tabela 5.1 apresenta algumas empresas que comercializam combustíveis de algas.

Tabela 5.1 - Algumas empresas que comercializam combustíveis de algas.

Empresa	Localização	Referência
Algenol Biofuels Bonita	Springs, EUA	www.algenolbiofuels.com
Aquaflow Nelson,	Nova Zelândia	www.aquaflowgroup.com
Aurora Algae, Inc.	Hayward, EUA	www.aurorainc.com
Bionavitas, Inc.	Redmond, EUA	www.bionavitas.com
Joule Unlimited, Inc.	Bedford, EUA	www.jouleunlimited.com
LiveFuels, Inc.	San Carlos, EUA	www.livefuels.com
OriginOil, Inc.	Los Angeles, EUA	www.originoil.com
Parabel, Inc.	Melbourne, EUA	www.parabel.com
Sapphire Energy, Inc.	San Diego, EUA	www.sapphireenergy.com
Solazyme, Inc.	South San Francisco, EUA	www.solazyme.com
Solix Biofuels, Inc.	Fort Collins, EUA	www.solixbiofuels.com
Algae Energy	Madri, Espanha	www.algaenergy.es

Fonte: Adaptado de Chisti e Yan (2011).

Em se tratando da produção de biocombustíveis, a viabilidade econômica ainda não foi atingida. Os custos de produção e processamento dos biocombustíveis são demasiadamente elevados, se comparados com os preços dos combustíveis fósseis. Dessa forma, a produção das microalgas em efluentes é considerada uma alternativa para tornar os biocombustíveis de microalgas mais competitivos comercialmente. As microalgas, para seu desenvolvimento, necessitam de água e nutrientes, além de CO₂ e luz. Tanto a água e os nutrientes estão presentes em grande quantidade nos efluentes. Enquanto se reproduzem, as microalgas assimilam os nutrientes e depuram o efluente. Uma vez que a redução dos custos de produção é um objetivo inerente às pesquisas com microalgas, essa abordagem propicia a obtenção de insumos sem custos, além de contribuir para a mitigação de um dos principais problemas de infraestrutura da sociedade brasileira, a falta de saneamento.

A digestão anaeróbia (DA) por ser um processo amplamente dominado para vários substratos, de simples operação e custos reduzidos pode ser considerado uma alternativa potencial para o aproveitamento da biomassa algal. O processo ainda apresenta como vantagem a superação de alguns gargalos do processo produtivo, como a separação e secagem da biomassa e o baixo conteúdo lipídico da biomassa produzida em efluentes.

Adicionalmente, pode ser facilmente inserida em uma estação de tratamento de efluentes (ETE), ajudando a tornar o tratamento mais sustentável, com geração de energia e recuperação de recursos. A DA é um processo complexo com várias rotas metabólicas e diferentes microrganismos envolvidos, podendo ser considerado por si só como uma biorrefinaria, já que ao final vários produtos podem ser obtidos. Apesar do uso de efluentes diferenciar o uso final da biomassa produzida, opções como energia elétrica, calor, fertilizantes, ração para alimentação animal, efluente para reúso não potável são alguns exemplos de subprodutos que podem ser originados da digestão anaeróbia de biomassa algal produzida durante o tratamento de efluentes.

Considerando a produção de biomassa algal através da utilização de efluentes e a abordagem da biorrefinaria como principais formas de superar as limitações da produção de microalgas para fins energéticos, esse capítulo pretende abordar a DA como principal meio de valorização energética da biomassa algal. Aspectos relacionados às características e peculiaridades desse substrato para a DA, estratégias para melhoria do rendimento e diferentes configurações de reatores utilizados para esse fim são discutidos. Além disso, a influência do uso de efluentes nas características da biomassa produzida para a DA e como esse processo pode ser inserido no contexto de uma ETE sustentável foram abordados.

5.2. Digestão anaeróbia

A DA é um processo frequentemente empregado na conversão de rejeitos em produtos de valor agregado. Este processo de degradação da matéria orgânica ocorre por meio de quatro reações principais:

- i) hidrólise – polímeros orgânicos complexos são decompostos em monômeros como açúcares, ácidos orgânicos e aminoácidos por bactérias hidrolíticas;
- ii) acidogênese – monômeros orgânicos são convertidos em hidrogênio, bicarbonato, ácidos acético, propiônico e butírico e outros compostos orgânicos, tais como etanol e ácido lático por bactérias acidogênicas;
- iii) acetogênese – oxidação de compostos orgânicos reduzidos gerando acetato ou hidrogênio e dióxido de carbono por ação de bactérias acetogênicas;
- iv) metanogênese – fermentação acetoclástica por *archaeas* metanogênicas acetoclásticas, produzindo metano.

Reações paralelas também ocorrem, como por exemplo, a oxidação de compostos orgânicos reduzidos a hidrogênio, e oxidação do hidrogênio, através da redução de bicarbonato pelas *archeas* metanogênicas hidrogenotróficas, gerando metano (Viana, 2011).

A Figura 5.2 apresenta o esquema dos processos que compõem a DA.

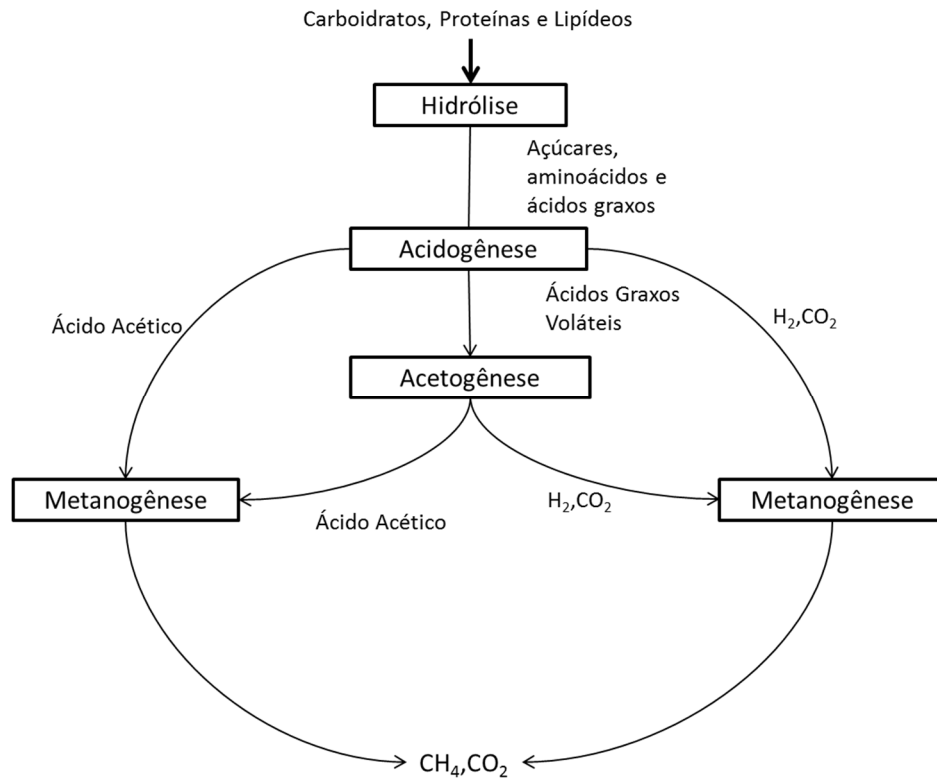


Figura 5.2 - Degradação da matéria orgânica pela digestão anaeróbica. Fonte: Adaptado de Li et al. (2011).

A conversão de matéria orgânica em biogás por meio da DA produz essencialmente metano e dióxido de carbono, além de pequenas quantidades de outros gases, como sulfetos e gás hidrogênio (Brennan e Owende, 2010). No processo tradicional, realizado em um estágio, concentrações de gás hidrogênio não são usualmente encontradas, uma vez que o mesmo é consumido durante a metanogênese para a produção de metano e gás carbônico como produtos finais (Ueno et al., 2007; Ward et al., 2008).

5.3. Digestão anaeróbia de biomassa algal

A DA de biomassa algal tem sido pesquisada desde os anos de 1950. O assunto foi originalmente realizado e publicado por Golueke et al. (1957). Em 1960, Oswald e Golueke propuseram um processo integrado, associando a produção de biomassa algal em lagoas para tratamento de esgoto e a recuperação energética através da DA da

biomassa (Chen e Oswald, 1998). O desenvolvimento da digestão da biomassa algal recebeu atenção continuada nos anos seguintes, incluindo estudos de Uziel (1978) e Eisenberg et al. (1981). Com a primeira crise do petróleo, o entusiasmo científico pela produção de metano se manteve, bem como o destaque para o tema. No presente, o intenso interesse na DA é relacionado, principalmente, com a capacidade de tratar e converter uma grande variedade de resíduos orgânicos em energia de fontes renováveis. Entretanto, no caso específico de biomassa algal, a literatura disponível é particularmente escassa.

5.3.1. Composição da biomassa algal

A matéria orgânica submetida à DA precisa atender a determinadas condições para que o rendimento do processo seja satisfatório. Assim, a determinação da composição da biomassa é uma maneira de se conhecer o potencial da digestão. A produção teórica de metano depende da composição da biomassa e como uma tendência geral, a produção teórica a partir da biomassa algal é sempre maior que a produção de biogás a partir de plantas terrestres (Murphy et al., 2015; Weiland, 2010), devido ao elevado conteúdo de proteínas e lipídeos das microalgas. De acordo com Klassen et al. (2016), a produção teórica pode ser calculada baseada no conteúdo relativo de proteínas, lipídeos e carboidratos via fórmula proposta por Heaven et al. (2011), assumindo valores de 415, 446 e 1014 mL CH₄/g STV para carboidratos, proteínas e lipídeos, respectivamente.

Para Sialve et al. (2009), a composição mineral da célula algal é suficiente para atender as demandas nutricionais da microbiota responsável pelo processo de degradação anaeróbia. Além de carbono, nitrogênio e fósforo que são os componentes principais da composição da biomassa algal, oligo nutrientes como ferro, cobalto e zinco são também encontrados nas células algais e são conhecidos por estimular a atividade metanogênica (Speece, 1996).

De acordo com Brown et al. (1997), esses organismos apresentam a composição celular intimamente variável de acordo com a espécie, apresentando em geral, de 6 a 52% de proteínas, 7 a 23 % de lipídeos e 5 a 23% de carboidratos. No entanto, dada a grande variabilidade dos intervalos propostos, entende-se que a composição celular, além de variar com a espécie é altamente afetada pelas condições ambientais de cultivo. Assim, segundo Passos et al. (2014a), a variabilidade relacionada aos diferentes rendimentos da DA de biomassa algal pode ser devida a dois aspectos principais: i) características da parede celular de cada espécie de microalgas, e ii) a composição macromolecular das

células algais. No entanto, independentemente da espécie, praticamente qualquer biomassa bruta de microalgas apresenta um baixo rendimento de metano, inferior aos valores teóricos (Passos et al., 2014a). De acordo com Klassen et al. (2016), a conversão de biomassa algal não tratada em metano é geralmente incompleta, não excedendo 50% do potencial teórico de produção.

Para diversas espécies, a alta proporção de proteínas é caracterizada por uma reduzida relação carbono-nitrogênio (C/N), principalmente se comparada com plantas terrestres. Essa relação varia de 4-9, dependendo da espécie de microalga (Geider e Roche, 2002), enquanto que em biomassa de plantas terrestres, essa aumenta para 16 (Elser et al., 2000). De acordo com Speece (1996), relações C/N menores que 20 são consideradas desbalanceadas para a digestão anaeróbia, levando principalmente à liberação de amônia e conseqüentemente à inibição da digestão.

5.3.2. Configuração de reatores e parâmetros de operação

A Tabela 5.2 resume condições experimentais e taxas de conversão de metano para alguns estudos. Destaca-se a grande variabilidade da produção de metano, dependendo da espécie e da condição de operação dos reatores utilizados nos testes anaeróbios.

Em se tratando da configuração dos reatores anaeróbios para DA de biomassa algal, a performance de reatores de agitação contínua (os chamados *continuous stirred tank reactor*, CSTR) alimentados com biomassa algal é ainda limitada, mas provavelmente é a configuração de reator mais utilizada para a digestão desse tipo de substrato (González-Fernández et al., 2015). O uso desse reator implica em crescimento suspenso da biomassa, com cargas orgânicas típicas de 1-6 g DQO/ L.d e tempos de detenção hidráulica (TDH) entre 10 e 30 dias.

Tabela 5.2 - Condições experimentais e conversão de metano de diversos estudos com digestão anaeróbia de biomassa algal.

Reator	Substrato	Relação C/N	T (°C)	TDH (d)	Carga orgânica (g STV/L.d)	Produção de biogás	Composição biogás	Referências
CSTR^a 4L	<i>Chlorella-Scenedesmus</i>	–	35	10	2-6	0,09-0,136 L CH ₄ /g STV	69% CH ₄	Yen e Brune (2007)
CSTR^a batelada 500 mL	<i>Chlorella</i> sp.	–	37	30-38	–	0,4 L CH ₄ /g ST	–	Ehimen et al. (2009)
CSTR^a 5L	<i>Chlorella</i> sp.	–	25-40	5-15	1-3,3	0,05-0,3 L CH ₄ /g STV	62-68% CH ₄	Ehimen et al. (2011)
Fermentador em batelada 0,15L	Taihu alga azul e palha de milho	20	35	30	20	0,325 L CH ₄ /g STV	–	Zhong et al. (2012)
Fermentador em batelada 0,5L	<i>Chroococcus</i> sp.	4,44-8,11	36	30	–	0,40-0,49 L CH ₄ /g STV	–	Prajapati et al. (2013b)

^a Reator de agitação contínua. TDH = tempo de detenção hidráulica. Fonte: Adaptado de Prajapati et al. (2013a).

Como pode ser verificado na Tabela 5.2, a variabilidade de rendimentos na DA obtida na literatura operando com a mesma configuração de reatores (CSTR), pode ser justificada pela composição da biomassa e os diferentes graus de rigidez das paredes celulares das diferentes espécies (González-Fernández et al., 2015). Segundo esses autores, de forma a superar essa limitação, uma estratégia que vai além da aplicação de pré-tratamentos é a utilização de configurações de reatores mais adequadas para esse tipo de substrato. Nesse sentido, a desassociação do TDH e do tempo de retenção de sólidos através da imobilização de biomassa, retenção por membranas ou separação espacial podem ser configurações potenciais para se melhorar o rendimento da DA de biomassa algal.

Os reatores de manta de lodo (*Up Flow Anaerobic Sludge Blanket*, UASB) possuem a vantagem de permitir a manutenção no interior do reator de uma grande quantidade de biomassa anaeróbia ativa. O desenvolvimento de uma biomassa granular é o fator essencial para o sucesso da operação de um reator UASB. Tartakovsky et al. (2015) chegaram a resultados semelhantes de rendimentos na produção de biogás, comparando a operação de reatores CSTR e reatores UASB na DA de *Scenedesmus* sp. Os autores, no entanto, destacam a vantagem adicional dos reatores UASB de permitir uma menor concentração da biomassa a ser alimentada, evitando assim elevados custos no processo de colheita e separação dessa biomassa. Os mesmos autores operando um reator UASB com 3,8 dias de TDH e carga de 2,25 g STV/L.d para DA de *Scenedesmus* sp. atingiram um rendimento de 0,22 LCH₄/g STV. Por outro lado, Zamalloa et al. (2012a) reportaram rendimento de 0,11 LCH₄/g STV operando com TDH de 2,2 dias e carga orgânica aplicada de 2,7 g STV/L.d para também DA de biomassa de *Scenedesmus* sp. em reator híbrido, tipo UASB.

Outras opções de configuração de reatores já testados com biomassa algal são o biorreator anaeróbio a membranas (AnMBR) e os reatores com defletores. No primeiro tipo, um elevado tempo de retenção de sólidos pode ser aplicado (~50 dias), atingindo uma elevada qualidade do efluente tratado e evitando a perda de biomassa. No entanto, a principal desvantagem é a colmatção da membrana e os elevados custos associados. Zamalloa et al. (2012b) ao testarem esse tipo de reator para a DA de *Phaeodactylum tricornutum* em condições mesofílicas, obtiveram um rendimento de 0,35 LCH₄/g DQOconvertida, para um tempo de retenção de sólidos de 20 dias e carga orgânica aplicada que chegou a 5,8 g DQO/L.d. Para o segundo tipo, a principal característica é a separação espacial das

diferentes fases da DA, possibilitando o desenvolvimento de diferentes populações microbianas nos vários compartimentos e conseqüentemente a proteção a cargas tóxicas e possíveis variações nos parâmetros de operação. Essa configuração garante a promoção da granulação da biomassa anaeróbia, além de longos tempos de retenção de sólidos.

Em relação ao modo de operação dos reatores, as pesquisas disponíveis concentram-se na pequena escala e na alimentação de reatores feita em batelada. São poucos os estudos envolvendo reatores com alimentação contínua (Prajapati et al., 2013a), o que dificulta a aplicação dos resultados obtidos. Segundo González-Fernández et al. (2015), nos últimos anos a maioria dos estudos conduzidos foram destinados a melhorar a produção de metano usando pré-tratamentos para hidrólise ou ruptura da parede celular. A eficiência desses pré-tratamentos foi, na maioria dos casos, testada em ensaios de operação em batelada para uma mais rápida e fácil comparação com a biomassa bruta (Mendez et al., 2013; Passos e Ferrer, 2015). Dados obtidos de ensaios em batelada podem fornecer orientação, mas a avaliação dos benefícios dos pré-tratamentos aplicados em operação semi-contínua é altamente recomendada, de forma a se aprofundar nos estudos de performance dos microrganismos anaeróbios quando alimentados com biomassa pré-tratada. A produtividade de biogás obtida na digestão contínua é resultante de uma complexa ação recíproca entre substrato, composição, temperatura, pH, carga orgânica, TDH, tempo de residência celular, disponibilidade de nutrientes, potencial oxidação-redução, presença de compostos tóxicos, tamanho e acessibilidade de partículas do substrato (Speece, 1983). Apesar de alguns parâmetros serem de importância tanto na operação em batelada quanto em operação contínua, o acúmulo de substâncias inibidoras do processo anaeróbio é um problema específico da operação contínua. A frequente introdução de componentes no meio ou substâncias tóxicas presentes na biomassa podem sucessivamente serem acumuladas no digestor.

A seguir são descritos alguns dos principais parâmetros de operação de reatores anaeróbios capazes de influenciar o processo de DA.

Temperatura

A temperatura está intimamente relacionada com a atividade enzimática dos microrganismos responsáveis pela degradação anaeróbia. De maneira geral, quanto maior a temperatura, maior a atividade desses microrganismos até um valor limite que leva à danos na estrutura celular. Em temperaturas que excedem a de máximo crescimento, a

taxa de decaimento bacteriano vai exceder a taxa de crescimento e conseqüentemente, quedas na atividade específica do lodo e da eficiência do reator vão ocorrer.

Especificamente para o substrato biomassa algal, no estudo de Samson e LeDuy (1986), um aumento da temperatura de 15°C para 52°C melhorou a conversão de metano na DA da espécie *Spirulina maxima* e a produtividade, juntamente com a remoção de sólidos voláteis, foi reforçada em temperaturas acima de 35°C. Para uma biomassa oriunda de um consórcio algal como o estudado por Golueke et al. (1957), o incremento de temperatura de 35°C para 50°C aumentou a biodegradabilidade algal de 5 para 10%. O balanço energético, porém, foi negativo se considerada a energia necessária para o aquecimento. De acordo com Chen (1987), temperaturas na faixa mesofílica se destacam como condições ótimas, sendo a máxima produção de metano obtida em 40°C. Ehimen et al. (2011), por sua vez, obtiveram aumento do rendimento energético de 54% quando a temperatura do digestor subiu de 25°C para 35°C na digestão anaeróbia de substratos algais oriundos da extração lipídica. No entanto, os autores relataram que o incremento subsequente da temperatura para 40°C praticamente não influenciou no rendimento da digestão. Fato explicado pela adaptação da biomassa anaeróbia a temperaturas ótimas (bem próximas à máxima testada) previamente à indução de temperaturas variáveis ao inóculo. O período de adaptação, nesse estudo, favoreceu a seleção de espécies bacterianas que prosperaram na temperatura escolhida para a fase de aclimação.

pH

É sabido que a atividade metanogênica é mais favorecida em faixa estreita de pH, tida como ótima para valores entre 6,3 e 7,8 (van Hamde, 1994; van Hamde e Lettinga, 1994). O efeito de uma variação brusca de pH afluente no desempenho do processo depende da disponibilidade de alcalinidade disponível no reator. De acordo com Visser et al. (1993), a metanogênese é inibida para valores de pH superiores a 8, o que acarreta no desenvolvimento de microbiota dominada por bactérias sulfo-redutoras que são menos sensíveis a variações de pH do que as *arqueas* metanogênicas. É comum encontrar estudos com DA de biomassa algal que lançam mão de estratégias de controle para evitar a variação de valores de pH no interior do reator. As mais comuns são a adição de tampão, geralmente bicarbonato de sódio (Tartakovsky et al., 2013; Tartakovsky et al., 2015) e adição de NaOH para correção de pH do afluente ao reator (Zamalloa et al., 2012a).

Tempo de detenção hidráulica e taxa de aplicação orgânica

O tempo de detenção hidráulica e a taxa de aplicação orgânica são fatores chave para os processos anaeróbios. Existe um delicado balanço na DA entre os processos primários (hidrólise e acidogênese) e a conversão dos produtos ácidos pelas bactérias acetogênicas e *arqueas* metanogênicas. Variações bruscas na vazão e carga orgânica podem afetar adversamente o funcionamento do reator. O efeito de flutuações na carga orgânica e hidráulica geralmente depende do tempo de retenção de sólidos, intensidade e duração da variação, propriedades do lodo anaeróbio e do design do reator, especialmente do separador trifásico. O acúmulo de ácidos orgânicos voláteis é uma resposta típica durante uma sobrecarga orgânica e variações súbitas na taxa de aplicação e no tempo de detenção. Em situações de *stress* pode haver uma mudança na rota metabólica para uma rota menos favorável, resultando em um desbalanço entre produtores de ácidos orgânicos (populações acidogênica e acetogênica) e consumidores (microrganismos metanogênicos, bactérias redutoras de sulfato e redutoras de nitrogênio). Tal situação indesejada pode levar a uma produção significativa de dióxido de carbono e hidrogênio no biogás (Leitão et al., 2006).

O tempo de detenção hidráulica deve ser elevado o suficiente para permitir que as populações ativas permaneçam no reator, especialmente as *arqueas* metanogênicas, e não deve limitar a hidrólise, que é geralmente a etapa limitante de conversão de substratos complexos a metano, como é o caso da biomassa algal. Um exemplo do mau funcionamento do sistema quando submetido a baixos tempos de detenção pode ser dado por Ehimen et al. (2011). Segundo os autores, a inibição na produção de metano a um tempo de detenção de 5 dias foi atribuída à elevada “lavagem” de substratos não digeridos e de microrganismos ativos (especialmente as bactérias de crescimento lento) do reator anaeróbio. Quando o processo é operado de modo que o tempo de detenção seja alto e a taxa aplicada seja baixa, o rendimento na produção de biogás é constante e máximo. A situação contrária leva a um decaimento na taxa de conversão e conseqüentemente, da eficiência do processo.

Além disso, quando células são diretamente submetidas à digestão anaeróbia, a acessibilidade do conteúdo intracelular é limitada pela resistência da célula algal à hidrólise. Assim, de acordo com Chen (1987) e Sialve et al. (2009), a escolha do tempo de detenção e da taxa de aplicação deve ser feita levando em consideração características da espécie e da composição do substrato algal.

5.3.3. Inibições provocadas com a utilização de microalgas como substrato

Toxicidade pela amônia

A toxicidade de amônia ocorre principalmente devido à relação desbalanceada (baixa) de C/N da biomassa algal (Prajapati et al., 2013a). O alto teor de proteína da célula algal acarreta em grande liberação de amônia durante o processo anaeróbio, podendo causar efeitos inibitórios na microbiota presente no reator. Por exemplo, uma das características mais importantes do gênero *Chlorella* é o seu conteúdo de proteínas. Dependendo das condições da cultura, essa microalga pode acumular até 60% de proteína na forma de aminoácidos essenciais (Costa e Morais, 2014). O gênero *Chlorella* possui até 3 vezes mais proteína do que a mesma quantidade de carne vermelha, sendo utilizada como suplemento alimentar.

Durante o processo anaeróbio, proteínas são degradadas e a amônia é acumulada na fase líquida. O valor de pH e temperatura controlam a proporção de íons amônio e amônia livre presente no reator. Se a concentração de biomassa no afluente é elevada ou se essa biomassa estiver com pouco teor de carbono em relação a nitrogênio, haverá presente no reator altas concentrações de NH_3 , podendo ocorrer conseqüentemente inibição pela presença de amônia livre (Mc Carty, 1964). A forma não ionizada do nitrogênio sofre difusão passiva através das membranas celulares, expressando assim sua toxicidade. Segundo Angelidaki e Ahring (1993), as *arqueas* metanogênicas acetoclásticas são as mais sensíveis à presença de amônia. Concentrações de inibição variam de 1,7 a 14 g/L e dependem de diversos fatores como: período de aclimação, natureza do substrato e inóculo, bem como das condições de operação. Esses mesmos autores afirmam ainda que temperaturas termofílicas (40-50°C) possuem o efeito de maximizar a inibição causada pela amônia, devido ao aumento da concentração de amônia livre no meio. Entretanto, Chen et al. (2008) afirmam que elevadas concentrações de íons como Na^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} , que aumentam a alcalinidade e diminuem a fração não ionizada NH_3 , podem reduzir os efeitos inibitórios. No estudo de Ehimen et al. (2011), todavia, altas concentrações de nitrogênio amoniacal (4,3 g/L) aparentemente não afetaram a estabilidade do processo. Fato justificado pela influência do pH no controle das formas de amônia presentes no reator, além do período de aclimação do inóculo utilizado e da temperatura de digestão.

Degradabilidade

A quantidade de energia presente em células algais é de aproximadamente 25 J/g, porém somente uma pequena fração dessa energia é liberada em condições mesofílicas de fermentação em forma de metano. O restante que permanece na biomassa algal é resistente à degradação e grande parte das células e da parede celular se mantêm intactos depois da digestão (Chen e Oswald, 1998).

Apesar das propriedades da parede celular de algas serem de grande importância para aplicações biotecnológicas, somente algumas poucas informações são disponíveis para a maioria das espécies. A parede celular de microalgas possui uma ampla diversidade em termos de componentes moleculares, ligações inter e intra moleculares, assim como para a estrutura geral (Work et al., 2013). Ela pode ser constituída de carboidratos (Kloareg e Quatrano, 1988), proteínas (Miller et al., 1972; Goodenough e Heuser, 1985; Imam et al., 1985; Wang et al., 2004; Michel et al., 2010), lipídeos (Gelin et al., 1999; Kodner et al., 2009), carotenóides (Burczyk et al., 1981) e até de lignina (Martone et al., 2009; Sorensen et al., 2011). Polissacarídeos são os biopolímeros mais extensivamente estudados da parede celular de algas, incluindo celulose (Bisalputra e Weier, 1963; Tamura et al., 1996), quitina/moléculas de quitosana (Kapaun e Reisser, 1995), hemicelulose (Domozych et al., 1980), pectina (Domozych et al., 2007), algenano (Michel et al., 2010) e *lichenin* (Ford e Percival, 1965). A maioria das paredes celulares de microalgas é composta por duas partes: a parte fibrilar (esqueleto) e a parte amorfa (matriz). O componente fibrilar é formado por celulose, mananos e xilanos, enquanto a componente amorfa é onde a parte fibrilar é submergida (Lee, 2008). Paredes celulares complexas, como é o caso dos gêneros *Chlorella* e *Scenedesmus*, são compostas ainda de uma camada superficial, que pode ser homogênea ou possuir um revestimento trilaminar. Essa camada superficial é resistente à degradação anaeróbia uma vez que é composta de esporopolenina, também chamada de *algaenan*, que é um biopolímero semelhante à lignina, formado de ácidos graxos hidroxilados e fenólicos (Kwietniewska e Tys, 2014)

Mussnug et al. (2010) em estudos de digestão com diversas espécies de microalgas afirmaram que o grau de degradação da célula é fator crucial para a eficiente conversão de biomassa algal em biogás. Ou seja, espécies com elevado grau de decomposição e baixa quantidade de resíduos indigeríveis (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella salina*, *Arthrospira platensis* e *Euglena gracilis*) mostraram maior produção de biogás em comparação com as espécies com baixo grau de degradação e elevada concentração

de resíduos intactos (*Scenedesmus obliquus* e *Chlorella kessleri*) após o processo de digestão. Os fatores citados como causa da má degradabilidade de determinadas espécies foram a presença e a composição (carboidratos como hemiceluloses e celuloses) da parede celular. Os autores concluem ainda que em termos de eficiência de produção de biogás, as espécies sem parede celular ou com parede celular a base de proteínas devem ser preferidas, uma vez que evitam gastos energéticos com o pré-tratamento da biomassa e com métodos de ruptura das células.

A hidrólise de mono-substratos como celulose cristalina, amido ou proteínas, geralmente não são tidos como problemática para a comunidade bacteriana anaeróbia (Raposo et al., 2011). Os diferentes constituintes da parede celular, no entanto, se interligam de forma cruzada em complexas ligações que formam camadas discretas ao redor das células e pouco é conhecido sobre processos de remodelação em resposta aos sinais fisiológicos e ambientais (Domozych et al., 2012; Popper et al., 2011; Popper et al., 2014). Essa rede dinâmica, consistindo em glicoproteínas, diversos polissacarídeos e outros polímeros alifáticos extraordinariamente estáveis como a esporopolenina (Mackenzie et al., 2015) e algenano (Kodner et al., 2009; Scholz et al., 2014), pode ser um imensurável obstáculo para a comunidade microbiana anaeróbia (Golueke et al., 1957; Mussnug et al., 2010).

Por outro lado, Klassen et al. (2016) afirmam que apesar de uma visão geral de que os carboidratos complexos são responsáveis pela baixa digestibilidade da biomassa algal, estudos de pré-tratamentos enzimáticos indicam que a hidrólise das proteínas presentes na parede celular representa outro gargalo igualmente importante a ser superado no processo de DA. González-Fernández et al. (2015) também afirmam a mesma importância a partir de resultados com pré-tratamentos enzimáticos.

Prévia extração de lipídeos

O cultivo de microalgas para fins energéticos geralmente é realizado com o intuito principal de produção de biodiesel. Porém, para garantir a viabilidade econômica da cadeia produtiva, a biomassa residual após a extração de lipídeos deve ser reaproveitada para a geração de subprodutos que agreguem valor ao produto final (Sialve et al., 2009). Porém, Yang et al. (2010) afirmam que em estudos recentes foi difícil converter diretamente a biomassa residual em hidrogênio por digestão anaeróbia, principalmente devido ao complexo processo de extração aos quais as células foram submetidas anteriormente, que torna a biomassa resistente à biodegradação. Os processos de extração

incluem desidratação, destruição da parede celular e uso de solventes, ou seja, etapas agressivas que influenciam na qualidade da biomassa para digestão.

Estudo visando a produção de metano a partir de biomassa residual após a produção de biodiesel, realizado por Ehimen et al. (2009), demonstrou que o tipo de extração lipídica a base de solventes pode inibir a produção de metano. Segundo esses autores, o uso de clorofórmio e metanol como solventes pode resultar em uma redução na produção de biogás, se comparado ao uso do butanol e da catálise ácida. Thiel (1969) também demonstrou que a adição de clorofórmio ao substrato da digestão resultou em 50% de inibição da metanogênese, por causar efeito tóxico direto nas *arqueas* metanogênicas.

A remoção de qualquer traço dos solventes antes da digestão da biomassa deve ser considerada, porém essa remoção pode causar redução do poder energético da biomassa, uma vez que a lavagem da biomassa pode retirar moléculas polares energeticamente ricas do substrato algal (Ehimen et al., 2009).

5.3.4. Melhoria da digestão anaeróbia de biomassa algal

Pré-tratamento da biomassa algal

Segundo Sialve et al. (2009), o pré-tratamento do substrato permite melhoria significativa na sua biodegradabilidade, uma vez que age nas suas propriedades físico-químicas. Essa etapa torna a matéria orgânica mais acessível para a microbiota, tornando-a de mais fácil degradação.

Um fator importante na escolha de um método pode ser considerado como sua eficiência econômica, na qual o balanço energético deve ser positivo para o processo se tornar lucrativo (Torres et al., 2013; Rodriguez et al., 2015). Deve-se atentar para o fato de que alguns métodos aumentam a solubilidade da matéria orgânica, mas não aumentam sua biodegradabilidade (Torres et al., 2013), formando provalmente compostos recalcitrantes na fase de hidrólise que não são convertidos em rendimento de biogás. A efetividade de métodos de pré-tratamentos na produção de biogás depende das características da microalga, por exemplo, a tenacidade e estrutura da parede celular e a composição macromolecular das células (Passos et al., 2014a).

Os métodos podem ser divididos em quatro categorias: térmico, mecânico, químico e biológico. O pré-tratamento mecânico que inclui o uso de homogeneizadores, ultrassom

e micro-ondas, aumenta a disponibilidade da matéria orgânica (Angelidaki e Ahring, 2000) e são os menos dependentes de características intrínsecas de cada espécie. No entanto, são os que requerem mais energia, se comparados com os demais. Métodos químicos, por sua vez, irão aumentar a disponibilidade de compostos resistentes à hidrólise anaeróbia devido ao aprimoramento da degradação (Bonmati et al., 2001) e quando associados com calor são particularmente eficientes. No entanto, a adição de químicos pode comprometer a composição da biomassa para usos futuros. Segundo Rodriguez et al. (2015), o pré-tratamento térmico, que inclui o uso de ultrassom por exemplo, é o mais eficiente para as microalgas, com incrementos de até 81% no rendimento de metano e baixo requerimento de energia. Atualmente, os tratamentos térmicos, mecânicos e termoquímicos estão entre os métodos mais utilizados para melhorar o desempenho da DA de microalgas (Passos et al., 2014a).

Chen e Oswald (1998) concluíram que o tratamento térmico da biomassa algal induziu a um incremento de 33% na produção de metano. Park et al. (2009) também demonstraram que pré-tratamentos mecânicos e térmicos levaram a uma melhoria na taxa de solubilização do substrato e no consequente aumento na produção de hidrogênio a partir de biomassa de microalga marinha.

Métodos biológicos também são atualmente empregados para pré-tratar biomassa algal. Nesses métodos, a parede celular é enzimaticamente degradada, consistindo na conversão de moléculas de difícil biodegradabilidade em substratos mais usuais para os microrganismos anaeróbios e atuando principalmente na melhoria da hidrólise da biomassa algal. Portanto, se faz de grande importância o prévio conhecimento da composição da parede celular para a adequada seleção das enzimas a serem utilizadas (Passos et al., 2016). Alguns resultados promissores foram demonstrados em termos de solubilização de biomassa e aumento da produção de biogás após o tratamento enzimático de culturas puras de microalgas (Ometto et al., 2014; Wieczorek et al., 2014).

Se por um lado a prévia extração de lipídeos pode representar um fator negativo para digestão anaeróbia como discutido anteriormente, por outro, estudos mostram que essa etapa pode ser considerada como um pré-tratamento. O processo de liberação de lipídeos utilizando solventes aumenta a biodisponibilidade do conteúdo intracelular das microalgas, conseqüentemente maiores produtividades iniciais de metano podem ser obtidas se comparados à biomassa algal que ainda não sofreu processo de extração. A

produção de biogás e metano, respectivamente, utilizando biomassa de *Scenedesmus* sp. foi de 0,177 m³ biogás/ kgSTV e 0,140 m³ CH₄/ kgSTV. Comparando tais valores com os dados obtidos da DA do resíduo da biomassa da mesma espécie, após a extração de lipídeos, resultados de 0,401 m³ biogás/ kgSTV e 0,272 m³ CH₄/ kgSTV foram obtidos, evidenciando a eficácia da utilização da extração de lipídeos como pré-tratamento (Alzate et al., 2014).

A literatura de pré-tratamentos de biomassa algal para produção de biogás ainda é limitada e geralmente contraditória. Dessa maneira, apesar das desvantagens intrínsecas de cada método, esforços em pesquisas e estudos são necessários para superá-las e para atingir métodos mais eficientes na ampliação de escala e uso industrial (Rodriguez et al., 2015).

Co-digestão

A co-digestão é um tratamento, no qual vários substratos são misturados e tratados em conjunto. Essa associação é uma estratégia para aumentar o desempenho da digestão, pois garante uma composição ótima do substrato através da adição de um segundo substrato fonte do nutriente limitante. Os principais benefícios advindos da co-digestão são a diluição de compostos tóxicos, aumento da carga orgânica biodegradável, suavização do desequilíbrio de nutrientes, ajuste da relação C/N, prevenção de inibições, efeito sinérgico de microrganismos, maior facilidade de manuseio do substrato misto, vantagens econômicas devido ao compartilhamento de equipamentos e maior rendimento de biogás (Ward et al., 2008; Sialve et al., 2009; Khalid et al., 2011; Park e Li, 2012; Zhong et al., 2012). A manutenção de um bom equilíbrio de nutrientes no interior do reator, não só garante uma melhoria na produção de biogás, como também permite o aumento de taxas de aplicação, contribuindo para a viabilidade econômica do processo (Park e Li, 2012).

Como já discutido, devido a elevadas concentrações de proteínas, as microalgas podem apresentar baixa relação C/N, o que pode comprometer o desempenho da DA. Nesse caso, de acordo com Brennan e Owende (2010), a solução pode ser a co-digestão com produtos que possuem elevada relação C/N. Yen e Brune (2007) obtiveram significativo incremento na produção de metano através da adição de resíduos de papel à biomassa algal. Os autores conseguiram praticamente dobrar a produção de metano com a co-digestão mencionada, em uma razão de 1/1 entre resíduo de papel e biomassa algal, aumentando a relação C/N de 6,7 para 18. Ehinem et al. (2009), aumentando a proporção

de substrato carbono/nitrogênio para 12,44 através da co-digestão os resíduos de microalgas com glicerol, observaram um aumento de produção de metano em mais de 50%, comparando-se com a produção de metano quando os resíduos foram digeridos individualmente (Ehimen et al., 2011).

Wang et al. (2013) conduziram processos de co-digestão de *Chlorella* sp. conjuntamente com resíduos de lodo ativado. O resultado foi um incremento de cerca de 76% na produção do biogás. A digestão de *Chlorella* sp. individualmente foi de 0,262 m³/kg STV, enquanto que para a co-digestão nas proporções de 4%, 11% e 41% de biomassa algal na mistura, os resultados foram de 0,463, 0,453 e 0,468 m³/kg STV, respectivamente. Ou seja, a co-digestão quase dobrou o rendimento de biogás.

5.4. Digestão anaeróbia de biomassa algal cultivada em efluentes

Especificamente para a produção de biogás a partir de biomassa produzida em efluentes, Passos et al. (2014b), utilizando biomassa oriunda de consórcio de espécies, com maior abundância dos gêneros *Scenedesmus* e *Chlorella*, obtiveram o rendimento de 0,172 m³ CH₄/kg STV, operando à temperatura ambiente. Ainda com a utilização de LAT e esgoto doméstico como meio de cultivo, Passos et al. (2013) reportaram o rendimento de 0,148 m³ CH₄/kg STV para o consórcio constituído por *Monoraphidium*, *Stigeoclonium*, *Nitzschia* e *Amphora*, em testes anaeróbios à temperatura ambiente. Kinnunen et al. (2014) operando reatores anaeróbios a 37°C para digestão de biomassa composta por *Pediastrum*, *Micractinium* e *Scenedesmus* produzida em LAT com esgoto doméstico após decantador primário mencionaram rendimentos de 0,225 e 0,179 m³ CH₄/kg STV para um reator de mistura contínua e outro reator de acúmulo de volume sem mistura, respectivamente.

Apesar da limitação de estudos com aproveitamento da biomassa algal produzida em efluentes para a digestão anaeróbia, observa-se pela literatura supracitada que os rendimentos de biogás para biomassa cultivada em esgoto doméstico sem qualquer tratamento ou co-digestão se concentram no limite inferior do intervalo proposto por González-Fernández et al. (2011). Segundo os autores, a produção específica de metano a partir de biomassa algal varia entre 0,1-0,5 m³ CH₄/kg STV, com um teor de 60-80% de metano no biogás, dependendo da temperatura de processo (15-52° C) e do tempo de detenção hidráulica (3-64 dias). Esse intervalo de rendimento está compatível com a produção de biogás a partir de outros substratos. Por exemplo, a produção específica de

metano utilizando lodo residual de unidades de lodos ativados, outro subproduto do tratamento de esgotos, varia entre 0,15-0,3 m³ CH₄/kg STV (Passos et al., 2013) e de resíduos de culturas agrícolas lignocelulósicas, tais como milho, trigo, arroz e resíduos de cana-de-açúcar, entre 0,28 e 0,34 m³ CH₄/kg STV (Chandra et al., 2012). Ao se utilizar efluentes mais ricos em carga orgânica, o rendimento da DA a partir de biomassa algal se eleva, conforme pode ser observado em Assemany et al. (2016). Os autores ao digerir biomassa algal produzida em fotobiorreatores coluna de bolhas durante o tratamento de efluentes da indústria de processamento de carne, obtiveram rendimentos de 0,44 e 0,28 m³ CH₄/kg STV, para efluentes primário e secundário, respectivamente.

Como já mencionado no item 5.2.2, a variabilidade de rendimentos na DA obtida na literatura, pode ser justificada pela composição da biomassa e os diferentes graus de rigidez das paredes celulares das diferentes espécies (González-Fernández et al., 2015). É sabido que microalgas respondem às alterações das condições ambientais durante seu crescimento (Valenzuela-Espinoza et al., 2002; Scragg et al., 2002). Esse comportamento pode ser visto como um atributo biotecnológico que pode ser manipulado com o objetivo de controlar a composição bioquímica e o crescimento das algas, focando em compostos específicos e elevadas produtividades. Chia et al. (2013) em estudo sobre a composição de *Chlorella vulgaris* em diferentes meios de cultivo, observaram que concentrações de proteínas e carboidratos na biomassa algal se relacionaram intimamente com componentes do meio de cultivo, como nitrato, fosfato e íons livre de cobre. Em relação à produção lipídica, nem todas as classes de lipídeos foram afetadas pelo meio de cultivo utilizado. Lipídeos estruturais dominaram a composição percentual de lipídeos na biomassa de *C. vulgaris* independentemente do meio de cultivo testado. Para Trivedi et al. (2015), a composição da biomassa algal é altamente depende da espécie e das condições promovidas durante seu crescimento. Fato que pode ser explicado pela flexibilidade estequiométrica das algas, o que permite que as concentrações de nitrogênio e fósforo nas suas células sejam proporcionais à razão N/P do meio de cultivo (Woertz et al., 2009).

Assim, o rendimento varia com os parâmetros definidos durante os diferentes estágios de produção. Uma escolha inteligente das condições de cultivo deve ser realizada levando em consideração os tipos de produtos que se deseja obter.

Passos et al. (2013) ao produzir *Chlorella e Scenedesmus* em LAT com esgoto doméstico, obtiveram como composição da biomassa 49% proteínas, 17% lipídeos, 20%

carboidratos; ou seja, pouca diferença se comparada a composição de culturas puras de *Scenedesmus obliquus* (composta de 50-56% proteínas, 12-14% lipídeos, 10-17% carboidratos). Para os autores, a principal diferença da composição macromolecular da biomassa entre cultivos puros e em efluentes é a menor quantidade de lipídeos no cultivo em efluentes, devido a condições menos controladas e devido à aplicação de técnicas como deficiência de luz e nutrientes em cultivos puros. Composição também semelhante foi obtida por Kinnunen et al. (2014) em estudo com biomassa produzida em LAT alimentada com esgoto doméstico após decantador primário. Os gêneros identificados como abundantes nessa biomassa foram *Pediastrum* sp., *Micractinium* sp. e *Scenedesmus* sp. e sua composição macromolecular foi de 41% proteínas, 12% lipídeos, 18% carboidratos e 29% cinzas.

Dessa forma, a composição do efluente utilizado como meio de cultivo muito pode dizer sobre a composição macromolecular da biomassa produzida e conseqüentemente sobre o rendimento a ser obtido na digestão anaeróbia. Acredita-se, portanto, que a problemática de excesso de proteína da biomassa algal, levando a uma desbalanceada relação C/N e a uma possível inibição pela liberação de amônia, pode ser suavizada com a escolha de um efluente mais rico em carboidratos (matéria orgânica carbonácea), em detrimento ao conteúdo de proteínas. A depleção de nutrientes, especialmente de nitrogênio, durante o cultivo pode ser uma solução eficiente para reduzir a recalcitrância no processo anaeróbio (Klassen et al., 2015). Além de tornar a biomassa algal mais acessível para o ataque bacteriano, a limitação de nutrientes também aumenta a relação C/N da biomassa (Klassen et al., 2015; Markou et al., 2013). Esse aspecto é de especial relevância quando o processo contínuo é considerado, devido à combinação dos parâmetros TDH e carga orgânica volumétrica (COV) e da baixa relação C/N do mono-substrato biomassa algal, obtida do cultivo em meios ricos em nitrogênio.

Frigon et al. (2013) observaram que a composição do meio de cultivo pode ter um impacto muito maior na produção de metano do que características específicas da biomassa entre espécies. Pouca variação da produção de metano entre espécies cultivadas no mesmo meio de cultivo foi observada. No entanto, a espécie *Scenedesmus* sp. AMDD quando cultivada em meio Bold's 3N apresentou produção de 0,306 m³ CH₄/kg STV (Frigon et al., 2013) e quando cultivada em esgoto doméstico secundário, a produção foi de 0,340 m³ CH₄/kg STV (McGinn et al., 2012) e de 0,410 m³ CH₄/kg STV também com o cultivo

em águas residuais (Frigon et al., 2013). Segundo os autores, fatores como o meio de cultivo e condições de crescimento podem ter um impacto significativo na produção de metano. Rendimentos de metano a partir de digestões de espécies de algas cultivadas no mesmo meio são geralmente menos variáveis do que quando cultivadas em meios diferentes (Klassen et al., 2016).

Em relação à problemática da difícil degradabilidade da biomassa algal, quando trabalhando com biomassa algal cultivada em lagoas abertas destinadas ao tratamento de águas residuárias, uma comunidade mista de microalgas e bactérias é formada. Essa comunidade varia em termos de dinâmica populacional, composição da comunidade fitoplanctônica e estrutura da parede celular, geralmente formada por uma rígida parede celular, devido às condições do sistema e a presença de predadores e do elevado conteúdo orgânico da maioria dos efluentes, como os efluentes domésticos (Park et al., 2011; Passos et al., 2015).

Alternativamente aos pré-tratamentos, a colheita do substrato em estágio tardio parece melhorar a digestibilidade da biomassa algal (Grimm et al., 2015; Klassen et al., 2015) e pode ser uma alternativa para evitar a aplicação de métodos de pré-tratamentos custosos. Klassen et al. (2015) demonstraram que até espécies de parede celular notoriamente recalcitrante, como é o caso da espécie *Scenedesmus obliquus*, foram satisfatoriamente bem digeridas quando colhidas em estágios tardios de cultivo, devido à parede celular já se encontrar enfraquecida. Ainda para esse estudo, rendimentos de 0,219-0,290 m³ CH₄/kg STV obtidos durante a fase log inicial de cultivo foram elevados para 0,401-0,478 m³ CH₄/kg STV quando espécies de *Parachlorella kessleri*, *Scenedesmus obliquus* e *Chlamydomonas reinhardtii* foram colhidas durante a fase estacionária. Em se tratando de cultivo em efluentes, essa estratégia pode se tornar interessante, uma vez que reduz os custos se comparados com a aplicação de pré-tratamentos. No entanto, considerando a produção contínua, a colheita em estágios tardios de crescimento algal significa a adoção de longos tempos de detenção na operação dos reatores de produção de biomassa, o que acarreta em um maior requerimento de área, no caso das LATs e consumo exagerado de energia no caso dos fotobiorreatores. Portanto, um balanço entre vantagens e desvantagens deve ser levado em consideração, de forma a se chegar a um ponto ótimo na eficiência de rendimento de metano, produtividade de biomassa e gastos de implantação e operação dos reatores.

5.5. Biorefinaria baseada na digestão anaeróbia

O conceito de biorrefinaria foi identificado como a opção mais promissora para criação de uma indústria baseada em biomassa. O principal objetivo é de transformar biomassa em biocombustíveis e produtos de alto valor agregado (Trivedi et al., 2015). O conceito é similar ao aplicado para as refinarias de petróleo, nas quais múltiplos combustíveis e químicos são derivados usando o óleo bruto como matéria prima. Semelhantemente, biorrefinaria é um processamento sustentável da biomassa para obtenção de energia, biocombustíveis e produtos de alto valor agregado, através de processos e equipamentos para transformação da biomassa (González-Delgado e Kafarov, 2011). O objetivo principal de uma biorrefinaria é de integrar a produção de químicos com produtos de elevado valor agregado e *commodities*, assim como bioenergia na forma de eletricidade e/ou calor, biocombustíveis sólidos, líquidos como o biodiesel e o bioetanol e gasoso como o biogás, e otimizar o uso de recursos, maximizar o lucro e minimizar resíduos. Outros produtos são alimentos, ração animal, fertilizantes e bioprodutos (os chamados *bio-based products*), que são a versão *bio* de muitos produtos de consumo ou materiais de origem fóssil como bioplásticos, biopinturas, bioadesivos, biolubrificantes, dentre outros. Também se obtém produtos denominados de bioquímicos que se vendem como *commodities* químicas a outras indústrias ou se empregam internamente como insumo químico (os *building blocks*) para serem transformados em bioprodutos. Os produtos finais das biorrefinarias podem substituir produtos já existentes no mercado, geralmente de origem fóssil, ou tornar-se novos, incorporando funcionalidades diferentes ou melhoradas (Pascual et al., 2015).

O conceito de biorrefinaria tem associado a obtenção de produtos com elevado grau de sustentabilidade ambiental e sócio-econômica. Assim, é imprescindível garantir uma adequada eco-eficiência na própria planta transformadora, assim como soluções que integrem toda a cadeia de valor. Segundo Trivedi et al. (2015), uma nova abordagem de biorrefinaria compreende o contexto integrado entre indústria e meio ambiente, melhorando o aproveitamento dos recursos e minimizando a pegada ecológica de todo o sistema.

Destacam-se quatro tipos principais de biorrefinarias:

- 1) Biorrefinaria baseada na gaseificação
- 2) Biorrefinaria baseada na pirólise

- 3) Biorrefinaria baseada na liquefação hidrotérmica
- 4) Biorrefinaria baseada na fermentação/digestão anaeróbia

A DA está destinada a converter-se em uma tecnologia de grande importância para o desenvolvimento de futuras biorrefinarias. O processo já é empregado como tecnologia auxiliar para valorizar correntes residuais, no entanto, deve-se potencializar seu uso como tecnologia principal. Segundo Pascual et al. (2015), o desafio é repensar as plantas de biogás atuais, ampliando sua gama de produtos finais, indo muito mais além do que a venda de eletricidade.

Para se conseguir essa ampla gama de produtos, as biorrefinarias integram em uma mesma instalação distintos processos que podem ser físicos, químicos, termo-químicos ou biotecnológicos. Os produtos intermediários que são gerados após as transformações primárias da biomassa, se denominam de plataformas, a partir das quais se aplicam processos de transformações ou processos secundários de refino até alcançar os produtos finais. Existem muitos tipos de biomassa e combinações possíveis entre plataformas e produtos finais, sendo a flexibilidade de uma biorrefinaria uma característica chave para poder incorporar novos processos em instalações existentes (Pascual et al., 2015). A seguir são apresentadas as principais plataformas de produção de uma biorrefinaria que possui a DA como processo principal de transformação da biomassa.

5.5.1. Plataforma de ácidos orgânicos voláteis (AOVs)

Os AOVs são compostos intermediários da DA que se recuperados tem valor como *commodities* líquidas. Pode-se produzir uma corrente líquida em AOVs através da otimização das fases iniciais da DA (hidrólise e acidogênese). O processo de recuperação é chave para a viabilidade dessa alternativa. Geralmente, segundo Pascual et al. (2015), para eliminação das partículas, o processo de filtração ou centrifugação é aplicado e a continuação cabe empregar diversas técnicas como por exemplo, precipitação com reativos químicos, destilação, adsorção, membranas de nanofiltração e osmose reversa, eletrodialise ou extrações com solventes, dentre outras.

Bioplásticos

Os AOVs são matéria prima ideal para a produção de polihidroxialcanoatos (PHAs), ou bioplásticos. Os PHAs se acumulam como reserva de carbono na forma de grânulos dentro do citoplasma bacteriano e podem ser extraídos para a produção de bioplásticos.

O processo de obtenção de PHAs a partir de cultivos mistos é realizado em reatores aeróbios e se baseia na acumulação dos PHAs mediante duas etapas de processo: etapa de enriquecimento e etapa de acumulação (Pascual et al., 2015). A produção em escala industrial utiliza substratos puros como glicose, frutose, sacarose e ácido propiônico, de forma que encarecem muito o processo. Assim, uma maneira de reduzir seu custo de produção é empregando fontes de carbono mais econômicas como os resíduos orgânicos tipicamente valorizados mediante DA e cultivos mistos.

Ácidos graxos de cadeia média (AGCM)

Os AOVs podem ser transformados em AGCM para serem aproveitados em cadeias mais amplas que tem aplicações de maior valor agregado que os AOVs, como biopinturas, bioplásticos e biolubrificantes. Os AGCM são ácidos monocarboxílicos saturados lineares com 6-8 carbonos que se diferenciam dos AOVs mais curtos. Podem ser obtidos a partir dos AOVs na presença de etanol e *Clostridium kluyveri* em um processo conhecido como β -oxidação inversa ou alongação de cadeia. O ácido n-capróico é um AGCM que pode ser facilmente convertido em bio-carburante líquido com elevada capacidade energética, o que lhe confere um elevado valor econômico. Também possui outros usos como alimentação animal, antimicrobiano ou como substrato para esterificação na alimentação humana.

Bio-álcoois

Os AOVs podem ser recuperados mediante precipitação química e cristalização em forma de sais de carboxilatos. A partir desses sais e mediante um processo termoquímico é possível produzir biocombustíveis líquidos (bioálcoois) com um valor econômico muito maior que o metano.

5.5.2. Plataforma de biogás

Após processos de purificação e enriquecimento, pode-se obter bio-metano para uso em veículos ou injeção em redes de gás. Outras técnicas de recuperação do metano do biogás permitem separar também o CO₂ para distintos usos industriais, como por exemplo indústrias de refrigerantes ou plantas de produção de microalgas. Por fim, o metano pode

ser utilizado como reagente em processos catalíticos que tem como objetivo a obtenção de compostos bioquímicos como o metanol.

5.5.3. Plataforma de digeridos

O digestato proveniente da digestão anaeróbia é um efluente líquido rico em nutrientes, como nitrogênio, além de conter ainda quantidades de matéria orgânica. Assim, segundo Uggetti et al. (2014), o uso ideal para o digestato seria como fertilizante. A separação entre as fases sólidas e líquidas é adequado para uma ótima exploração dos diferentes componentes. Opções para extração de nutrientes a partir do digestato para a produção de fertilizantes são *stripping* de amônia para produção de sulfato de amônia e precipitação de fósforo através da formação de estruvita. O digestato é caracterizado por uma baixa concentração de matéria orgânica e fósforo, contra-balanceado por elevado teor de potássio e nitrogênio (80% na forma de amônia). Outra opção de aproveitamento do digestato é seu uso como meio de cultivo de biomassa algal.

5.6. Papel da digestão anaeróbia em uma biorrefinaria de microalgas cultivadas em efluentes

No passado, em função do custo relativamente baixo e estável dos combustíveis fósseis e da eletricidade, a utilização, recuperação e gerenciamento de energia não eram priorizados no projeto e na operação das instalações de gerenciamento de efluentes. Com o aumento dos custos da energia, das incertezas sobre as fontes futuras de combustíveis fósseis e da atenção em relação aos impactos ambientais associados às emissões atmosféricas, o gerenciamento eficiente de energia passou a ser um tema de grande relevância tanto no setor público como no privado. Assim, com o reconhecimento da importância da energia na operação das ETEs, as oportunidades para se recuperar e utilizar energia de diversas fontes dentro das próprias estações são questões chave (MetCalf e Eddy, 2013).

As principais motivações para um melhor gerenciamento na utilização de energia nas ETEs são: i) potencial para redução de custos, incluindo a possibilidade de se tornar um fornecedor de energia; ii) potencial para melhorar a confiabilidade no fornecimento de energia; iii) questões associadas à sustentabilidade, incluindo as metas de redução da poluição impostas pelas agências locais, estaduais e federais (MetCalf e Eddy, 2013). Tornar-se autossustentável na produção e na utilização de energia pode melhorar de maneira significativa a rentabilidade da ETE. Contudo, as eficiências inerentes aos

processos de recuperação de energia ainda apresentam desafios relevantes. Por exemplo, a utilização da DA e a combustão do biogás possibilitam a obtenção de menos de um terço da demanda típica de uma estação de lodos ativados convencional (MetCalf e Eddy, 2013).

Microalgas são consideradas a matéria prima para o estabelecimento de uma biorrefinaria, devido ao seu potencial de produzir múltiplos produtos. A integração da biorrefinaria de microalgas com outros setores industriais, inclusive inserida em uma estação de tratamento de águas residuárias, pode ser uma estratégia para ampliar a gama de produtos, o aproveitamento de resíduos e principalmente a recuperação de nutrientes. Além disso, custos de produção de biomassa algal são reduzidos quando CO₂, nutrientes e água são obtidos a custos reduzidos ou mesmo nulos.

O objetivo da biorrefinaria de microalgas é produzir múltiplos produtos e maximizar o valor derivado de diferentes componentes microalgais. O conceito da biorrefinaria de microalga envolve a integração de diferentes sistemas e tecnologias de engenharia, que são operados para converter biomassa em múltiplos produtos que podem melhorar o desenvolvimento futuro e a sustentabilidade do setor (Uggetti et al., 2014). Produtos de baixo valor agregado como biocombustíveis (biodiesel, bioetanol e biogás) juntamente com produtos de maior valor agregado como fármacos e cosméticos podem ser co-produzidos, sendo que a viabilidade econômica vai ser dada pelos produtos de maior valor agregado. O mercado para biocombustíveis é grande, no entanto o valor econômico é baixo. Por outro lado, o mercado é mais restrito para outros produtos derivados de microalgas (fármacos, químicos finos, alimentação), mas o preço de mercado é alto. O *gap* entre o preço dos combustíveis fósseis e dos biocombustíveis ainda precisa ser diminuído ou até superado, de forma que atualmente a produção de microalgas para biocombustíveis não é viável comercialmente (Zhu, 2015).

A inserção das algas no contexto ambiental, integrando sua produção com o tratamento de efluentes, além de reduzir custos da produção, agrega valor ao produto final, encurtando o caminho para a sustentabilidade do processo produtivo. Contudo, quando se trata do cultivo de microalgas em efluentes, a produção de fármacos, suplementos alimentares e cosméticos a partir da biomassa algal não acontece. As opções de outros produtos, além dos biocombustíveis, permeiam principalmente a aplicação para fins agrícolas e agropecuários. Dessa forma, além de análises de mercadabilidade dos

produtos, índices podem ser utilizados para se estimar a viabilidade dessa biorefinaria, seja no aspecto energético – relação de energia líquida (NER), seja no contexto econômico – avaliação custo-benefício e ainda no contexto ambiental, através da análise de ciclo de vida. O aspecto econômico ainda é um desafio, porém ao se encarar a produção como uma necessidade básica de prover saneamento básico à população, os custos ficam restritos à valorização da biomassa produzida e, portanto, produtos evitados como água e fertilizantes ajudam a melhorar o cenário econômico de toda a biorrefinaria.

A biomassa algal produzida em efluentes possui algumas características peculiares, o que torna seu aproveitamento um pouco mais diferenciado do que o da biomassa axênica cultivada em meio de cultivo sintético. Dentre essas características, destacam-se: i) comunidade fitoplanctônica é composta de um consórcio de várias espécies, além da biomassa conter outros organismos como bactérias, vírus, fungos, protozoários e helmintos; e, ii) baixo conteúdo lipídico. Adicionalmente, como forma de se buscar a viabilidade econômica da biorrefinaria, já que o meio de cultivo não permite a produção de compostos mais valorados economicamente, a minimização dos custos se faz necessária, tanto na colheita, quanto no processamento dessa biomassa. Segundo Trivedi et al. (2015), o principal gargalo de uma biorrefinaria, em especial de uma baseada em microalgas, é a separação das diferentes frações sem danificar uma ou mais frações de outros produtos. Há uma necessidade de tecnologias de separação que sejam brandas, baratas e com baixo consumo de energia para superar essas limitações.

Diante das opções possíveis de uma refinaria, dentre os destacados no item 5.4, os processos de DA e liquefação hidrotérmica são os únicos em que não há a necessidade de secagem da biomassa. A liquefação, no entanto, é um processo de tecnologia sofisticada, com elevado gasto energético associado, além de complexa operação. Nesse contexto, a DA pode ser encarada como uma das principais rotas de conversão e aproveitamento energético da biomassa algal produzida em efluentes. Recentemente, diferentes aplicações da DA de microalgas foram integradas no conceito de biorefinaria, mudando o papel da DA de unidade tratadora de resíduos para unidade de conversão de matéria orgânica (Uggetti et al., 2014).

A Figura 5.3 apresenta uma proposta de integração do cultivo de microalgas com o tratamento de efluentes, no contexto de uma biorrefinaria baseada na DA.

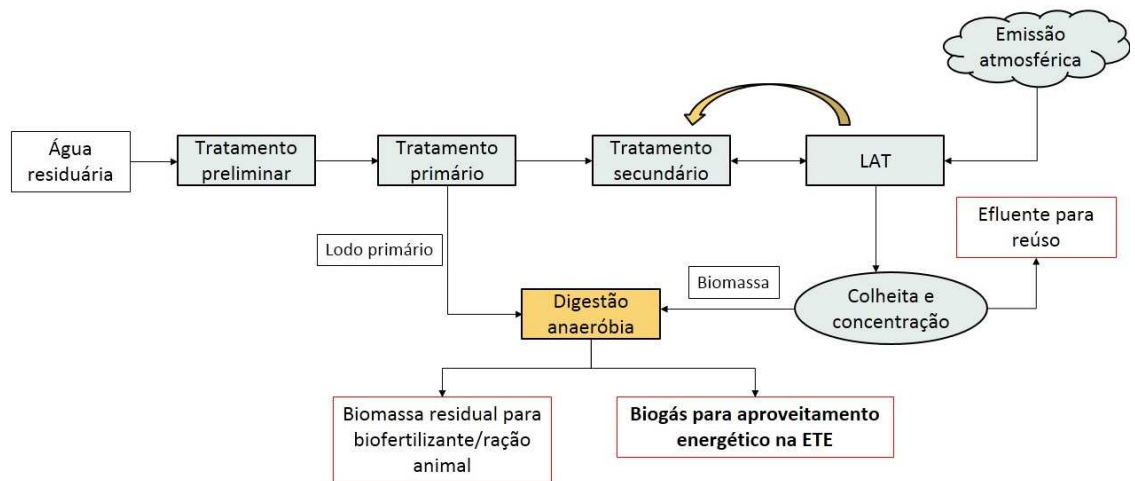


Figura 5.3 – Digestão anaeróbia como principal processo de uma biorrefinaria de microalgas inserida em uma estação de tratamento de efluentes.

Na Figura 5.3 observa-se que a LAT é facilmente inserida em uma ETE, pois garante o polimento do efluente com recuperação e não remoção de nutrientes, através do controle de pH pela adição de CO₂ oriundo, por exemplo de emissões atmosféricas próximas à estação. É também um reator de fácil operação e reduzido custo de implantação. Dependendo das suas características de operação e das características do afluente a ser tratado, a LAT pode ser utilizada como unidade de tratamento secundário. A desinfecção do efluente tratado para fins de reúso, no entanto, é usualmente requerida.

O biogás produzido no reator anaeróbio pode ser utilizado na própria ETE, como por exemplo para suprir energia necessária para a rotação da pá da LAT ou para o funcionamento do sistema de injeção de CO₂. A Figura 5.4 apresenta as etapas de aproveitamento do biogás produzido, que pode ser tanto na forma de calor como de energia elétrica, caso se utilize um motor ou turbina com ciclo de recuperação do calor dos gases de exaustão.



Figura 5.4 – Etapas de aproveitamento do biogás oriundo da digestão anaeróbia de biomassa algal produzida durante o tratamento de efluentes. Fonte: Adaptado de Metcalf e Eddy (2013).

O calor produzido pode ser utilizado nos sanitários para aquecimento de água de chuveiros ou de torneiras. Em geral, o rendimento do metano a partir da digestão anaeróbia, impacta positivamente a razão líquida de energia, contribuindo com 33% do total da produção de energia.

O digestato ou a fase sólida após separação são ideais para uso como fertilizante, pois são ricos em nutrientes. A separação entre as fases sólidas e líquidas deve ser adequada para se obter uma ótima exploração dos diferentes componentes. As opções para extração de nutrientes a partir do digestato para a produção de fertilizantes são o *stripping* de amônia para produção de sulfato de amônia e precipitação de fósforo através da formação de estruvita. Outra opção de aproveitamento do digestato é seu uso como meio de cultivo de biomassa algal. A principal limitação dessa alternativa é o elevado conteúdo de amônia que quando na forma de amônia livre é tóxica para as algas, sendo responsável pela inibição no crescimento algal. Outra possível causa de limitação é a elevada concentração de sólidos suspensos no digestato, o que pode comprometer a disponibilidade de luz para as algas (Uggetti et al., 2014).

Razon (2012) propôs um processo no qual sulfato de amônia do digestato através de *stripping*, foi convertido em amônia na forma sólida. Assim, ela foi facilmente separada e processada em cristais para posteriormente ser usada como fertilizante, enquanto que a fase líquida (70%) pôde ser usada na agricultura ou retornada para o cultivo algal. De Schamphelaire e Verstraete (2009) com objetivos similares propuseram um sistema de ciclo fechado, integrando unidade de produção de biomassa algal com uma unidade de DA para converter a biomassa em biogás e uma célula microbiana de combustível com o objetivo de tratar o digestato e produzir energia elétrica. De forma a fechar o ciclo,

nutrientes do digestor poderão ser retornados para a unidade de crescimento das algas. Van der Há et al. (2012) investigaram a seleção de *arqueas* metanogênicas para produção de polihidroxibutirato (PHB), um tipo de poliéster. Nesse estudo, o biogás foi utilizado como um alimento para as microalgas, além de estimular as bactérias metanotróficas. Adicionalmente, os pesquisadores descrevem que a cooperação simbiótica entre microalgas e as bactérias metanotróficas levaram à formação de bioflocos com características de melhor sedimentabilidade.

Esses estudos demonstram que é possível desenvolver uma nova e interessante solução para integrar a DA no conceito de biorefinaria. Dessa forma, é recomendável a integração de diferentes processos, de forma a produzir novos produtos rentáveis, maximizando a eficiência geral do processo e por outro lado, reduzindo os custos operacionais e impactos ambientais negativos. Para isso, pesquisas multidisciplinares em sistemas biológicos, desenvolvimentos de espécies, design de sistemas, modelagem e biorefinação são necessários (Uggetti et al., 2014).

Além disso, estudos econômicos disponíveis são baseados em modelos teóricos. A disponibilidade de dados de plantas em escala real certamente ajudaria na obtenção de informações mais confiáveis sobre a viabilidade econômica de uma biorrefinaria de microalgas. A maioria dos resultados são suposições e extrapolações de experimentos laboratoriais e sistemas de pequena escala ao ar livre. Collet et al. (2011) relataram que o consumo de eletricidade é a principal fonte de impactos e sugerem que a melhoria da eficiência do processo de DA em condições controladas pode ser uma possível solução para a diminuição do consumo.

Segundo Uggetti et al. (2014), apesar dos recentes avanços no campo da produção de biogás a partir de microalgas, um ótimo cenário combinando fácil cultivo, elevada produtividade de biomassa e elevada biodegradabilidade anaeróbia deve ainda ser determinada. A eficiência da DA pode ser melhorada através da implementação de processos inovadores de pré-tratamento e co-digestão, bem como estratégias de operação e de configurações de reatores. Apesar da biomassa algal não necessitar ser seca para a DA, a concentração de água após a colheita precisa ser reduzida. Assim, pode-se elencar como outro gargalo, o processo de colheita, que é uma etapa crucial para a produção a preços reduzidos com baixo requerimento de energia. Além disso, o benefício do processo fechado de biorefinaria de microalgas requer a extensão do limite atual do conhecimento

sobre a DA da biomassa residual. Outro importante aspecto que requer atenção é a qualidade do digestato e suas propriedades para o crescimento de microalgas e/ou seu uso como fertilizante.

5.7. Considerações finais

A DA se apresenta como uma opção atraente para a valorização energética de biomassa algal. No entanto, algumas limitações ainda precisam ser superadas de forma a melhorar a eficiência do processo. A difícil degradabilidade da parede celular e o elevado conteúdo de nitrogênio das células algais são as principais barreiras para a difusão do processo.

O cultivo em efluentes pode ser uma estratégia para se obter uma composição macromolecular mais balanceada da biomassa algal e evitar a toxicidade pela liberação de amônia durante o processo de digestão anaeróbia. Efluentes com características mais favoráveis, nomeadamente baixo conteúdo de nitrogênio e elevado conteúdo de matéria orgânica carbonácea, podem ser opções para melhorar o rendimento do processo. Em se tratando da difícil degradabilidade da parede celular, microalgas cultivadas em efluentes tendem a apresentar uma parede celular mais rígida devido às condições adversas de cultivo. Portanto, a eficiência da DA pode ser melhorada através da implementação de processos inovadores de pré-tratamento e co-digestão, bem como estratégias de operação e de configurações de reatores.

O cultivo de microalgas aliado ao tratamento de efluentes, além de baratear a produção de biomassa com a economia de insumos, pode ser encarado como uma opção eficiente para o gerenciamento de energia em uma ETE. A DA assume um importante papel na biorrefinaria de microalgas cultivadas em efluentes, pois supera a etapa crítica de secagem e o baixo conteúdo lipídico da biomassa, além de ser um processo de simples operação. Além da geração de bioenergia, outros potenciais produtos como biofertilizantes, ração para alimentação animal, produtos intermediários como AOVs e AGCM podem ser obtidos. Em um contexto de biorrefinaria, a DA já é empregada como tecnologia auxiliar para valorizar correntes residuais, no entanto, deve-se potencializar seu uso como tecnologia principal.

5.8. Referências bibliográficas

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*, 243, pp 405-410, 2014.

González-Delgado, A.D., Kafarov, V. Microalgae based biorefinery: issues to consider. CT&F—Ciencia, Tecnología y Futuro, 4(4), pp 5–22. 2011.

Angelidaki, I., Ahring, B.K. Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. Applied Microbiological Biotechnology, 38, pp 560-564. 1993.

Angelidaki, I., Ahring, B.K. Methods for increasing the biogas potential from recalcitrant organic matter contained in manure. Water Science and Technology, 41, pp 189-194. 2000.

Assemany, P.P., Calijuri, M.L., Tango, M.D., Couto, E.A. Energy potential of algal biomass cultivated in a photobioreactor using effluent from a meat processing plant. Algal Research, 17, pp 53-60. 2016.

Benemann, J. R. Microalgae Biofuels: A Brief Introduction, © John Benemann, January 1. 2009. Disponível em https://www.adelaide.edu.au/biogas/renewable/biofuels_introduction.pdf. Acessado em 03/03/2016.

Bisalputra, T., Weier, T. The cell wall of *Scenedesmus quadricauda*. American Journal of Botany, 50(10), pp 1011–1019. 1963.

Bonmati, A., Flotats, X., Mateu, L., Campos, E. Study of thermal hydrolysis as a pretreatment to mesophilic anaerobic digestion of pig slurry. Water Science and Technology, 44, pp 109-116. 2001.

Brennan, L., Owende, P. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14, pp 557 – 577. 2010.

Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K., Dunstan, G.A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. Aquaculture, 151, pp 315-331. 1997.

Burczyk, J., Szkawran, H., Zontek, I., Czygan, F.C. Carotenoids in the outer cellwall layer of *Scenedesmus* (*Chlorophyceae*). Planta, 151, pp 247–250. 1981.

Burlew, J. S. Algal culture from laboratory to pilot plant. Washington, D.C.: Carnegie Institute of Washington, Publication 600. 1953.

Chandra, R., Takenchi, H., Haregawa, T. Methane production from lignocellulosic agricultural crop wastes: a review in context to second generation of biofuel production. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 16(3), pp 1462–76. 2012.

Chen, P.H., Oswald, W.J. Thermochemical treatment for algal fermentation. Environmental International, 24, pp 889-897. 1998.

Chen, P.H. Factors influencing methane fermentation of micro-algae. PhD thesis, University of California, Berkeley, CA, USA, 1987.

Chen, Y., Cheng, J.J., Creamer, K.S. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. Bioresource Technology, 99, pp 4044–4064. 2008.

- Chia, M., Lombardi, A.T., Melão, M.G.G. Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 85(4), pp 1427-1438. 2013.
- Chisti, Y., Yan, J. Algal biofuels—a status report. *Applied Energy*, 88, pp 3277–3279. 2011.
- Cohen, Z., Norman, H.A., Heimer, Y.M. Microalgae as a source of ω -3 fatty acids. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 77, pp 1–31. 1995.
- Collet, P., Hélias, A., Lardon, L., Ras, M., Goy, R.A., Steyer, J.P. Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production. *Bioresource Technology*, 102, pp 207-214. 2011.
- Costa, J.A.V., Morais, M.G. An open pond system for microalgal cultivation. In: *Biofuels from algae* (Editors Pandey et al.). Elsevier, Burlington, USA, 2014.
- De Schampelaire, L., Verstraete, W. Revival of the biological sunlight to biogas energy conversion system. *Biotechnology and Bioengineering*, 103, pp 296-304. 2009.
- Domozych, D.S., Ciancia, M., Fangel, J.U., Mikkelsen, M.D., Ulvskov, P., Willats, W.G.T. The cell walls of green algae: a journey through evolution and diversity. *Frontiers in Plant Science*, 3, pp 73–79. 2012.
- Domozych, D.S., Serfis, A., Kiemle, S.N., Gretz, M.R. The structure and biochemistry of charophycean cell walls: I. Pectins of *Penium margaritaceum*. *Protoplasma*, 230, pp 99–115. 2007.
- Domozych, D.S., Stewart, K.D., Mattox, K.R. The comparative aspects of cell wall chemistry in the green algae (*Chlorophyta*). *Journal of Molecular Evolution*, 15, pp 1–12. 1980.
- Ehimen, E.A., Connaughton, S., Sun, Z., Carrington, G.C. Energy recovery from lipid extracted, transesterified and glycerol codigested microalgae biomass. *GCB Bioenergy*, 1, pp 371-381. 2009.
- Ehimen, E.A., Sun, Z.F., Carrington, C.G., Birch, E.J., Eaton-Rye, J.J. Anaerobic digestion of microalgae residues resulting from the biodiesel production process. *Applied Energy*, 88, pp 3454 – 3463. 2011.
- Eisenberg, D.M., Benemann, J.R., Weissman, J.C., Oswald, W.J. Large-scale freshwater microalgae biomass production for fuel and fertilizer, final report. Golden, Colorado: Solar Energy Research Institute, 1981.
- Ford, C.W., Percival, E. Polysaccharides synthesised by *Monodus subterraneus*: Part II. The cell wall glucan. *Journal of the Chemistry Society*, pp 3014–3016. 1965.
- Frigon, J.C., Matteau-Lebrun, F., Abdou, R.H., McGinn, P.J., O’Leary, S.J.B., Guiot, S.R. Screening microalgae strains for their productivity in methane following anaerobic digestion. *Applied Energy*, 108, pp 100–107. 2013.
- Geider, R.J., Roche, J.L. Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *European Journal of Phycology*, 37, pp 1-17. 2002.

- Gelin, F., Volkman, J.K., Largeau, C., Derenne, S., Damste, J.S.S., De Leeuw, J.W. Distribution of aliphatic, nonhydrolyzable biopolymers in marine microalgae. *Organic Geochemistry*, 30, pp 147–159. 1999.
- Golueke, C.G., Oswald, W.J., Gotaas, H.B. Anaerobic digestion of algae. *Applied Microbiological*, 5, pp 47-55. 1957.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P. Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part II: Focus on biomethane production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(2), pp 205–18. 2011.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Molinuevo-Salces, B. Anaerobic digestion of microalgal biomass: Challenges, opportunities and research needs. *Bioresource Technology*, 198, pp 896-906. 2015.
- Goodenough, U.W., Heuser, J.E. The *Chlamydomonas* cell wall and its constituent glycoproteins analyzed by the quick-freeze, deep-etch technique. *Journal of Cell Biology*, 101, pp 1550–1568. 1985.
- Grimm, P., Risse, J.M., Cholewa, D., Muller, J.M., Beshay, U., Friehs, K., Flaschel, E. Applicability of *Euglena gracilis* for biorefineries demonstrated by the production of alpha-tocopherol and paramylon followed by anaerobic digestion. *Journal of Biotechnology*, 215, pp 72–79. 2015.
- Heaven, S., Milledge, J., Zhang, Y. Comments on ‘anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable’. *Biotechnology Advances*, 29, pp 164–167. 2011.
- Huang, G., Feng, C., Dong, W., Zhang, X. W., Chen, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, 37, pp 8-46. 2010.
- Imam, S.H., Buchanan, M.J., Shin, H.C., Snell, W.J. The *Chlamydomonas* cell wall: characterization of the wall framework. *Journal of Cell Biology*, 101, pp 1599–1607. 1985.
- Kapaun, E., Reisser, W. A chitin-like glycan in the cell wall of a *Chlorella* sp. (*Chlorococcales, Chlorophyceae*). *Planta*, 197, pp 577–582. 1995.
- Khalid, A., Arshad, M., Anjum, M., Mahmood, T., Dawson, L. Review- the anaerobic digestion of solid organic waste. *Waste Management*, 321, pp 1737-1744. 2011.
- Kinnunen, V., Craggs, R., Rintala, J. Influence of temperature and pretreatments on the anaerobic digestion of wastewater grown microalgae in a laboratory-scale accumulating-volume reactor. *Water Research*, 57, pp 247-257. 2014.
- Klassen, V., Blifernez-Klassen, O., Hoekzema, Y., Mussnug, J.H., Kruse, O. A novel one-stage cultivation/fermentation strategy for improved biogas production with microalgal biomass. *Journal of Biotechnology*, 215, pp 44–51. 2015.
- Klassen, V., Blifernez-Klassen, O., Wobbe, L., Schluter, A., Kruse, O., Mussnug, J.H. Efficiency and biotechnological aspects of biogas production from microalgal substrates. *Journal of Biotechnology*, 234, pp 7-26. 2016.

- Kloareg, B., Quatrano, R.S. Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanography and Marine Biology*, 26, pp 259–315. 1988.
- Kodner, R.B., Surnmons, R.E., Knoll, A.H. Phylogenetic investigation of the aliphatic, non-hydrolyzable biopolymer algaenan, with a focus on green algae. *Organic Geochemistry*, 40, pp 854–862. 2009.
- Kwietniewska, E., Tys, J. Process characteristics, inhibition factors and methane yields of anaerobic digestion process, with particular focus on microalgal biomass fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 34, pp 491-500. 2014.
- Lee, R.E. *Phycology*. 4 ed. Cambridge University Press. Cambridge, 2008.
- Leitão, R.C., van Haandel, A.C., Zeeman, G., Lettinga, G. The effects of operational and environmental variations on anaerobic wastewater treatment systems: a review. *Bioresour Technol*, 97, pp 1105-1118. 2006.
- Li Y., Park, S.Y., Zhu, J. Solid-state anaerobic digestion for methane production from organic waste. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15, pp 821 – 826. 2011.
- Mackenzie, G., Boa, A., Taboada, A., Atkin, S., Sathyapalan, T. Sporopollenin, the least known yet toughest natural biopolymer. *Frontiers in Materials*, 2 (66). 2015. DOI: 10.3389/fmats.2015.00066
- Markou, G., Angelidaki, I., Georgakakis, D. Carbohydrate-enriched cyanobacterial biomass as feedstock for bio-methane production through anaerobic digestion. *Fuel*, 111, pp 872–879. 2013.
- Martone, P.T., Estevez, J.M., Lu, F.C., Ruel, K., Denny, M.W., Somerville, C., Ralph, J. Discovery of lignin in seaweed reveals convergent evolution of cell wall architecture. *Current Biology*, 19, pp 169–175. 2009.
- Mc Carty, P.L. *Anaerobic waste treatment fundamentals*. PublicWorks, 95, pp 91-99. 1964.
- McGinn, P.J., Dickinson, K.E., Park, K.C., Whitney, C.G., MacQuarrie, S.P., Black, F.J., Frigon, J.C., Guiot, S.R., O’Leary, S.J.B. Assessment of the bioenergy and bioremediation potentials of the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD cultivated in municipal wastewater effluent in batch and continuous mode. *Algal Research*, 1, pp 155–165. 2012.
- Mendez, L., Mahdy, A., Timmers, R.A., Ballesteros, M., González-Fernández, C. Enhancing methane production of *Chlorella vulgaris* via thermochemical pretreatments. *Bioresour Technol*, 149, pp 136–141. 2013.
- Metcalf & Eddy Inc., Tchobanoglous, G., Burton, F.L., Stensel, H.D. *Wastewater Engineering, Treatment and Resource Recovery*, 5th ed. McGraw Hill Education. Nova Iorque, 2013.
- Michel, G., Tonon, T., Scornet, D., Cock, J.M., Kloareg, B. The cell wall polysaccharide metabolism of the brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Insights into the evolution of

extracellular matrix polysaccharides in Eukaryotes. *NewPhytologist*, 188, pp 82–97. 2010.

Miller, D.H., Lamport, D.T., Miller, M. Hydroxyproline hetero oligosaccharides in *Chlamydomonas*. *Science*, 176, pp 918–920. 1972.

Murphy, J.D., Drosig, B., Allen, E., Jerney, J., Xia, A., Herrmann, C. A perspective on algal biogas. *IEA Bioenergy*, pp 1–38. 2015.

Mussgnug, J.H., Klassen, V., Schluter, A., Kruse, O. Microalgae as a substrate for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of Biotechnology*, 150, pp 51-56. 2010.

Olaizola, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*, 20, pp 459-466. 2003.

Ometto, F., Quiroga, G., Pšenic̃ka, P., Whitton, R., Jefferson, B., Villa, R. Impacts of microalgae pre-treatments for improved anaerobic digestion: thermal pretreatment, thermal hydrolysis, ultrasound and enzymatic hydrolysis. *Water Research*, 65, pp 350–361. 2014.

Park, J., Lee, J., Sim, S.J., Lee, J.H. Production of hydrogen from marine micro-algae biomass using anaerobic sewage sludge microflora. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14, pp 307-315. 2009.

Park, J.B.K., Craggs, R.J., Shilton, A.N. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*, 102, pp 35–42. 2011.

Park, S., Li, Y. Evaluation of methane production and macronutrient degradation in the anaerobic co-digestion of algae biomass residue and lipid waste. *Bioresource Technology*, 111, pp 72-48. 2012.

Pascual, A., Rigueiro, L., Silvestre, G. Evolución de las plantas de biogas agroindustrial hacia nuevos modelos basados en el concepto de biorefinería. *RETEMA (especial bioenergía)*, pp 34-40. 2015.

Passos, F., Astals, S., Ferrer, I. Anaerobic digestion of microalgal biomass after ultrasound pretreatment. *Waste Management*, 34, pp 2098-2103. 2014c.

Passos, F., Ferrer, I. Influence of hydrothermal pretreatment on microalgal biomass anaerobic digestion and bioenergy production. *Water Research*, 68, pp 364–373. 2015

Passos, F., Gutiérrez, R., Brockmann, D., Steyer, J.P., García, J., Ferrer, I. Microalgae production in wastewater treatment systems, anaerobic digestion and modeling using ADM1. *Algal Research*, 10, pp 55–63. 2015.

Passos, F., Hernández-Mariné, M., García, J., Ferrer, I. Long-term anaerobic digestion of microalgae grown in HRAP for wastewater treatment. Effect of microwave pretreatment. *Water Research*, 49, pp 351-359. 2014b.

- Passos, F., Hom-Diaz, A., Blaquez, P., Vicent, T., Ferrer, I. Improving biogas production from microalgae by enzymatic pretreatment. *Bioresource Technology*, 199, pp 347–351. 2016.
- Passos, F., Solé, M., García, J., Ferrer, I. Biogas production from microalgae grown in wastewater: effect of microwave pretreatment. *Applied Energy*, 108, pp 168-175. 2013.
- Passos, F., Uggetti, E., Carrère, H., Ferrer, I. Pretreatment of microalgae to improve biogas production: a review. *Bioresource Technology*, 172, pp 403-412. 2014a.
- Popper, Z.A., Michel, G., Herve, C., Domozych, D.S., Willats, W.G.T., Tuohy, M.G., Kloareg, B., Stengel, D.B. Evolution and diversity of plant cell walls: from algae to flowering plants. *Annual Review of Plant Biology*, 62, pp 567–588. 2011.
- Popper, Z.A., Ralet, M.C., Domozych, D.S. Plant and algal cell walls: diversity and functionality. *Annals of Botany*, 114, pp 1043–1048. 2014.
- Prajapati, S.K., Kaushik, P., Malik, A., Vijay, V.K. Phycoremediation and biogas potential of native algal isolates from soil and wastewater. *Bioresource Technology*, 135, pp 232–238. 2013b.
- Prajapati, S.K., Kaushik, P., Malik, A., Vijay, V.K. Phycoremediation coupled production of algal biomass, harvesting and anaerobic digestion: Possibilities and challenges. *Biotechnology Advances*, 31, pp 1408-1425. 2013a.
- Raposo, F., Fernandez-Cegri, V., De la Rubia, M.A., Borja, R., Beline, F., Cavinato, C., Demirer, G., Fernandez, B., Fernandez-Polanco, M., Frigon, J.C., Ganesh, R.,Kaparaju, P., Koubova, J., Mendez, R., Menin, G., Peene, A., Scherer, P., Torrijos,M., Uellendahl, H., Wierinck, I., de Wilde, V. Biochemical methane potential (BMP) of solid organic substrates: evaluation of anaerobic biodegradability using data from an international interlaboratory study. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86, pp 1088–1098. 2011.
- Razon, L.F. Life cycle energy and greenhouse gas profile of a process for the production of ammonium sulfate from nitrogen-fixing photosynthetic cyanobacteria. *Bioresource Technology*, 103, pp 339-346. 2012.
- Rodriguez, C., Alaswad, A., Mooney, J., Prescott, T., Olabi, A.G. Pre-treatment techniques used for anaerobic digestion of algae. *Fuel Processing Technology*, 138, pp 765-779. 2015.
- Samson, R., LeDuy, A. Detailed study of anaerobic digestion of *Spirulina maxima* algae biomass. *Biotechnology and Bioengineering*, 28, pp 1014-1023. 1986.
- Savage, P. E., Hestekin, J. A. A Perspective on Algae, the Environment, and Energy. *Environmental Progress and Sustainable Energy*, 32(4), pp 877-883. 2013.
- Scholz, M.J., Weiss, T.L., Jinkerson, R.E., Jing, J., Roth, R., Goodenough, U., Posewitz,M.C., Gerken, H.G. Ultrastructure and composition of the *Nannochloropsis gaditana* cell wall. *Eukaryotic Cell*, 13, pp 1450–1464. 2014.

- Scragg, A.H., Illman, A.M., Crden, A., Shales, S.W. Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. *Biomass & Bioenergy*, 23, pp 67-73. 2002.
- Sheehan, J. A look back at the US Department of Energy's aquatic species program – Biodiesel from algae. TP-580-24910. 1998.
- Sialve, B., Bernet, N., Bernard, O. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances*, 27, pp 409-416. 2009.
- Sorensen, I., Pettolino, F.A., Bacic, A., Ralph, J., Lu, F., O'Neill, M.A., Fei, Z., Rose, J.K.C., Domozych, D.S., Willats, W.G.T. The *charophycean* green algae provide insights into the early origins of plant cell walls. *Plant Journal*, 68, pp 201–211. 2011.
- Speece, R.E. Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters. Nashville: Archae press. 1996.
- Speece, R.E. Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. *Environmental Science Technology*, 17, pp A416–A427. 1983.
- Tamura, H., Mine, I., Okuda, K. Cellulose-synthesizing terminal complexes and microfibril structure in the brown alga *Sphacelaria rigidula* (*Sphacelariales*, *Phaeophyceae*). *Phycological Research*, 44, pp 63–68. 1996.
- Tartakovsky, B., Lebrun, F.M., Guiot, S.T. High-rate biomethane production from microalgae biomass in a UASB reactor. *Algal Research*, 7, pp 86-91. 2015.
- Tartakovsky, B., Lebrun, F.M., McGinn, P.J., O'Leary, S.J.B., Guiot, S.R. Methane production from the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD in a continuous anaerobic reactor. *Algal Research*, 2, pp 394–400. 2013.
- Thiel, P.G. The effect of methane analogues on methanogenesis in anaerobic digestion. *Water Research*, 3, pp 215–223. 1969.
- Torres, A., Feroso, F.G., Rincón, B., Bartacek, J., Borja, R., Jeison, D. Challenges for cost-effective microalgae anaerobic digestion. In: *Biodegradation-Engineering and Technology*, Dr. Rolando Chamy (Ed.). ISBN 978-953-51-1153-5. Intech, 2013.
- Trivedi, J., Aila, M., Bangwal, D.P., Kaul, S., Garg, M.O. Algae based biorefinery – How to make sense? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 47, pp 295-307. 2015.
- Ueno, Y., Fukui, H., Goto, M. Operation of a two-stage fermentation process producing hydrogen and methane from organic waste. *Environmental Science Technology*, 41, pp 1413-1419. 2007.
- Uggetti, E., Sialve, B., Trably, E., Steyer, J.P. Integrating microalgae production with anaerobic digestion: a biorefinery approach. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*, 8 (4), pp 516-529. 2014.
- Uziel, M. Solar energy fixation and conversion with algal bacterial systems. PhD thesis. University of California, Berkeley, CA, USA, 1978.

- Valenzuela-Espinoza, E., Millán-Núñez, R., Núñez-Cebrero, F. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll-*a* content of *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. *Aquaculture Engineering*, 20, pp 135-147. 2002.
- Van Der Há, D., Nachtergaele, L., Kerckhof, F.M., Rameiyanti, D., Bossier, P, Verstraete, W., Boon, N. Conversion of biogas to bioproducts by algae and methane oxidizing bacteria. *Environmental Science & Technology*, 46 (24), pp 13425-13431. 2012.
- van Haandel, A.C. Influence of the digested COD concentration on the alkalinity requirement in anaerobic digesters. *Water Science and Technology*, 30 (8), pp 23-24. 1994.
- van Haandel, A.C., Lettinga, G. Effect of short-term temperature increase on the performance of a mesophilic UASB reactor. *Water Science and Technology*, 22(9), pp 183-190. 1994.
- Viana, M. B. Produção de biogás a partir do glicerol. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de São Carlos, Departamento de Hidráulica de Saneamento. São Carlos. 105p. 2011.
- Vigani, M., Parisi, C., Cerezo, E.R., Barbosa, M.J., Sijtsma, L., Ploeg, M., Enzing, C. Food and feed products from microalgae: Market opportunities and challenges for the EU. *Trends in Food Science & Technology*, 42, pp 81 – 92. 2015.
- Visser, A., Gao, Y., Letting, G. Effects of pH on methanogenesis and sulphate reduction in thermophilic (55°C) UASB reactors. *Bioresource Technology*, 44(2), pp 113-121. 1993.
- Wang, M., Sahu, A.K., Rusten, B., Park, C. Anaerobic co-digestion of microalgae *Chlorella* sp. and waste activated sludge. *Bioresource Technology*, 142, pp 585–590. 2013.
- Wang, S.B., Hu, Q., Sommerfeld, M., Chen, F. Cell wall proteomics of the green alga *Haematococcus pluvialis* (*Chlorophyceae*). *Proteomics*, 4, pp 692–708. 2004.
- Ward, A.J., Hobbs, P.J., Holliman, P.J., Jones, D.L. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology*, 99, pp 7928-7940. 2008.
- Weiland, P. Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, pp 849–860. 2010.
- Wieczorek, N., Kucuker, M.A., Kuchta, K. Fermentative hydrogen and methane production from microalgal biomass (*Chlorella vulgaris*) in a two stage combined process. *Applied Energy*, 132, pp 108–117. 2014.
- Woertz, I., Fulton, L., Lundquist, T. Nutrient removal & greenhouse abatement with CO₂ supplemented algal high rate ponds. WEFTEC annual conference, Water Environment Federation, Orlando, Florida. 2009.

Work, V.H., Bentley, F.K., Scholz, M.J., D'Adamo, S., Gu, H.Y., Vogler, B.W., Franks, D.T., Stanish, L.F., Jinkerson, R.E., Posewitz, M.C. Biocommodities from photosynthetic microorganisms. *Environmental Progress and Sustainable Energy*, 32, pp 989–1001. 2013.

Yang, Z., Guo, R., Xu, X., Fan, X., Li, X. Enhanced hydrogen production from lipid-extracted microalgal biomass residues through pretreatment. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35, pp 9618-9623. 2010.

Yen, H.W., Brune, D.E. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresource Technology*, 98, pp 130-134. 2007.

Zamalloa, C., Boon, N., Verstraete, W. Anaerobic digestibility of *Scenedesmus obliquus* and *Phaeodactylum tricornutum* under mesophilic and thermophilic conditions. *Applied Energy*, 92, pp 733–738. 2012a

Zamalloa, C., De Vrieze, J., Boon, N., Verstraete, W. Anaerobic digestibility of marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum* in a lab-scale anaerobic membrane bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, pp 859–869. 2012b.

Zhong, W., Zhang, Z., Luo, Y., Qiao, W., Xiao, M., Zhang, M. Biogas productivity by co-digesting Taihu blue algae with corn straw as an external carbon source. *Bioresource Technology*, 114, pp 281-286. 2012.

Zhu, L. Biorefinery as a promising approach to promote microalgae industry: an innovative framework. *Renewable and Sustainable Reviews*, 41, pp 1376-1384. 2015.

Capítulo 6 - RECUPERAÇÃO ENERGÉTICA EM LAGOAS DE ALTA TAXA USADAS PARA TRATAMENTO DE ESGOTO DOMÉSTICOⁱ

Resumo

Lagoas de alta taxa (LATs) foram avaliadas de acordo com seu potencial de produção de biomassa e energia, através da relação de energia líquida (NER) e produtividade específica de biomassa. Todas as entradas de energia foram calculadas considerando uma LAT com pré-desinfecção ultravioleta usando efluente doméstico após tratamento anaeróbio. As saídas foram calculadas para duas rotas energéticas: i) produção de lipídeos e biogás após extração lipídica e ii) produção de biogás da biomassa bruta. O conteúdo de lipídeos neutros na biomassa foi de 7,4%, atingindo uma produtividade lipídica de 1,4 g/m².d e o potencial de produção de biogás foi de 0,22 m³/kg sólidos. Valores de NER para a biomassa bruta foram de 0,0122 e 0,0141 para lipídeos e biogás, respectivamente. A produtividade específica de biomassa foi de 4,26 mg/KJ. O valor de NER foi de 0,0173 para a rota integrada lipídeos + biogás e a produtividade específica de 0,64 mg/kJ. Apesar de nenhuma das rotas testadas terem apresentado ganho energético, a geração de biogás a partir da biomassa bruta foi a rota energética mais favorável.

Palavras-chave: bioenergia, biogás, biorrefinaria, lipídeos, microalgas.

6.1. Introdução

Dentre as fontes de energias renováveis como sol, vento e hidroelétrica, a biomassa é uma opção promissora, pois garante uma geração contínua de energia, além de ter um importante papel na política de mitigação de CO₂ (Appels et al., 2011). Alternativas não alimentícias e mais eficientes que as culturas tradicionais usadas como biomassa para a produção de biocombustíveis vêm sendo estudadas, e dentre elas, as microalgas surgem com grande potencial.

ⁱ Versão adaptada e traduzida de:

ASSEMANY, P. P.; CALIJURI, M. L.; BATALHA, M. H.; COUTO, E. A. Energy recovery in high rate algal pond used for domestic wastewater treatment In: 11th IWA Specialist Group Conference on Wastewater Pond Technology Conference, 2016, Leeds. IWA Specialist Group, Leeds, 2016. Disponível no ANEXO 1.

Como forma de tornar o processo de produção de microalgas sustentável dos pontos de vista econômico e ambiental, o uso de efluentes e a exploração do conceito da biorrefinaria se mostram como alternativas viáveis. Dentro desse contexto, as lagoas de alta taxa (LATs) surgem como alternativas principais para o tratamento de efluentes e produção de biomassa. Apesar do alto requerimento de área e baixos rendimentos de produtividade de biomassa comparados com reatores fechados, as LATs possuem reduzidos custos de instalação e baixo consumo energético, o que diminui os custos de operação (de Godos et al., 2010; Pittman et al., 2011).

Embora exista uma vasta literatura dedicada ao estudo de sistemas algas-bactérias para bioremediação de efluente, a investigação destinada ao uso da biomassa gerada nesses sistemas ainda é escassa (González-Fernandez et al., 2015). Atualmente, o uso energético mais visado para essa biomassa é a produção de biodiesel, devido a grande capacidade desses organismos em acumular lipídeos. No entanto, microalgas com baixo conteúdo lipídico são comuns quando cultivadas em efluentes (Chen et al., 2014). Portanto, a digestão anaeróbia pode ser uma alternativa atrativa para uma destinação energética dessa biomassa, além de minimizar os custos de colheita e concentração, uma vez que o substrato a ser utilizado deve preferencialmente ser úmido. O biogás produzido pode ser utilizado como fonte primária de energia para grande parte do processo de produção de biomassa algal, reduzindo assim, os custos de produção do biodiesel e dos demais produtos de alto valor agregado (Yang et al., 2011). Mais do que isso, Sialve et al. (2009) estimam que a digestão anaeróbia desse substrato para a geração de metano, a partir do controle dos diversos parâmetros envolvidos, pode gerar tanta energia quanto o aproveitamento dos lipídeos.

Collet et al. (2011) concluíram que a combinação de extração de lipídeos com a produção de biogás poderia ser uma ótima alternativa dos pontos de vistas tanto econômico quanto ambiental. Contrariamente, Quinn et al. (2014) ilustraram a importância de se considerar os efeitos da remoção de lipídeos para a performance da digestão anaeróbia em uma análise de ciclo de vida de biocombustíveis de microalgas. Segundo os autores, a digestão anaeróbia da biomassa residual da extração lipídica pode não ser vantajosa, uma vez que os lipídeos são os componentes mais ricos energeticamente. Se por um lado, o processo de prévia extração lipídica pode ser considerado como um pré-tratamento, aumentando a biodisponibilidade do conteúdo intracelular das microalgas; por outro, a extração inclui

etapas de desidratação, destruição da parede celular e uso de solventes, ou seja, etapas agressivas que influenciam na qualidade da biomassa para digestão.

Portanto, nesse estudo, o potencial de produção de biogás e a biodegradabilidade anaeróbia da biomassa, antes e após a extração lipídica foram avaliados. O principal objetivo foi aplicar uma análise energética em um contexto integrado de biorrefinaria, de forma a definir o melhor uso da biomassa cultivada em lagoa de alta taxa utilizando esgoto doméstico como meio de cultivo.

6.2. Materiais e Métodos

6.2.1. Unidade de produção de biomassa

A LAT experimental foi operada com efluente doméstico previamente tratado por um reator *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (UASB) em escala real e pré-desinfectado por radiação ultravioleta. A operação foi realizada em batelada (4 operações: julho e setembro 2014; e fevereiro e março 2015), até que a fase de decaimento do crescimento algal fosse atingido, monitorado diariamente pela variável clorofila-*a* (de acordo com NEN 6520, 1981 e APHA, 2005).

A LAT possuía as seguintes características: área superficial = 3,3 m², volume útil = 1m³ e altura de coluna d'água = 30 cm. O sistema de desinfecção ultravioleta foi projetado para atingir uma concentração final de 10³ NMP (100mL)⁻¹ de *Escherichia coli*, com uma dose efetiva de 21 mJ/cm² e absorvância de 42%. A fase de desinfecção possuiu como principal objetivo a remoção de organismos predadores e competidores por nutrientes, ajudando no crescimento algal, como já demonstrado por Santiago et al. (2013).

6.2.2. Caracterização da biomassa

Após a produção, a biomassa foi colhida e concentrada através de sedimentação gravitacional para posterior destinação energética. Uma porção dessa biomassa foi enviada para o processo de extração lipídica e posterior digestão anaeróbia da biomassa residual, enquanto outra parte, foi submetida apenas à digestão anaeróbia. A biomassa obtida após a extração lipídica e direcionada para os testes anaeróbios foi designada de biomassa residual (BR). Semelhantemente, a biomassa enviada diretamente para a digestão anaeróbia foi nomeada de biomassa bruta (BB).

Ambas as biomassas BB e BR foram caracterizadas quanto às características físicas e químicas. Foram analisadas as seguintes variáveis: umidade, pH, demanda química de oxigênio (DQO), sólidos totais (ST), sólidos totais voláteis (STV) e sólidos totais fixos (STF), nitrogênio total kjeldahl (NTK), nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e fósforo total (Pt), de acordo com procedimentos adaptados de APHA (2005).

Adicionalmente, a biomassa BB foi caracterizada quanto aos aspectos biológicos. Determinou-se a composição da comunidade fitoplanctônica (análises quantitativas e qualitativas), com o objetivo de identificar os gêneros de microalgas presentes no sistema de cultivo. Para a caracterização qualitativa, as amostras foram preservadas com solução de formol 4%. A identificação foi feita em microscópio invertido (Olympus CK2), pelo método de Uthermöl (1958). As características morfológicas e morfométricas da vida vegetativa e reprodutiva de valor taxonômico para as espécies foram analisadas de acordo com bibliografia especializada (Bourelly, 1970; Parra et al., 1983; Bicudo e Menezes, 2006). Para a análise quantitativa a contagem dos organismos foi realizada em câmaras de sedimentação de 2 mL de volume como descrito em Uthermöhl (1958), em microscópio invertido (Olympus CK2).

6.2.3. Lipídeos

O conteúdo lipídico foi avaliado em cada operação por meio da extração via solvente, de acordo com procedimentos descritos em Assemany et al. (2014). A biomassa foi seca em estufa a 50°C por 12 horas e após masseramento, as células rompidas por meio da adição de 5mL de ácido clorídrico 3M em temperatura de 35°C e masseramento. Após o rompimento foram acrescentados à biomassa seca (0,1g) metanol (25 mL) e éter de petróleo para a extração. Procedeu-se à 3 extrações via solvente em funis de separação com adições de 10mL, 20mL e 10mL de éter de petróleo na primeira, segunda e terceira extração, respectivamente. Para remoção de impurezas e pigmentos, o óleo extraído foi lavado com 10 mL acetato de chumbo a 4%. A quantificação (% lipídeos na biomassa seca) foi determinada por meio de análise gravimétrica, após evaporação do solvente em estufa por 2 horas a 105°C.

6.2.4. Biogás

Os testes de potencial de produção de biogás (PPB) seguiram os procedimentos descritos por Jawed e Tare (1999), com modificações descritas em Viana et al. (2012). Os ensaios

foram conduzidos em erlenmeyers de 250 mL (com volume útil de 200 mL), preenchidos com lodo anaeróbio oriundo do reator UASB existente na Estação de Tratamento de Esgotos da Violenira, localizada na cidade de Viçosa, MG, substrato (BB e BR), solução tampão e água destilada, na relação de substrato/inóculo (S/I) igual a 8. A melhor relação S/I foi obtida após vários testes de atividade metanogênica específica (AME), durante os quais outras relações foram testadas (4 e 6) e a relação S/I = 8 obteve o melhor desempenho. Foram adicionados micro e macronutrientes, para prevenir possível deficiência durante os testes. Também foi realizado teste com o frasco controle sem adição de substrato para mensurar a respiração endógena dos microrganismos. Após o fechamento dos frascos, foi realizada a injeção de gás 100% N₂ durante 4 minutos para expurga do oxigênio. Os testes foram conduzidos a 35±2°C sob agitação contínua (120 rpm) em incubadora (TECNAL, TE-420). O volume de biogás gerado foi monitorado diariamente em uma garrafa de Mariotte preenchida com solução 25g NaCl/L (pH=2). A AME foi calculada pela inclinação máxima da curva de produção acumulada de biogás, com auxílio do software estatístico R, versão 3.0.2 (Development Core 2013), para ajuste de regressão não linear, modelo de regressão logística. Para cada modelo, o coeficiente de determinação foi calculado, de forma a se avaliar o ajuste. O cálculo do PPB foi baseado na produção acumulada de biogás após 30 dias de incubação e na massa do substrato usada nos testes. A biodegradabilidade anaeróbia foi determinada convertendo a produção de biogás em carga orgânica, considerando que a 35°C, 0,395L de metano corresponde a 1g de DQO.

O teste de toxicidade anaeróbia teve como objetivo avaliar a toxicidade anaeróbia da biomassa algal produzida na LAT sem a prévia extração lipídica (BB) para o consórcio anaeróbio com base na produção de biogás. Ou seja, a biomassa é considerada tóxica ou inibidora caso ocorra a diminuição da produção de biogás. O procedimento experimental foi baseado nos testes de AME e de acordo com Viana et al. (2012), variando as concentrações de glicose e biomassa nos frascos. Foi utilizada a melhor relação S/I obtida nos testes AME para realização do teste de toxicidade. Os experimentos foram realizados utilizando a técnica do planejamento fatorial 2^k, onde k são os fatores analisados em 2 níveis, (-) e (+). O valor de k foi igual a 2, já que duas variáveis foram analisadas: concentração de glicose e concentração de biomassa algal. Além disso, pontos centrais em triplicata (nível zero) foram adicionados a fim de avaliar o erro experimental. O

software utilizado foi o SAEG 9.1, e os modelos, bem como seus coeficientes, foram testados quanto a sua significância pelo teste *t*.

6.2.5. Análise energética

O desempenho energético do sistema de produção foi avaliado em termos da produtividade específica de biomassa, PB/EC (mg/kJ), definida como a produtividade de biomassa (PB, mg/L.d) por input energético (EC, kJ/L.d) (Pegallapati et al., 2014) e pela taxa energética líquida (*net energy ratio*, NER), que relaciona a energia total produzida e a energia total consumida pelo sistema, de acordo com a Equação 1, amplamente utilizada em outras pesquisas (Jorquera et al., 2010; Feng et al., 2011; Ozkan et al., 2012; Zhu et al., 2014):

$$NER = \frac{\Sigma \text{Energia produzida}}{\Sigma \text{Energia consumida}} \quad \text{Equação 1}$$

A energia produzida pode ser aferida em termos do conteúdo energético total da biomassa ou apenas em relação ao seu potencial de produção de lipídeos e/ou biogás. O consumo energético foi considerado como sendo relativo à agitação do meio de cultivo promovido pela rotação de pás, e também do sistema de desinfecção ultravioleta.

Quantificação do consumo energético

O consumo energético em cada operação (COP, kWh/dia) foi determinado de acordo com a Equação 2:

$$C_{OP} = \frac{24 \times Pot}{1000} \quad \text{Equação 2}$$

Onde Pot é a potência, em watts. O consumo anual de energia (CT, kJ/ano) pode ser determinado pela Equação 3:

$$C_T = C_{OP} \times \text{dias de operação no ano} \times 3600 \quad \text{Equação 3}$$

Considerando a operação contínua da LAT durante todo o ano, a Equação 3 pode ser substituída pela Equação 4:

$$C_T = C_{OP} \times 1.314.000 \quad \text{Equação 4}$$

Quantificação da energia produzida a partir dos lipídeos e da produção de biogás

A produção anual de energia a partir da digestão anaeróbia da biomassa (E_G , kJ/ano) e dos lipídeos (E_L , kJ/ano) foi determinada a partir da produção anual lipídica e de biogás, considerando que: (i) o conteúdo energético de 1 L de lipídeos equivale a 35.133,33 kJ (Jorquera et al., 2010), (ii) a densidade de lipídeos totais é aproximadamente 0,9 kg/L (Jorquera et al., 2010), (iii) 1m³ de biogás equivale a 23.400 kJ (valor médio do intervalo reportado por Chisti, 2007), e (iv) tempo de detenção hidráulica de 4 dias, de acordo com as Equações 5 e 6:

$$E_L = \frac{P_{L,anual}}{0,9} \times 35133,33 \quad \text{Equação 5}$$

Onde $P_{L,anual}$ é a produção anual de lipídeos (kg/ano).

$$E_G = P_{G,anual} \times 23400 \quad \text{Equação 6}$$

Onde $P_{G,anual}$ é a produção anual de biogás (m³/ano).

6.3. Resultados e Discussão

6.3.1. Caracterização da biomassa

A classe das Clorofíceas foi a única identificada na composição da comunidade fitoplanctônica. A espécie mais abundante foi a *Chlorella vulgaris*, seguida do gênero *Scenedesmus* sp., com densidades de respectivamente, 9,4x10⁵ e 6,5x10⁵ indivíduos de microalgas/mL. A Tabela 6.1 apresenta os resultados da caracterização física e química das biomassas utilizadas como substrato nos testes de digestão anaeróbia.

Tabela 6.1 - Resultados de caracterização da biomassa algal utilizada como substrato nos testes anaeróbios (média e desvio padrão).

Biomassa	BB	BR
pH	7,5 (1)	< 2 (1)
Umidade (%)	98 (1)	99 (1)
ST (g/L)	21 (7)	7 (2)
Cinzas (%ST)	45	43
Voláteis (%ST)	55	57
NTK (g/L)	3 (3)	0,1 (0,06)
N-NH ₃ (g/L)	ND	---
PT (g/L)	0,65 (0,1)	0,3 (0,1)
DQO (g/L)	53 (27)	100 (25)

ND: não detectado; --: não realizado. BB=biomassa bruta; BR=biomassa residual;

De acordo com a Tabela 6.1 nota-se a diferença de pH entre ambas as biomassas. Se por um lado a BB apresentou valor próximo da neutralidade, por outro destaca-se o valor

ácido apresentado pela BR. O valor médio inferior a 2 pode ser explicado pela adição de ácido clorídrico para o rompimento da parede celular durante a etapa de extração lipídica. A concentração de DQO da BR foi cerca de duas vezes maior que a da BB. Esse fato se deve ao uso de solventes como metanol e éter de petróleo no procedimento de extração, podendo o carbono desses reagentes ao longo do processo se incorporar à biomassa. O baixo valor de NTK na BR indicou que juntamente com a extração de lipídeos houve também a extração de proteínas. Para fósforo, destaca-se a reduzida concentração na BR se comparado com a BB, devido a extração de lipídeos que contém em sua composição fósforo, como os lipídeos complexos e os fosfolipídeos. Salienta-se ainda a maior concentração de sólidos na BB, devido à diluição da BR.

Para ambas as biomassas, a umidade pode ser relacionada à ineficiência do processo de separação da biomassa. Especificamente na BR, o alto teor de umidade, superior a 99%, foi devido à adição de água após a separação dos solventes e ácido clorídrico. A separação realizada por sedimentação da biomassa se fez necessária uma vez que os reagentes utilizados na extração são extremamente tóxicos aos microrganismos anaeróbios, inibindo potencialmente a digestão anaeróbia. Essa inibição foi comprovada em testes preliminares de PPB, durante os quais nenhuma atividade metanogênica foi detectada nos frascos com presença da biomassa adicionalmente aos reagentes pós-extração, como também descrito por Yun et al. (2014).

Adicionalmente, o elevado conteúdo de cinzas de ambas as biomassas (45 e 43% dos ST) deve ser destacado como uma característica intrínseca do meio de cultivo utilizado no crescimento da biomassa. Nesse estudo, o esgoto doméstico foi utilizado depois de um prévio tratamento em reator UASB. No entanto, um tratamento preliminar para remoção principalmente de areia não é efetuado na estação de tratamento de esgoto em questão. Além disso, a operação do reator UASB não é realizada de forma controlada, mais especificamente o descarte de lodo, o que pode acarretar em uma elevada idade do lodo, com grande quantidade de material inorgânico no mesmo.

6.3.2. Ganho de energia

Lipídeos

A biomassa apresentou um conteúdo de lipídeos neutros de 7,4%, atingindo uma produtividade lipídica de 1,4 g/m².d. O cultivo em efluentes sob condições pouco

apropriadas e com competição com outros microrganismos podem ser apontados como causa do reduzido acumulo lipídico. De acordo com Mehrabadi et al. (2015), a principal razão para o baixo conteúdo de lipídeos da biomassa cultivada em LAT com águas residuárias é a mistura de algas e bactérias. Como o conteúdo lipídico das bactérias é tipicamente inferior a 10% (Brown et al., 1996), o conteúdo global lipídico é reduzido e conseqüentemente o conteúdo energético da biomassa. De acordo com a Equação 5, o ganho energético advindo do aproveitamento do conteúdo lipídico da biomassa foi de 65.632 kJ/ano.

Biogás

A Figura 6.1 apresenta a produção acumulada de biogás para a biomassa antes (BB) e após a extração lipídica (BR).

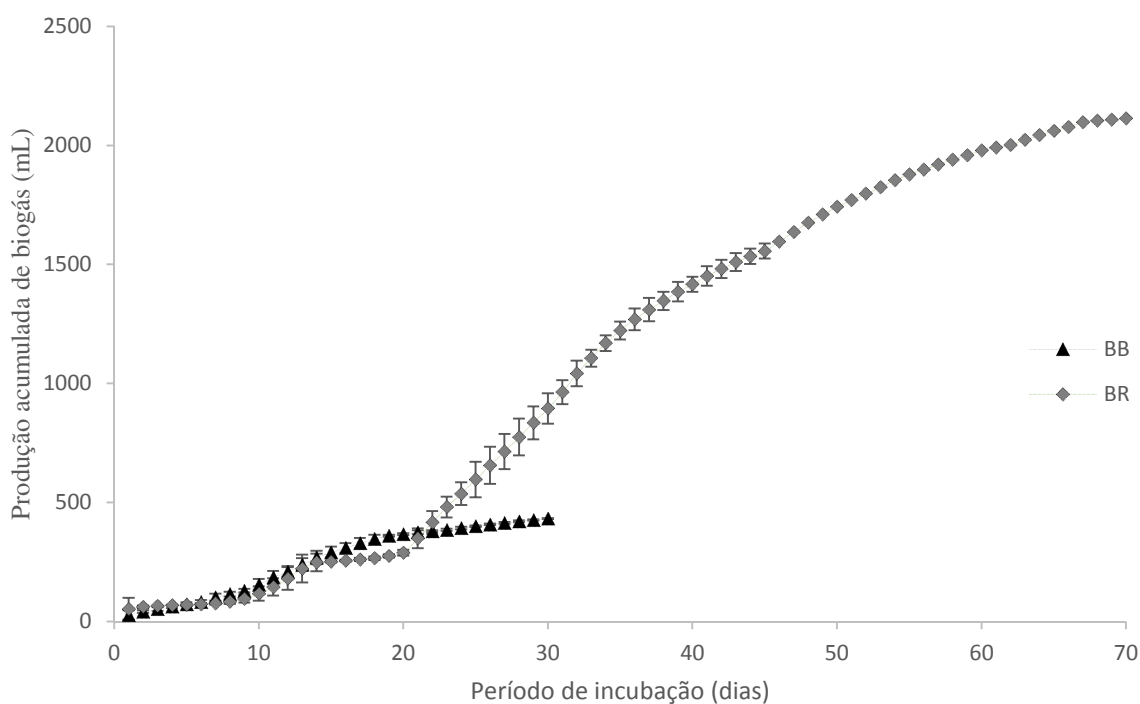


Figura 6.1 - Produção acumulada de biogás para as biomassas: antes (BB, n=4) e após (BR, n=2) a extração de lipídeos (barras verticais representam o desvio padrão).

O tempo de incubação da BR foi superior aos 30 dias, estipulados para a BB, uma vez que procurou-se manter a incubação até a estabilização da produção de biogás, que se deu próximo ao 70º dia. Apesar da elevada produção de biogás, atingindo 2114 mL ao final da incubação, durante os 10 primeiros dias de incubação não houve qualquer produção.

Esse tempo provavelmente foi devido à adaptação dos microrganismos anaeróbios ao substrato BR. Um fator que pode ter contribuído para essa adaptação foi o pH, que na biomassa extraída apresentou valor extremamente ácido (menor que 2), como já discutido no item 6.3.1 (Tabela 6.1). Dessa forma, uma alternativa para diminuição do tempo de adaptação seria a correção do pH da biomassa antes da incubação ou a adoção de um período de aclimação do inóculo anaeróbio previamente à digestão.

Os resultados dos testes de biodegradabilidade anaeróbia e PPB para a biomassa proveniente da LAT, antes e após a extração lipídica são apresentados na Tabela 6.2.

Tabela 6.2 - Resultados dos testes de biodegradabilidade anaeróbia e PPB para as biomassas provenientes da LAT, antes e após a extração lipídica (n=4 para BB e n=2 para BR, média e desvio padrão).

Biomassa	Biodegradabilidade anaeróbia (%)	PPB (m ³ biogás/kg STV)	Energia do biogás* (kJ/ano)
BB	17,5 (12,4)	0,2 (0,1)	75.818
BR	45,6 (24,7)	2,6 (0,5)	27.333

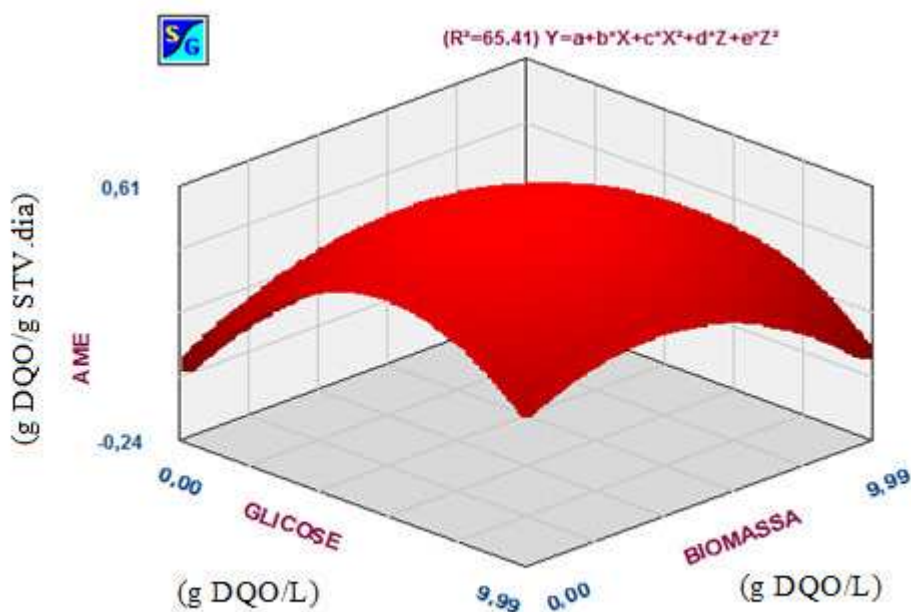
* Cálculo de acordo com Equação 6. BB=biomassa bruta; BR=biomassa residual; PPB=potencial de produção de biogás.

Percebe-se, uma baixa biodegradabilidade anaeróbia da BB. A parede celular é considerada como a principal característica da difícil digestibilidade da biomassa algal (González-Fernández et al., 2012; Zamalloa et al., 2012). Segundo Golueke et al. (1957), análises microscópicas mostraram que uma grande quantidade de células algais estavam intactas, mas não viáveis, após a digestão, indicando que provavelmente a parede celular inibiu a penetração dos microrganismos anaeróbios. A ultraestrutura da parede celular dos gêneros encontrados nesse estudo, *Chlorella* e *Scenedesmus* (*Chlorococcales*), é bem conhecida. Ela é composta de duas camadas: a interna que consiste em microfibras de celulose e matriz amorfa; e a externa, que na sua forma trilaminar pode conter substâncias como carotenoides e lignina (esporopolenina) (Weng e Chapple, 2010). Ou seja, componentes de difícil degradação como a celulose e lignina, que podem ser a causa dos baixos índices de biodegradabilidade encontrados para BB.

No entanto, de acordo com Kim et al. (2014), apenas a pectinase possui um efeito significativo na degradação da parede celular composta de polissacarídeos de *C. vulgaris*. Parece que essa espécie não possui uma rígida parede celular, mas sim uma matriz de polissacarídeos composta de ácido urônico e amino açúcares (Gerken et al., 2013; Mahdy

et al., 2015). González-Fernandez et al. (2015) concluíram que a baixa taxa de hidrólise para proteínas, associado ao fato que dentre diversos pré-tratamentos, a ação de proteases demonstrou o maior rendimento de metano para diferentes biomassas de microalgas, proteínas celulares são diretamente relacionadas com a baixa biodegradabilidade desse substrato. Mahday et al. (2015) afirmaram que proteínas de microalgas merecem futuras investigações de forma a elucidar totalmente seus efeitos na digestão anaeróbia.

A partir da Figura 6.2 percebe-se um ponto ótimo para a máxima AME, fora do qual houve inibição ou limitação na produção de biogás. A máxima AME modelada foi de 0,625 kg DQO/kg STV.d. O efeito tóxico da biomassa algal foi observado para concentrações superiores a 3,7 g/L e a concentração ótima de glicose para a máxima AME foi de 6,1 g/L. Significâncias de 5% do coeficiente glicose² e de 10% do coeficiente BB² foram obtidas, no entanto o coeficiente BB não foi significativo. O modelo obteve significância estatística a 15% de probabilidade, com coeficiente de determinação de 65,4%.



$$AME = -0,015 + 0,064*BB - 0,0087*BB^2 + 0,17*Glicose - 0,014*Glicose^2$$

Figura 6.2 - Superfície resposta ajustado a partir da variação das concentrações de glicose e biomassa algal.

A toxicidade anaeróbia da biomassa algal observada nesse estudo, provavelmente foi causada devido à relação desbalanceada (baixa) de C/N da biomassa algal, levando à

toxicidade pela amônia. O alto teor de proteína da célula algal acarreta em grande liberação de amônia durante o processo anaeróbio, podendo causar efeitos inibitórios na microbiota presente no reator. Durante o processo anaeróbio proteínas são degradadas e a amônia é acumulada na fase líquida. Diversas variáveis determinam a concentração de amônia em um reator anaeróbio, mas a concentração do substrato é a principal delas (Sialve et al., 2009). A distribuição da amônia total entre íons amônio e amônia livre depende de fatores como pH e temperatura. Assim, dependendo da concentração da biomassa afluenta e se essa biomassa estiver com pouco teor de carbono em relação a nitrogênio, estarão presentes altas concentrações de NH_3 no reator, podendo ocorrer conseqüentemente inibição pela presença de amônia livre. A forma não ionizada do nitrogênio sofre difusão passiva através das membranas celulares, expressando assim sua toxicidade. Segundo Angelidaki e Ahring (1993), as arqueas metanogênicas acetoclásticas são as mais sensíveis à presença de amônia. Concentrações de inibição variam de 1,7 a 14 g/L e dependem de diversos fatores como: período de aclimação, natureza do substrato e inóculo, bem como das condições de operação.

Outra possível razão pela baixa biodegradabilidade anaeróbia, além da resistência da parede celular e do elevado conteúdo de nitrogênio levando conseqüentemente a um elevado teor de proteína, foi a grande quantidade de cinzas na biomassa, como já destacado na seção 6.3.1. A difícil degradação anaeróbia foi refletida no PPB, com valor médio de geração de metano de 0,20 m³biogás/kg STV. Passos et al. (2013) também utilizando biomassa bruta produzida em LAT com esgoto doméstico para digestão anaeróbia reportaram uma produção de biogás de 0,172 m³/ kg STV.

Ressalta-se o elevado valor de PPB para a BR, atingindo valor de 2,55 m³ biogás/kg STV, rendimento aproximadamente 10 vezes superior aos resultados reportados em literatura. Estudos para biomassa algal pré-tratada também cultivada em LAT com águas residuárias apresentaram resultados de: ~ 0,3 m³ biogás/kg STV após ~ 45 dias de incubação e aplicação de micro-ondas (Passos et al., 2013); 0,196 m³ CH₄/kg STV após quase 60 dias de incubação e aplicação de ultrassom (Passos et al., 2014c); e 0,155 m³ CH₄/kg STV para pré-tratamento de congelamento e descongelamento e 0,136 m³ CH₄/kg STV para pré-tratamento térmico (Kinnunen et al., 2014).

Esse resultado reitera a extração lipídica como pré-tratamento da biomassa algal. O processo de liberação de lipídeos utilizando solventes provavelmente aumentou a

biodisponibilidade do conteúdo intracelular das microalgas, tornando o substrato mais disponível para os microrganismos anaeróbios realizarem a digestão (Alzate et al., 2014). Além disso, pode-se afirmar que o melhor rendimento da digestão utilizando a BR foi devido ao encurtamento da etapa de hidrólise, ou seja, a acidogênese foi praticamente concluída na etapa de extração, sobrando às bactérias hidrolíticas pouco a se fazer, uma vez que já receberam o substrato quase ou totalmente hidrolisado. Como mencionado por González-Fernandez et al. (2012), ao se trabalhar com substrato particulado, como a biomassa de microalgas, a fase de hidrólise determina o sucesso da produção de metano. De outra forma, em substratos facilmente degradáveis, a metanogênese é considerada a fase limitante.

6.3.3. Análise energética

A Figura 6.3 apresenta os valores de NER e de produtividade específica de biomassa para as diferentes rotas energéticas.

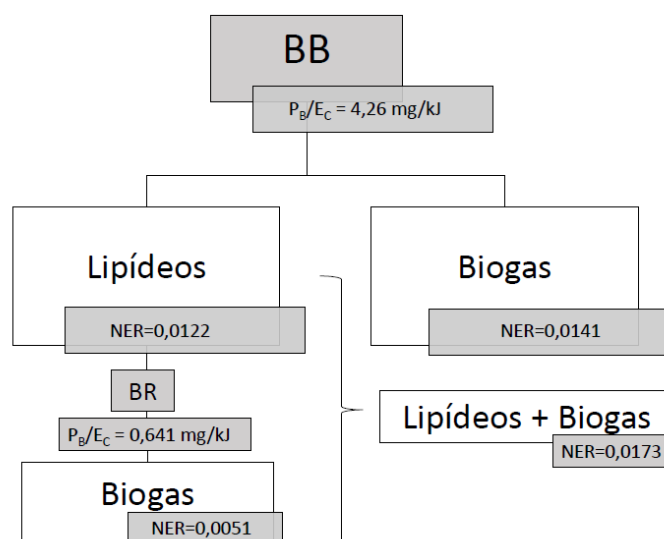


Figura 6.3 - NER e produtividade específica de biomassa para as diferentes rotas energéticas.

Independentemente da rota energética, os valores de NER ficaram abaixo de 1. As rotas de lipídeos e biogás para BB variaram de 0,0122 a 0,0141, para lipídeos e biogás, respectivamente. A rota integrada apresentou valor de NER levemente mais elevado do que as rotas em separados, porém, esse valor não foi suficiente para compensar o consumo energético.

Para BR, a rota de biogás apresentou o menor valor de NER, portanto, sua contribuição para a rota integrada – lipídeos + biogás - foi reduzida. Valores de ganho energético para BB e BR (Tabela 6.2) demonstraram que apesar de um elevado PPB da BR ter sido obtido, a baixa concentração dessa biomassa (veja valores de ST na Tabela 6.1), levaram a uma menor produtividade de biogás e conseqüentemente a baixos valores de produção energética e de NER, se comparado com a BB. Como já explicado no item 6.3.1, a BR necessitou ser diluída de forma a reduzir o efeito tóxico dos solventes. Portanto, a baixa concentração de sólidos nessa biomassa foi intrinsicamente associada com o método utilizado na extração lipídica. Os autores acreditam que se métodos de grande escala forem aplicados, por exemplo, micro-ondas e ultrassom, e perdas de biomassa forem minimizados, a concentração de biomassa pode ser aumentada e conseqüentemente o ganho energético dessa rota.

A eficiência do sistema em termos de produtividade de biomassa por consumo energético (P_B/E_C) foi também avaliada. Resultados mostraram que para BB, a produção de biomassa compensou o consumo de energia, apresentando uma produtividade específica de biomassa de 4,26 mg/kJ. BR, por sua vez, apresentou um menor valor para P_B/E_C , de 0,64 mg/kJ, indicando que o consumo energético para sua produção foi alto demais. Como esse estudo não levou em consideração a energia requerida para colheita e secagem da biomassa para extração lipídica, esse fato pode estar associado com a reduzida concentração dessa biomassa.

Comparando valores de NER da rota integrada com o valor de NER da rota de biogás para a BB foi possível observar o reduzido ganho energético da rota integrada. Nesse estudo, esse fato pode ser associado com os seguintes fatores: i) à pequena quantidade de biomassa após a separação de solventes, ii) baixo conteúdo energético da BR, uma vez que lipídeos foram removidos e iii) baixo conteúdo lipídico da BB. Uma vez que para o cálculo do NER não foi considerado o consumo energético para o estágio de colheita e concentração de biomassa, tampouco a etapa de secagem para a extração lipídica, pode-se afirmar que a extração lipídica não se apresentou como um processo viável para a biomassa estudada. Dessa forma, a produção de biogás da BB pôde ser considerada como a rota energética mais favorável. De acordo com Sialve et al. (2009), a extração de lipídeos de biomassas com menos que 40% de lipídeos combinada com a digestão anaeróbia da biomassa residual não é eficiente, seja em termos energéticos como em

termos econômicos. Para os autores, a digestão anaeróbia da biomassa algal parece ser a estratégia ótima em relação a um balanço energético.

A escassez de análises energéticas em cultivos utilizando efluente torna a comparação difícil, no entanto, os resultados mostram a necessidade de intervenção no processo produtivo de forma a melhorar sua performance energética, usando, por exemplo, equipamentos de baixo requerimento de energia ou fontes de energia renovável como painéis solares, por exemplo.

6.4. Conclusões

A extração de lipídeos apresentou um efeito positivo na digestão anaeróbia. Biomassa submetida a digestão após a extração lipídica apresentou um potencial de produção de biogás cerca de 10 vezes superior à biomassa sem o pré-tratamento. No entanto, para as diferentes rotas energéticas, o consumo de energia foi superior à produção. O baixo ganho energético da rota integrada comparada com a rota de produção de biogás da biomassa bruta, associado ao reduzido acúmulo lipídico e à baixa produtividade da biomassa extraída, foram fatores que indicaram a não viabilidade da biomassa oriunda da LAT do processo de extração de lipídeos. A produção de biogás da biomassa bruta pôde ser considerada como a rota energética mais favorável.

6.5. Referências Bibliográficas

Alzate, M.E., Muñoz, R., Rogalla, F., Fdz-Polanco, F. and Pérez-Elvira, S.I. Biochemical methane potential of microalgae biomass after lipid extraction. *Chemical Engineering Journal*, 243, pp 405-410. 2014.

Angelidaki, I., Ahring, B.K. Thermophilic anaerobic digestion of livestock waste: the effect of ammonia. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38, pp 560-564. 1993.

APHA. *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*. 20th edn, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA. 2005.

Appels, L., Laumwers, J., Degréve, J., Helsen, L., Lievens, B., Willems, K. Anaerobic digestion in global bio-energy production: potential and research challenges. *Renewable Sustainable Energy Reviews*, 15, pp 4295-4301. 2011.

Assemany, P.P., Calijuri, M.L., Couto, E.A., Santiago, A.F. and Reis, A.J.D. Biodiesel from wastewater: lipid production in high rate algal pond receiving disinfected effluent. *Water Science Technology*, 71, pp 1229-1234. 2015.

- Bourrelly, P. Les algues d'eau douce. Initiation à la sistematique. III Les algues blues et rouges. Les Eugléniens, Peridiniens et Cryptomonadines. Nouvelle Boubée & Cie, Paris, 1970.
- Brown, M.R., Barret, S.M., Volkman, J.K., Nearhos, S.P., Nell, J.A., Allan, G.L. Biochemical composition of new yeast and bacteria evaluated as food for bivalve aquaculture. *Aquaculture*, 143, pp 341-60. 1996.
- Chen, W.T., Zhang, Y., Zhang, J., Yu, G., Shideman, L.C., Zhang, P., Minarick, M. Hydrothermal liquefaction of mixed-culture biomass from wastewater treatment system into bio-crude oil. *Bioresource Technology*, 152, pp 130-139. 2014.
- Chisti, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, 26, pp 126-131. 2007.
- Collet, P., Arnaud, H., Laurent, L., Monique, R., Romy-Alice, G., Steyer, J.P. Life cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production. *Bioresource Technology*, 102, pp 207–214. 2011.
- de Godos, I., Blanco, S., Gárcis-Encina, P.A., Becares, E., Muñoz, R. Influence of flue gas sparging on the performance of high rate algae ponds treating agro-industrial wastewaters. *Journal of Hazardous Materials*, 179, pp 1049-1054. 2010.
- Gerken, H.G., Donohoe, B., Knoshaug, E.P. Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production. *Planta*, 237, pp 239– 253. 2013.
- Golueke, C.G., Oswald, W.J., Gotaas, H. Anaerobic digestion of algae. *Applied Microbiology*, 5, pp 47-55. 1957.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P. Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part II: focus on biomethane production. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*, 6, pp 205–218. 2012.
- González-Fernández, C., Sialve, B., Molinuevo-Salces, B. Anaerobic digestion of microalgal biomass: Challenges, opportunities and research needs. *Bioresource Technology*, 198, pp 896-906. 2015.
- Jawed, M., Tare, V. Microbial composition assessment of anaerobic biomass through methanogenic activity tests. *Water SA*, 25, pp 345-350. 1999.
- Jorquera, O., Kiperstok, A., Sales, E.A., Embiruçu, M., Ghirardi, M.L. Comparative energy life cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource Technology*, 101, pp 1406-1413. 2010.
- Kim, K.H., Choi, I.S., Kim, H.M., Wic, S.G., Bae, H. Bioethanol production from the nutrient stress-induced microalga *Chlorella vulgaris* by enzymatic hydrolysis and immobilized yeast fermentation. *Bioresource Technology*, 153, pp 47–54. 2014.

- Kinnunen, V., Craggs, R., Rintala, J. Influence of temperature and pretreatments on the anaerobic digestion of wastewater grown microalgae in a laboratory-scale accumulating volume reactor. *Water Research*, 57, pp 247-257. 2014.
- Mahdy, A., Mendez, L., Tomás-Pejó, E., del Mar Morales, M., Ballesteros, M., González-Fernández, C. Influence of the enzymatic hydrolysis on the biochemical methane potential of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus sp.* *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 91, pp 1299-1305. 2015.
- Mehrabadi, A., Craggs, R., Farid, M.M. Wastewater treatment high rate algal ponds (WWT HRAP) for low-cost biofuel production. *Bioresource Technology*, 184, pp 202-14. 2015.
- Nederlands Norm, NEN 6520. Water: Spectrophotometric Determination of Chlorophyll-*a* Content. Nederlands Normalisatie- instituut, Delft, the Netherlands, 1982.
- Parra, O.O., González, M., Dellarosa, V. Manual Taxonômico del Fitoplancton de água continentales. V- Chlorophyceae. Concepcion, Chile, 1983.
- Passos, F., Astals, S., Ferrer, I. Anaerobic digestion of microalgal biomass after ultrasound pretreatment. *Waste Management*, 34, pp 2098-2103. 2014.
- Passos, F., Solé, M., García, J., Ferrer, I. Biogas production from microalgae grown in wastewater: Effect of microwave pre-treatment. *Applied Energy*, 108, pp 168-175. 2013.
- Pegallapati, A. K., Arudchelvam, Y., Nirmalakhandan, N. Energetic Performance of Photobioreactors for algal cultivation. Brief Review. *Environmental Science Technology Letters*, 1, pp 2-7. 2014.
- Pittman, J.K., Dean, A.P., Osundeko, O. The Potential of Sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, 102, pp 17-25. 2011.
- Quinn, J.C., Hanif, A., Sharvelle, S., Bradley, T.H. Microalgae to biofuels: life cycle impacts of methane production of anaerobically digested lipid extracted algae. *Bioresource Technology*, 171, pp 37-43. 2014.
- Santiago, A.F., Calijuri, M.L., Assemany, P.P., Calijuri, M.C., Reis, A.J. Algal biomass production and wastewater treatment in high rate algal ponds receiving disinfected effluent. *Environmental Technology*, 34, pp 1877-85. 2013.
- Sialve, B., Bernet, N., Bernard, O. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances*, 27, pp 409-416. 2009.
- Uthermöl, H. Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton – methodic mitt. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, 9, pp 1-38. 1958.
- Viana, M.B., Freitas, A.V., Leitão, R.C., Santaella, S.T. Biodegradability and methane production potential of glycerol generated by biodiesel industry. *Water Science and Technology*, 66, pp 2217-2222. 2012.

Weng, J.K., Chapple, C. The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytologist*, 187, pp 273–85. 2010.

Yang, Z., Guo, R., Xu, X., Fan, X., Luo, S. Hydrogen and Methane production from lipid-extracted microalgae biomass residues. *International Journal of Hydrogen Energy*, 6, pp 3465-3470. 2011.

Yun, Y., Cho, S., Jung, K., Kim, M., Shin, H., Kim, D. Inhibitory effect of chloroform on fermentative hydrogen and methane production from lipid-extracted microalgae. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39, pp 19256-19261. 2014.

Zamalloa, C., Boon, N., Verstraete, W. Anaerobic digestibility of *Scenedesmus obliquus* and *Phaeodactylum tricornutum* under mesophilic and thermophilic conditions. *Applied Energy*, 92, pp 733-738. 2012.

Capítulo 7 - POTENCIAL ENERGÉTICO DE BIOMASSA CULTIVADA EM EFLUENTE DE INDÚSTRIA DE PROCESSAMENTO DE CARNES EM FOTOBIOREATOR COLUNA DE BOLHASⁱⁱ

Resumo

O presente estudo avaliou o potencial energético, em termos de lipídeos e biogás, da biomassa cultivada em fotobiorreator do tipo coluna de bolhas utilizando efluentes da indústria de processamento de carnes (efluente primário - pós unidade de flotação e efluente secundário - pós unidade de lodos ativados) como meio de cultivo. Procurou-se determinar a melhor rota para aproveitamento energético da biomassa produzida e visando atender o conceito de biorrefinaria, a produção de biogás foi avaliada com e sem a prévia extração lipídica. Após 6 dias de operação, a biomassa cultivada em ambos efluentes apresentou similar teor lipídico, (7% e 6,1%), representando produtividades lipídicas de 10 mg/L.d para efluente primário e 3,4 mg/L.d para efluente secundário, devido a maior produtividade de biomassa do efluente primário. O potencial de produção de metano (PPM) da biomassa pós flotador foi de 0,44 m³ biogás/kg STV e da biomassa pós lodos ativados de 0,28 m³ biogás/kg STV. Para a biomassa após a extração lipídica, o PPM foi de 2,38 m³ biogás/kg STV para cultivo no efluente pós-flotador e 2,26 m³ biogás/kg STV para cultivo no efluente pós-lodos ativados. Nenhuma das rotas energéticas apresentou valores de NER superior a 1. O ganho de energia com a produção de biogás após a extração lipídica foi pequeno, apesar de ser a rota com maior valor de NER dentre as demais. A geração de biogás da biomassa bruta, independente do meio de cultivo, foi a rota energética mais favorável.

Palavras-chave: microalgas, fotobiorreator coluna de bolhas, lipídeos, biogás, biorrefinaria.

ⁱⁱ Versão traduzida e adaptada de:

ASSEMANY, P.P.; CALIJURI, M.L.; TANGO, M.D.; COUTO, E.A. Energy potential of algal biomass cultivated in a photobioreactor using effluent from a meat processing plant. *Algal Research* v.17, p.53 - 60, 2016. Disponível no ANEXO 2.

7.1. Introdução

Microalgas são atualmente consideradas fontes promissoras de matéria prima para a produção de biocombustíveis. A partir da biomassa de microalgas diferentes tipos de biocombustíveis renováveis podem ser obtidos, incluindo produção de metano através da digestão anaeróbia, biodiesel derivado da extração do óleo e produção fotobiológica de hidrogênio. Além da versatilidade, o substrato algal ainda apresenta vantagens como o rápido e contínuo crescimento da biomassa, ao longo de todo o ano, excedendo o rendimento das culturas oleaginosas mais produtivas (Schenk et al., 2008).

No entanto, apesar das inegáveis vantagens associadas, ainda existem diversas dificuldades no desenvolvimento de tecnologias para produção de bioenergia de microalgas. Ainda não se chegou a um ponto ótimo de máxima produção e redução dos custos envolvidos. O consumo de energia e impactos ambientais negativos são as principais desvantagens. Ademais, as ainda imaturas tecnologias para colheita e concentração da biomassa, os altos custos de instalação e operação de fotobiorreatores (FBRs) e a baixa produtividade das lagoas de alta taxa devem ser superados.

Esforços têm sido concentrados de forma a buscar alternativas para tornar o processo de produção sustentável, tanto dos pontos de vista ambiental e econômico, quanto social. Dentre essas alternativas citam-se o cultivo em efluentes e em consórcio com outros microrganismos e a exploração ao máximo do conceito de biorrefinaria.

Biodiesel é uma das opções de aproveitamento energético da biomassa mais estudada, devido a grande capacidade de acúmulo lipídico das microalgas. A produção de biogás através da digestão anaeróbia, no entanto, é outra interessante rota que evita gasto excessivo de energia com o processo de concentração e secagem da biomassa. Quando o cultivo de microalgas é realizado em águas residuárias, um baixo acúmulo lipídico é esperado devido ao stress ambiental e pela produção de uma biomassa heterogênea, que contém além das algas, bactérias com reduzido conteúdo de lipídeos. Ademais, o consumo de energia do processo de secagem da biomassa para extração lipídica impacta em custos significativos para toda a cadeia produtiva.

Em relação ao biogás, o maior desafio é a melhoria dos métodos de pré-tratamento, que são essenciais para uma maior eficiência da digestão anaeróbia da biomassa algal devido à resistência da parede celular. Alguns estudos reportaram que a viabilidade e sustentabilidade do processo somente será atingida se a produção de biogás for

combinada com a prévia recuperação do biodiesel (Sialve et al., 2009; Harun et al., 2011). No entanto, a integração de sistemas de produção de biodiesel com a produção de metano a partir de biomassa algal é pouco descrita na literatura (Harun et al., 2011)

No caso de águas residuárias, a maioria dos sistemas de produção de microalgas é baseada no cultivo em lagoas abertas, nas quais, a produtividade se mantém abaixo de 1kg/m^3 , com valores médios de 0,2 e 0,6 kg/m^3 (Cromar e Fallowfield, 1997; Tredici, 2007). Apesar dos fotobiorreatores (FBRs) serem geralmente tidos como sistemas de maior custo de instalação e operação do que lagoas de alta taxa, eles são mais estáveis e capazes de uma maior eficiência fotossintética, densidade de biomassa, eficiência de utilização de CO_2 e produtividade volumétrica (Ugoala et al., 2012). Para a viabilidade da produção de biocombustíveis em grande escala, a energia gasta no cultivo, independente do sistema, deve ser minimizada de forma a se maximizar o rendimento energético.

No entanto, ainda existem algumas incertezas sobre como se determinar o balanço energético da produção de biocombustíveis de microalgas (Razon e Tan, 2011). A análise de energia líquida (*net energy analysis*), que usa conceitos da análise de ciclo de vida, é um dos métodos mais aceitos para se avaliar o potencial energético de um sistema em geral (Poldy, 2008), e particularmente sobre o potencial para produção de biodiesel (Balat e Balat, 2010). Outro coeficiente que avalia a eficiência do sistema de cultivo é a produtividade específica de biomassa, definido como produtividade de biomassa por *input* de energia, utilizado por Pegallapati et al. (2014). Além desses métodos, diversos outros coeficientes são usados extensivamente na literatura com a tentativa de mensurar a eficiência energética do sistema de produção e do aproveitamento da biomassa produzida (veja Razon e Tan, 2011; Ketheesan e Nirmalakhandan, 2012).

Todavia, a proposta no presente trabalho foi a de utilizar a análise energética em um contexto integrado de biorrefinaria, com o principal objetivo de definição da melhor rota de aproveitamento da biomassa, além da determinação da eficiência energética do sistema de produção. Avaliou-se, portanto, o potencial energético, em termos de lipídeos e biogás, da biomassa cultivada em FBR do tipo coluna de bolhas usando efluentes da indústria de beneficiamento de carnes como meio de cultivo.

7.2. Materiais e Métodos

7.2.1. Cultivo

A biomassa utilizada nos testes energéticos foi produzida em um FBR coluna de bolhas desenvolvido e operado por Tango (2015). O FBR foi operado com dois efluentes, efluente primário e efluente secundário, advindos de uma indústria de beneficiamento de carnes, localizada na cidade de Viçosa-MG, Brasil. O efluente primário foi coletado na saída da unidade de flotação e o secundário na saída da unidade de lodos ativados da estação de tratamento de efluentes da própria empresa. A biomassa produzida está caracterizada na Tabela 7.1.

Tabela 7.1 - Caracterização da biomassa cultivada nos efluentes primário e secundário (média e desvio padrão).

Variável	Unidade	Primário	Secundário
Clorofila-<i>a</i>	mg/L	2,8 (1,9)	1,75 (0,5)
SSV	mg/L	857,5 (399,5)	335,5 (7,8)
Densidade de indivíduos de microalgas	ind/mL	2,1x10 ⁶ *	2,3x10 ⁶ *
Gênero/espécie dominante	--	<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Scenedesmus staurastrum</i> (células livres)

*Valores para uma operação de cada efluente. A elevada densidade de fungos e bactérias dificultou a contagem em algumas operações. SSV=sólidos suspensos voláteis. Fonte: Adaptado de Tango (2015).

Para esse estudo, considerou-se a avaliação de cada meio de cultivo durante duas operações *outdoor* do FBR (durante setembro 2014 para o efluente primário e outubro 2014 para efluente secundário), que foram realizadas em batelada até atingir a fase de decaimento do crescimento algal, monitorado diariamente pela variável clorofila-*a*.

A Tabela 7.2 apresenta as características de ambos os efluentes utilizados como meio de cultivo. Em cada operação foi adicionado inóculo de 10% do volume coletado de lagoas de alta taxa aplicadas ao tratamento de efluente doméstico após reator anaeróbio.

Tabela 7.2 - Caracterização dos efluentes primário e secundário, afluente e efluente ao FBR (média e desvio padrão).

Variável	Unidade	Efluente Primário		Efluente Secundário	
		Afluente	Efluente	Afluente	Efluente
pH		6,0 (0,6)	--	7,6 (0)	--
OD	mg/L	2,5 (0,4)	11,2 (0,4)	3,9 (1,1)	7,1 (0,6)
DQOs	mg/L	308,4 (47,8)	173,3 (23,7)	56,0 (10,0)	65,0 (29,7)
DQO_t	mg/L	349,0 (2,7)	239,5 (115,3)	99,4 (0,1)	70,9 (22,7)
COD	mg/L	147,9 (31,3)	63,0 (4,8)	23,1 (7,1)	25,2 (11,6)
NTK	mg/L	72,7 (13,7)	52,0 (28,0)	45,4 (33,3)	38,0 (15,9)
N-NH₃	mg/L	13,4 (13,7)	0 (0,0)	40,4 (31,3)	0 (0,0)
N-NO₃⁻	mg/L	1,8 (0,9)	1,9 (0,1)	0,7 (0,7)	1,4 (1,3)
Ps	mg/L	3,6 (2,8)	1,9 (2,6)	0,7 (0,1)	0

OD = oxigênio dissolvido; DQOs = demanda química de oxigênio solúvel; DQOt = demanda química de oxigênio total; COD = carbono orgânico dissolvido; NTK = nitrogênio total kjeldahl; N-NH₃= nitrogênio amoniacal; N-NO₃⁻=nitrato; Ps=fósforo solúvel. Fonte: Adaptado de Tango (2015).

Após a produção, a biomassa de cada operação foi separada e concentrada por sedimentação para posterior análise energética. Uma parte da biomassa foi encaminhada para os processos de extração lipídica e de digestão anaeróbia e outra parte, somente para a digestão anaeróbia. A biomassa pós-extração (PE) lipídica submetida aos testes anaeróbios foi chamada de primária_PE, quando cultivada em efluente pós-flotador e secundária_PE, quando cultivada em efluente pós-lodos ativados. A biomassa encaminhada diretamente para a digestão anaeróbia foi denominada de primária_FBR e secundária_FBR.

7.2.2. Valorização energética

Lipídeos

O conteúdo lipídico foi avaliado em cada operação por meio da extração via solvente, de acordo com procedimentos descritos em Assemany et al. (2014). A biomassa foi seca em estufa a 50°C por 12 horas e as células rompidas por meio da adição de ácido clorídrico 3M. Após o rompimento foram acrescentados à biomassa seca metanol e éter de petróleo para a extração. Para remoção de impurezas e pigmentos, o óleo extraído foi lavado com acetato de chumbo a 4%. A quantificação (% lipídeos na biomassa seca) foi determinada por meio de análise gravimétrica, após evaporação do solvente em estufa por 2 horas a 105°C.

Biogás

Atividade Metanogênica Específica (AME)

Os testes de atividade metanogênica específica seguiram os procedimentos descritos por Jawed e Tare (1999), com modificações descritas em Viana et al. (2012). Os ensaios foram conduzidos em erlenmeyers de 250 mL (com volume útil de 200 mL), preenchidos com lodo anaeróbio oriundo do reator *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (UASB) existente na Estação de Tratamento de Esgotos da Violeira, localizada na cidade de Viçosa, MG, substrato (glicose), solução tampão e água destilada, na relação substrato/inóculo (S/I) igual a 4 (v/v). Foram adicionados micro e macronutrientes, para prevenir possível deficiência durante os testes. Também foi realizado teste com o frasco controle sem adição de substrato para mensurar a respiração endógena dos microrganismos. Após o fechamento dos frascos, foi realizada a injeção de gás composto de 100% de N₂ durante 4 minutos para expurga do oxigênio. Os testes foram conduzidos a 35±2°C sob agitação contínua (120 rpm) em incubadora (TECNAL, TE-420). O volume de biogás gerado foi monitorado diariamente em uma garrafa de *Mariotte* preenchida com solução NaOH a 5%, para medição específica de metano. A AME foi calculada pela inclinação máxima da curva de produção acumulada de metano, com auxílio do software estatístico R, versão 3.0.2 (Development Core 2013), para ajuste de modelo de regressão não linear, modelo de regressão logística. Para cada modelo, o coeficiente de determinação foi calculado, de forma a se avaliar o ajuste.

Potencial de Produção de Metano (PPM)

O potencial de produção de metano (PPM) foi calculado baseando-se na produção acumulada de metano após 30 dias de incubação e na massa de substrato utilizada nos testes. O PPM foi calculado de acordo com a Equação 1:

$$PPM = \frac{V_{30} - V_{controle\ 30}}{m_{0biomassa}} \quad \text{Equação 1}$$

Em que:

V₃₀ representa o volume de metano produzido no frasco contendo biomassa residual ao final de 30 dias (em litros); V_{controle30} é o volume de metano produzido pelo frasco controle (sem adição de substrato) ao final do mesmo tempo (em litros) e m_{0biomassa} é a massa inicial (em gramas) de biomassa no frasco.

Biodegradabilidade Anaeróbia

Os ensaios de biodegradabilidade anaeróbia da biomassa algal foram realizados sob as mesmas condições que os testes da AME, modificando-se, entretanto, o substrato (biomassa residual antes e após a extração lipídica ao invés de glicose). A Equação 2 foi usada para cálculo da biodegradabilidade:

$$BIO = \frac{DQO_{30} - DQO_{30\text{controle}}}{DQO_{\text{biomassa}}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Em que:

BIO é biodegradabilidade da amostra (%); DQO_{30} é o volume total de metano produzido no frasco contendo biomassa após 30 dias, em termos de DQO (g) (a 35°C, 0,395 litros de metano corresponde a 1g de DQO); $DQO_{30\text{controle}}$ é o volume total de metano produzido no frasco controle sem adição de substrato em termos de DQO (g) e DQO_{biomassa} é a massa inicial de biomassa (em gramas de DQO) adicionada a cada reator.

7.2.3. Análise energética

O desempenho energético do sistema de produção foi avaliado em termos da produtividade específica de biomassa, PB/EC (mg/kJ), definida como a produtividade de biomassa (PB, mg/L.d) por input energético (EC, kJ/L.d) (Pegallapati et al., 2014) e pela taxa energética líquida (*net energy ratio*, NER), que relaciona a energia total produzida e a energia total consumida pelo sistema, de acordo com a Equação 3:

$$NER = \frac{\sum \text{Energia produzida}}{\sum \text{Energia consumida}} \quad \text{Equação 3}$$

A energia produzida pode ser aferida em termos do conteúdo energético total da biomassa ou apenas em relação ao seu potencial de produção de lipídeos e/ou biogás. Como a operação do sistema foi realizada outdoor, considerou-se o consumo energético advindo da agitação do meio de cultivo, ou seja, do compressor de ar diafragmático para injeção de ar e mistura.

Quantificação do consumo energético

O consumo energético em cada operação (COP, kWh/dia) foi determinado de acordo com a Equação 4:

$$C_{OP} = \frac{24 \times P_{ot}}{1000} \quad \text{Equação 4}$$

Onde Pot é a potência, em W. Considerando a realização de 3 operações por mês, o consumo energético anual (CT, kJ/ano) pode ser determinado como demonstra a Equação 5:

$$C_T = C_{OP} \times \text{dias de operação no ano} \times 3600 \quad \text{Equação 5}$$

Quantificação da energia produzida a partir dos lipídeos e da produção de biogás

A produção anual de energia a partir da digestão anaeróbia da biomassa (EG, kJ/ano) e dos lipídeos (EL, kJ/ano) foi determinada a partir da produção anual lipídica e de biogás, considerando que: (i) o conteúdo energético de 1 L de lipídeos equivale a 35.133,33 kJ (Jorquera et al., 2010), (ii) a densidade de lipídeos totais é aproximadamente 0,9 kg/L (Jorquera et al., 2010), e (iii) 1m³ de biogás equivale a 23.400 kJ (valor médio do intervalo reportado por Chisti, 2007), de acordo com as Equações 6 e 7:

$$E_L = \frac{P_{L,anual}}{0,9} \times 35133,33 \quad \text{Equação 6}$$

Onde P_{L,anual} é a produção anual de lipídeos (kg/ano).

$$E_G = P_{G,anual} \times 23400 \quad \text{Equação 7}$$

Onde P_{G,anual} é a produção anual de biogás (m³/ano).

7.2.4. Manipulação dos dados e replicação experimental

Para cada efluente usado como meio de cultivo foram realizados testes em duplicata para cada análise energética (extração lipídica e digestão anaeróbia) e operações também em duplicata para as bateladas. Portanto, dados foram apresentados como média e desvio padrão, de forma a garantir a variabilidade experimental. Para as análises energéticas, teste-*t* foi aplicado a 5% de significância, com o objetivo de diferenciar estatisticamente valores médios de NER obtidos para cada rota energética, nomeadamente: i) lipídeos, ii) biogás antes da extração lipídica, iii) biogás após a extração lipídica, e iv) biogás + lipídeos.

7.3. Resultados e Discussão

7.3.1. Valorização energética

Lipídeos

Assim como houve pouca diferenciação da concentração algal entre os efluentes (Tabela 7.1), o teor lipídico também pouco variou. No entanto, a produtividade lipídica do

efluente primário foi superior, em mais que o dobro, à produtividade lipídica do efluente secundário, devido à maior produtividade de biomassa desse efluente. A Tabela 7.3 apresenta os dados da caracterização lipídica.

Tabela 7.3 - Lipídeos totais e produtividade lipídica de ambos os meios de cultivo (média e desvio padrão).

		Primário	Secundário
Lipídeos totais	%	7,0 (0,2)	6,1 (0,8)
	g/m ² .d	0,3	0,1
Produtividade lipídica*	mg/L.d	10,0	3,4

*Produtividade lipídica foi calculada com base na biomassa total (SSV). Fonte: Adaptado de Tango (2015).

Em comparação com diversas outras espécies, *Scenedesmus* sp. é considerada como uma espécie de grande capacidade de acúmulo de lipídeos e de alta produtividade lipídica (Griffiths e Harrison, 2009). A biomassa cultivada apresentou teores lipídicos similares, 7,0% e 6,1% para os efluentes primário e secundário, respectivamente. O cultivo em efluentes, com competição com outros microrganismos pode ter sido a causa do baixo acúmulo lipídico. De acordo com Mehrabadi et al. (2015), a principal razão pelo baixo acúmulo lipídico de biomassa cultivada em lagoa de alta taxa com água residuária é a composição da biomassa, que contém uma mistura de algas e bactérias. Como o teor lipídico das bactérias é tipicamente inferior a 10% (Brown et al., 1996), o conteúdo de lipídeos tende a ser reduzido e conseqüentemente o conteúdo energético da biomassa. Estudos com o cultivo do gênero *Scenedesmus* sp. em efluentes e FBR citaram teores lipídicos de 14,2-49,1% (Hodaifa et al., 2013) e 11,2-14,7% (Shen et al., 2015). A maior produtividade lipídica verificada no efluente primário, 10,0 mg/L.d, pode ser atribuída à sua maior produtividade de biomassa em relação ao efluente secundário, que atingiu 3,4 mg/L.d (Tabela 7.1). Tal fato pode estar relacionado às características do efluente primário (como disponibilidade de Ps, e elevada concentração de compostos orgânicos) que afetam diretamente a composição e quantidade da biomassa, não só algal como também bacteriana.

Resultados como o desse estudo reiteram a importância da produtividade de biomassa total para análise da produção lipídica. A produtividade lipídica compensou o baixo teor lipídico apresentado pela biomassa, apresentando valores de produtividades similares ou

até superiores aos reportados na literatura para cultivo de biomassa algal em FBR utilizando efluentes como meio de cultivo (Kim et al., 2007; Wang et al., 2010).

Biogás

A AME do lodo do reator UASB utilizado como inóculo para os testes anaeróbios foi de 0,01 gDQO/g STV.d (valor médio de cinco testes, com desvio padrão de 0,03). Esse valor é condizente com a literatura que utilizou lodo oriundo do tratamento de esgoto doméstico como inóculo para digestão anaeróbia, indicando condições saudáveis do inóculo para geração de biogás.

A Figura 7.1 apresenta o comportamento da geração de metano das biomassas estudadas ao longo do tempo de incubação.

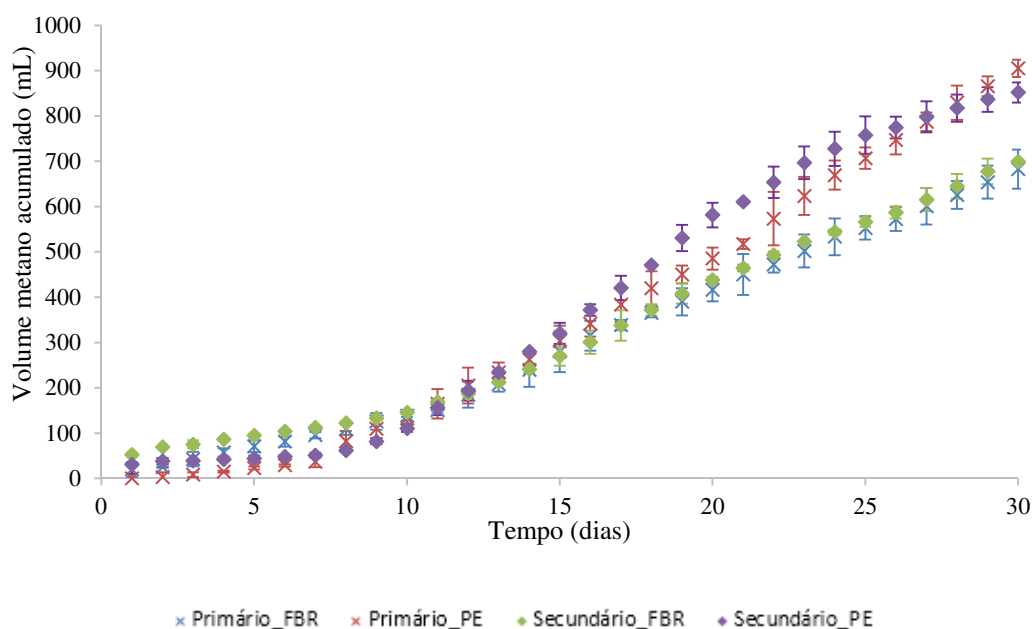


Figura 7.1 - Produção de metano ao longo do período de incubação para as biomassas antes e após a extração lipídica cultivadas em ambos os efluentes (média e desvio padrão).

A geração de biogás, de ambos os efluentes, apresentou comportamento polinomial de segunda ordem. Observou-se um período de adaptação de aproximadamente 10 dias, para então haver o incremento significativo da geração de biogás nas biomassas de ambos os efluentes. Para a eficiente digestão da biomassa algal, esse período é de grande relevância dada às características de difícil degradabilidade da biomassa, devido à composição (carboidratos como hemicelulose e celulose) da parede celular. Por outro lado, esse

período pode aumentar o tempo de detenção hidráulica requerido de um reator anaeróbio, representando custos de operação em uma maior escala.

Maiores produções de metano foram obtidas para biomassas após a extração lipídica de ambos os efluentes. A biomassa primária PE produziu 905,0 mL de metano, enquanto a biomassa secundária PE atingiu produção acumulada de 852,1 mL. Ao contrário do ocorrido com a biomassa secundária PE, não foi observada uma tendência de estabilização da produção do final de 30 dias de incubação para a biomassa primária PE. As biomassas brutas, oriundas do efluente secundário e primário, atingiram respectivamente, 699,5 e 682,5 mL de volume acumulado de metano.

A Tabela 7.4 apresenta os dados de biodegradabilidade anaeróbia e potencial de produção de metano para as biomassas de ambos os efluentes antes e após a extração lipídica.

Tabela 7.4 - Biodegradabilidade anaeróbia e PPM das biomassas de ambos os efluentes antes e após a extração lipídica (média e desvio padrão).

	Primário		Secundário	
	FBR	PE	FBR	PE
Biodegradabilidade anaeróbia (%)	25,1 (9,4)	22,7 (15,7)	43,1 (29,1)	21,6 (8,9)
PPM (m³ biogás/kg STV)	0,44 (0,2)	2,38 (1,7)	0,28 (0,11)	2,26 (0,9)

A biodegradabilidade das biomassas oriundas de ambos os efluentes foram similares, exceto para a biomassa bruta do efluente secundário. Maiores valores de biodegradabilidade anaeróbia para a biomassa pós lodos ativados podem estar relacionados com a menor complexidade da biomassa, com conteúdo de carboidratos e proteínas já parcialmente oxidado pelo sistema aeróbio de tratamento, se comparada com a biomassa pós flotor. Por outro lado, uma vez degradada essa biomassa de mais complexo conteúdo, maior é seu o potencial energético, ou seja, de produção de metano, o que explica o maior valor de PPM para a biomassa pós-flotador.

De acordo com pesquisa de literatura, esse é o primeiro estudo com produção de biogás a partir de biomassa algal cultivada em efluentes da indústria de processamento de carnes. Os resultados estão em consonância com o descrito em literatura e foram comparados com outros estudos que de certa forma refletiram alguma condição semelhante com o presente estudo. Caporgno et al. (2015) cultivaram *Chlorella vulgaris* e *Chlorella kessleri*

em esgoto doméstico bruto e utilizaram como sistema de produção seis FBRs coluna de bolhas de 0,05L de volume cada. Após o consumo total de nitrogênio, reportaram produções de metano de $0,35 \pm 3 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{g STV}$ e $0,42 \pm 2 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{g STV}$, para *C. kessleri* and *C. vulgaris* respectivamente. Ras et al. (2011) estudando biomassa de *Chlorella vulgaris* cultivada em FBR com meio sintético obtiveram uma produção de $0,24 \text{ m}^3/\text{kg STV}$ de metano.

Os elevados valores de PPM para as biomassas pós extração lipídica, independente do meio de cultivo, reiteram a extração lipídica como pré-tratamento da biomassa algal, diferentemente do efeito tóxico dos solventes reportado por Ehimen et al. (2009) e Yun et al. (2014). Os valores aqui reportados de PPM foram superiores aos relatados por outros estudos que utilizaram biomassa residual pós-extração lipídica, no entanto cultivada em meio sintético e de composição axênica, para digestão anaeróbia. Ramos-Suárez e Carreras (2014) obtiveram uma produção de $0,21 \text{ m}^3/\text{kg STV}$ para biomassa de *Scenedesmus* sp. após a extração lipídica. A digestão anaeróbia da biomassa da mesma espécie, após a extração de lipídeos, resultou em $0,40 \text{ m}^3 \text{ biogás}/\text{kg STV}$ e $0,273 \text{ m}^3 \text{ CH}_4/\text{kg STV}$, evidenciando também a eficácia da utilização da extração de lipídeos como pré-tratamento (Alzate et al., 2014).

7.3.2. Viabilidade energética

Para a produção de biocombustíveis de microalgas em larga escala, o consumo energético do cultivo deve ser minimizado para otimizar a produção líquida de energia. Para sustentar a produção de energia em um sistema, a NER deve ser maior que 1 e a mais elevada possível. Nesse estudo, o principal objetivo foi comparar diferentes meios de cultivos e rotas energéticas para a produção de biomassa algal em FBR coluna de bolhas. A Tabela 7.5 apresenta os dados de NER e produtividade específica de biomassa para todas as três rotas de aproveitamento energético.

Tabela 7.5 - NER e produtividade específica de biomassa para as rotas estudadas de aproveitamento energético.

	Primário		Secundário	
	FBR	PE	FBR	PE
NER lipídeos	8,15x10 ⁻⁴ a*		2,90x10 ⁻⁴ c*	
	(4x10 ⁻⁴)		(3x10 ⁻⁵)	
NER biogás	8,02x10 ⁻³ b*	1,23x10 ⁻³ a*	1,64 x10 ⁻³ d*	3,35x10 ⁻⁴ c*
	(3x10 ⁻³)	(3x10 ⁻⁴)	(6x10 ⁻⁴)	(1x10 ⁻⁴)
NER lipídeos + biogás		2,04 x10 ⁻³ a*		6,26 x10 ⁻⁴ c*
		(7x10 ⁻⁵)		(1,65x10 ⁻⁴)
PB/EC (mg/kJ)	2,98x10 ⁻¹	2,34x10 ⁻¹	1,22x10 ⁻¹	4,78x10 ⁻² (0)
	(1x10 ⁻¹)	(0)	(6 x10 ⁻³)	

* Teste-t foi realizado a 5% de significância; valores médios seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

De acordo com a Tabela 7.5, observa-se que nesse estudo nenhuma taxa de produção líquida de energia foi superior a 1. Os valores de NER obtidos foram semelhantes, independente da origem do efluente. A NER dos lipídeos variou entre 0,000815 e 0,00029 para biomassa oriunda do efluente primário e secundário, respectivamente. Jorquera et al. (2010) apresentaram valores de NER dos lipídeos de 0,07 para FBR tubular.

Para a produção de biogás, a taxa líquida apresentou valor mínimo de 0,000335 para a biomassa pós-extração cultivada com efluente pós-lodos ativados (FBR_PE secundário) e valor máximo de 0,00802 para biomassa bruta cultivada em efluente primário. Ressalta-se o ganho de energia com a produção do biogás após a extração lipídica. Os valores de NER lipídeos + biogás foram estatisticamente equivalentes aos valores NER lipídeos para ambos os efluentes ($p < 0,05$). Esse resultado indica o pouco ganho energético acumulado da etapa de extração lipídica. Além disso, é possível afirmar sobre a não viabilidade energética da biomassa produzida nesse estudo para o aproveitamento lipídico, devido principalmente ao baixo conteúdo lipídico da biomassa. A geração de biogás da biomassa bruta, independente do meio de cultivo, foi a rota energética mais favorável ($p < 0,05$). De acordo com Sialve et al. (2009), a extração de lipídeos de biomassa com conteúdo lipídico inferior a 40% combinada com a digestão anaeróbia, não é efetiva em termos de custos e energia. Para os autores, a digestão da biomassa bruta também se mostrou como a melhor alternativa. Stum e Lamer (2011) concluíram que a combustão direta da biomassa algal foi mais viável do que a produção de biocombustíveis, especialmente quando o conteúdo lipídico da biomassa for de 10%. Bruhn et al. (2011) avaliaram o potencial energético da macroalga *Ulva lactuca* e destacaram que a digestão anaeróbia da

biomassa úmida se pareceu a mais promissora rota, se comparada com a combustão, devido principalmente ao elevado conteúdo de umidade, cinzas e álcali na biomassa.

Adicionalmente, o desempenho dos sistemas em relação à produtividade de biomassa por input energético (P_B/E_C) foi também avaliado. O maior valor obtido foi de 0,298 mg/KJ para a biomassa bruta oriunda do cultivo em efluente primário e o menor de 0,0478 mg/KJ para biomassa pós-extração lipídica cultivada em efluente secundário. Em se tratando de FBR colunas de bolhas, segundo Fuentes-Grünwald et al. (2013), os melhores resultados de P_B/E_C foram obtidos com níveis ótimos de luz e agitação. Baixos índices de produtividade específica em FBR coluna de bolhas, como os obtidos no presente estudo, estão relacionados com a preocupação única e exclusiva em relação à otimização da produtividade (PB), sendo o gasto energético para tal produção ignorado (Pegallapati et al., 2014).

O sistema de produção FBR coluna de bolha do presente estudo apresentou baixo desempenho energético, tanto para a produção de lipídeos quanto para o biogás, independente do meio de cultivo avaliado. A partir da Tabela 7.5, verifica-se a necessidade de intervenção no sistema produtivo de forma a melhorar o desempenho energético. O aumento da unidade produtiva com maior capacidade de produção de biomassa e a diminuição no gasto energético, através da utilização de equipamentos com menor consumo energético (compressor de ar diafragmático) seriam opções para aumentar os valores de NER e P_B/E_C do sistema. Outra possível causa do baixo desempenho energético apresentado pelo sistema pode estar relacionada ao cultivo em efluentes, o que torna a produção algal menos eficiente devido à competição com outros organismos por espaço e nutrientes, e levando, por exemplo, ao baixo acúmulo lipídico.

7.4. Conclusões

O efluente primário após unidade de flotação, apresentou maiores produtividades de lipídeos e metano, quando comparado com o efluente secundário depois da unidade de lodos ativados. Os elevados valores de PPM para as biomassas pós-extração lipídica em comparação com a biomassa bruta, reiteram a extração lipídica como pré-tratamento da biomassa algal para melhor eficiência do processo de digestão anaeróbia.

Houve um ganho de energia com a produção do biogás após a extração lipídica, no entanto nenhuma das rotas energéticas apresentou NER superior a 1, devido

principalmente ao alto consumo energético do sistema de produção. A partir da análise energética, conclui-se pelo pouco ganho energético acumulado da etapa de extração lipídica, sendo possível afirmar sobre a não viabilidade energética da biomassa produzida nesse estudo para o aproveitamento lipídico. A geração de biogás da biomassa bruta, independente do meio de cultivo, foi a rota energética mais favorável.

7.5. Referências Bibliográficas

Alzate ME, Muñoz R, Rogalla F, Fdz-Polanco F, Pérez-Elvira SI. Biochemical methane potential of microalgae biomass after lipid extraction. *Chemical Engineering Journal*, 243, pp 405-410, 2014.

Assemany, P.P., Calijuri, M.L., Santiago, A.F., do Couto, E.A., Leite, M. O., Sierra, J.J.B. Effect of solar radiation on the lipid characterization of biomass cultivated in high-rate algal ponds using domestic sewage. *Environmental Technology*, 35(18), pp 2296-2305. 2014.

Brown, M.R., Barret, S.M., Volkman, J.K., Nearhos, S.P., Nell, J.A., Allan, G.L., Biochemical composition of new yeast and bacteria evaluated as food for bivalve aquaculture. *Aquaculture*, 143, pp 341-360. 1996.

Bruhn, A., Dahl, J., Nielsen, H.B., Nikolaisen, L., Rasmussen, M.B, Markager, S., Olesen, B., Arias, C., Jensen, P.D. Bioenergy potential of *Ulva lactuca*: Biomass yield, methane production and combustion. *Bioresource Technology*, 102, pp 2595-2604. 2011.

Caporgno, M.P., Taleb, A., Olkiewicz, M., Provost, J., Legrand, J., Bengoa, C. Microalgae cultivation in urban wastewater: Nutrient removal and biomass production for biodiesel and methane. *Algal Research*, 10, pp 232-239. 2015.

Chisti Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, 26(3), pp 126-131. 2007.

Cromar, N.J., Fallowfield, H.J. Effect of nutrient loading and retention time on performance of high rate algal ponds. *Journal of Applied Phycology*, 9, pp 301-309. 1997.

Development Core Team R. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation of Statistical Computing, Vienna. 2013.

Ehimen, E.A., Connaughton, S., Sun, Z., Carrington, C.G. Energy recovery from lipid extracted transesterified and glycerol co-digested microalgae biomass. *GCB Bioenergy*, 1, pp 371-81. 2009.

Fuentes-Grünewald, C.; Garcés, E.; Alacid, E.; Rossi, S.; Camp, J. Biomass and lipid production of dinoflagellates and raphidophytes in indoor and outdoor photobioreactors. *Marine Biotechnology*, 15, pp 37- 47. 2013.

Griffiths M.J., Harrison S.T.L. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 21(5), pp 493-507. 2009.

- Harun, R., Davidson, M., Doyle, M., Gopiraj, R., Danquah, M., Forde, G. Techoeconomic analysis of an integrated microalgae photobioreactor, biodiesel and biogas production facility. *Biomass Bioenergy*, 35, pp 741-747. 2011.
- Hodaifa, G., Sánchez, S., Martínez, M.E., Órpez, R. Biomass production of *Scenedesmus obliquus* from mixtures of urban and olive-oil mill wastewaters used as culture medium. *Applied Energy*, 104, pp 345-352. 2013.
- Jawed M, Tare V. Microbial composition assessment of anaerobic biomass through methanogenic activity tests. *Water S.A.*, 25, pp 345-350. 1999.
- Jorquera, O., Kiperstok, A., Sales, E.A., Embiruçu, M., Ghirardi, M.L. Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource Technology*, 101 (4), pp 1406-1413. 2010.
- Ketheesan, B., Nirmalakhandan, N. Feasibility of microalgal cultivation in a pilot-scale airlift-driven raceway reactor. *Bioresource Technology*, 108, pp 196–202. 2012.
- Kim, M.K., Park, J.W., Park, C.S., Kim, S.J., Jeune, K.H., Chang, M.U., Acreman, J. Enhanced production of *Scenedesmus* spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. *Bioresource Technology*, 98, pp 2220-2228. 2007.
- Li W.K.W. Temperature adaptation in phytoplankton: cellular and photosynthetic characteristics, in: P.G. Falkowski (ed), *Primary productivity in the sea*. Plenum press, New York, 1980. pp 259–279.
- Mehrabadi, A., Craggs, R., Farid, M.M. Wastewater treatment high rate algal ponds (WWT HRAP) for low-cost biofuel production. *Bioresource Technology*, 184, pp 202-14. 2015.
- Pegallapati, A. K., Arudchelvam, Y., Nirmalakhandan, N. Energetic Performance of Photobioreactors for algal cultivation. Brief Review. *Environmental Science Technonology Letters*, 1 (1), pp 2-7. 2014.
- Poldy, F. Net energy and strategic decision-making. *Biofuels, Bioproducts and Biorrefining*, 2, pp 389-92. 2008.
- Ramos-Suárez, J., Carreras, N. Use of microalgae residues for biogas production. *Chemical Engineering Journal*, 242, pp 86-95. 2014.
- Ras, M., Lardon, L., Bruno, S., Bernet, N., Steyer, J.P. Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 102, pp 200-206. 2011.
- Razon, L.F., Tan, R.R. Net energy analysis of the production of biodiesel and biogas from the microalgae: *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis*. *Applied Energy*, 88, pp 3507-3514. 2011.

- Schenk, P.; Thomas-Hall, S.; Stephens, E.; Marx, U.; Mussgnug, J.; Posten, C. Second generation biofuels: high efficiency microalgae for biodiesel production. *BioEnergy Research*, 1, pp 20-43. 2008.
- Shen, Q-H., Jiang, J-W., Chen, L-P., Cheng, L-H., Xu, X-H., Chen, H-L., Effect of carbon source on biomass growth and nutrients removal of *Scenedesmus obliquus* for wastewater advanced treatment and lipid production. *Bioresource Technology*, 190, pp 257-263. 2015.
- Sialve, B., Bernet, N., Bernard, O. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances*, 27, pp 409-16. 2009.
- Sturm, B.S.M., Lamer, S.L. An energy evaluation of coupling nutrient removal from wastewater with algal biomass production. *Applied Energy* 88, pp 3499-3506. 2011.
- Tango, M.D. Cultivo de microalgas em efluentes da indústria de beneficiamento de carnes em fotobiorreator do tipo coluna de bolhas. Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil. Dissertação. 100p. Viçosa, 2015.
- Tredici, M.R. Mass production of microalgae: photobioreactors. In: Richmond, A. (ed.) *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, pp 178-214. Blackwell Science, Iowa, 2007.
- Ugoala, E., Ndukwe, G., Mustapha, K.B., Ayo, R.I. Constraints to large scale algae biomass production and utilization. *Journal of Algal Biomass Utilization*, 3, pp 14-32. 2012.
- Viana, M.B., Freitas, A.V., Leitão, R.C., Santaella, S.T. Biodegradability and methane production potential of glycerol generated by biodiesel industry. *Water Science Technology*, 66 (10), pp 2217-2222. 2012.
- Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., Wang, Y., Ruan, R. Cultivation of green algae *Chlorella sp.* in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied Biochemical Biotechnology*, 162(4), pp 1174-86. 2010.
- Woertz, I., Feffer, A., Lundquist, T., Nelson, Y. Algae grown on dairy and municipal wastewater for simultaneous nutrient removal and lipid production for biofuel feedstock. *Journal of Environmental Engineering*, 135(11), pp 1115–1122. 2009.
- Yun, Y.M., Cho, S.K., Jung, K.W., Kim, M.S., Shin, H.S., Kim, D.H. Inhibitory effect of chloroform on fermentative hydrogen and methane production from lipid-extracted microalgae. *Hydrogen Energy*, 39, pp 19256-19261. 2014.

Capítulo 8 - COMPLEMENTARIEDADE DE SUBSTRATOS E INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTIVO NA DIGESTÃO ANAERÓBIA DE BIOMASSA ALGAL

Resumo

Objetivou-se aplicar o conceito de complementariedade de substratos, demonstrando que a biomassa algal cultivada em efluentes (efluente doméstico e efluente da indústria cervejeira) e a água ruça podem ser anaerobiamente digeridos sem qualquer pré-tratamento ou correção do substrato, permitindo a estabilidade do processo e a melhoria do desempenho da unidade de digestão. Para a biomassa produzida em esgoto doméstico a substituição de 10% do seu volume pela água ruça resultou no melhor desempenho tendo-se obtido um rendimento de 0,15 m³ CH₄/kg sólidos voláteis e um incremento de 36% na produção de biogás, se comparado com o rendimento fornecido pela digestão somente da biomassa algal. O elevado teor de cinzas e o baixo conteúdo de carboidratos foram os principais fatores a serem superados com a adição do substrato complementar. Para a biomassa algal produzida no efluente da cerveja, verificou-se que proporções de até 20% de água ruça podem ser utilizadas, sendo, no entanto, necessário um período de adaptação por parte do inóculo. Devido à sua composição mais balanceada, a biomassa da indústria cervejeira, por si só, apresentou o melhor rendimento na produção de metano, de 0,21 m³ CH₄/kg sólidos voláteis, 16% superior do que quando digerida juntamente com 10% de volume do substrato água ruça. O melhor desempenho do processo de digestão anaeróbia da biomassa algal com outro substrato não foi relacionável com a razão carbono-nitrogênio utilizada. Portanto conclui-se que outras características influenciaram no processo anaeróbio da biomassa algal, como a constituição química da biomassa algal, associada principalmente ao tipo de meio em que foi cultivada.

Palavras-chave: água ruça, aproveitamento de resíduos, biogás, microalgas, substrato complementar.

8.1. Introdução

A matéria orgânica submetida à digestão anaeróbia precisa atender a determinadas condições para que o rendimento do processo seja satisfatório. Assim, a determinação da composição da biomassa é uma maneira de se conhecer o potencial da digestão. Segundo Sialve et al. (2009), a composição mineral da célula algal é suficiente para atender as

demandas nutricionais dos microrganismos responsáveis pelo processo de degradação. Além de carbono, nitrogênio e fósforo, que são os componentes principais da composição da biomassa algal, os oligo nutrientes como ferro, cobalto e zinco são também encontrados nas células algais e conhecidos por estimular a atividade metanogênica (Speece, 1996).

Apesar da composição celular ser muito afetada pelas condições ambientais de cultivo das espécies, de acordo com Brown et al. (1997), as microalgas apresentam a composição celular intimamente variável de acordo com a espécie, apresentando vulgarmente concentrações de 6 a 52% de proteínas, 7 a 23 % de lipídeos e 5 a 23% de carboidratos. Para diversas espécies, a elevada proporção de proteínas é caracterizada por uma reduzida relação carbono-nitrogênio (C/N), principalmente se comparada com plantas terrestres. Essa relação varia de 4 a 9, dependendo da espécie de microalga (Geider e Roche, 2002), enquanto que em biomassa de plantas terrestres, essa aumenta para 16 (Elser et al., 2000). De acordo com Speece (1996), relações C/N menores que 20 são consideradas desbalanceadas para a digestão anaeróbia, levando principalmente à formação de amônia e consequentemente à inibição do processo.

A co-digestão da biomassa algal é atualmente apontada como uma das alternativas para superar as limitações causadas pela baixa relação C/N da biomassa algal durante a digestão anaeróbia. No entanto, mais do que simplesmente corrigir o substrato para que esse atinja os teores ideais de nutrientes, a digestão simultânea de dois substratos pode agregar outras vantagens como a diminuição da concentração de compostos tóxicos, a auto-regulação do pH e concentrações mais adequadas de alcalinidade no interior do reator podem ser atingidas. Vantagens que são essenciais para o sucesso da digestão anaeróbia por permitirem o aumento da carga aplicada e melhorarem o rendimento da produção de biogás (Sosnowaki et al., 2003). Adicionalmente, uma maior estabilidade do processo é conseguida e a valorização energética de mais de um resíduo é possibilitada, consistindo numa solução que resolve simultaneamente os problemas associados a ambos os substratos. Essa abordagem pode ser definida como uma estratégia holística que recorre ao conceito de complementariedade de substratos, a qual é aplicada com vistas à redução dos passos operacionais, e, consequentemente, dos custos, pela eliminação de etapas relacionadas com correções químicas e pré-tratamentos aplicados ao substrato (Marques, 2001; Sampaio, 2011; Sampaio et al., 2011).

Águas residuárias da indústria do azeite, como a água ruça, são uma fonte significativa de poluição de corpos hídricos em áreas de atividades de processamento do azeite. Os países mediterrâneos, incluindo Grécia, Portugal, Espanha e Itália, são os principais produtores mundiais de azeite cujo impacto ambiental negativo se deve ao elevado conteúdo orgânico e à presença de compostos aromáticos, como os fenóis, associados a lipídeos complexos que em conjunto funcionam como inibidores do processo de degradação biológica. A utilização dos efluentes da indústria olivícola como fonte de energia e nutrientes vem sendo tratada como alternativa atrativa para o tratamento e reaproveitamento desse efluente. Dessa forma, a adição de um substrato complementar ao efluente da produção de azeite pode ser vantajosa, uma vez que diminui as concentrações dos compostos tóxicos e provém níveis de pH, alcalinidade e nutrientes necessários para uma eficiente digestão anaeróbia (Gonçalves et al., 2012).

Neste estudo, objetivou-se aplicar o conceito de complementariedade de substratos para avaliar se a biomassa algal, cultivada em efluentes e a água ruça podem ser anaerobiamente digeridas de forma a evitar qualquer pré-tratamento ou correção dos substratos em causa. Nestas condições, avaliou-se a estabilidade do processo e o desempenho da unidade de digestão anaeróbia quando digeridos ambos os substratos em mistura. Para o efeito, foram realizados ensaios anaeróbios para testar duas biomassas de microalgas, produzidas em distintos efluentes, com o objetivo adicional de avaliar o efeito da composição química algal e da complementariedade de cada um dos substratos no processo de digestão anaeróbia.

8.2. Materiais e Métodos

8.2.1. Substratos e Inóculo

Os testes anaeróbios utilizaram três substratos:

- i) biomassa algal liofilizada e moída (moinho de discos, N.V. Tema), cultivada em lagoa de alta taxa (LAT) no Brasil com esgoto doméstico previamente tratado em reator *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (UASB) e denominada de **BE (biomassa de esgoto)**. As espécies abundantes de microalgas nessa biomassa foram *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* e *Scenedesmus arvernensis*;
- ii) biomassa algal úmida, cultivada em LAT em Portugal com efluente secundário previamente tratado em reator anaeróbio BIOPAQ@IC da indústria de cerveja

SCC-Sociedade Central de Cervejas e Bebidas S.A., localizada na cidade de Vialonga, Portugal. Nesse estudo, denominada de **BC (biomassa de cerveja)**. As espécies abundantes nessa biomassa foram *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris*;

- iii) **água ruça (AR)** coletada em uma planta de produção de azeite de oliva equipada com um processo de extração de três estágios, localizada na cidade de Rio Maior, Portugal.

O inóculo utilizado foi coletado no mesmo digestor anaeróbio BIOPAQ®IC, utilizado no tratamento dos efluentes da indústria de cerveja.

8.2.2. Digestão anaeróbia: modo de funcionamento e configuração experimental

O experimento foi realizado em batelada sob condições mesofílicas de temperatura ($37 \pm 2^\circ\text{C}$), em reatores encapsulados de vidro com 71,5 mL de volume total e 40 mL volume útil.

De acordo com os objetivos do trabalho, foram delineados dois ensaios: Ensaio 1 e Ensaio 2, nos quais se realizaram misturas de AR, em proporções de 0 a 30% (v/v), com os substratos BE e BC. No Ensaio 1, testaram-se 7 condições experimentais, nos quais houve a adição de 30% (v/v) de inóculo e de 70% (v/v) de substrato (AR, BE, AR 5-30% + BE 65-40% v/v), com a mistura inóculo e substratos totalizando 100%.

No Ensaio 2, foram testadas 9 condições experimentais, utilizando as proporções volumétricas de inóculo e substratos (AR, BE, AR 5-20% + BE 65-50% v/v, BC, AR 5-20% + BC 65-50% v/v) de forma a totalizarem um total de 100%. Na Tabela 8.1 é apresentada a descrição detalhada dos ensaios efetuados.

Tabela 8.1 - Descrição dos ensaios de digestão anaeróbia realizados em batelada.

Ensaio	Condição experimental	Relação Substrato/Inóculo (base STV)	Relação C/N*
1	1	Inóculo (I)	-
	2	I+70%BE	0,42
	3	I+70%AR	1,65
	4	I + 65%BE + 5%AR	0,51
	5	I + 60%BE + 10%AR	0,60
	6	I + 40%BE + 30%AR	0,95
	7	I + 40%H ₂ O + 30%AR	0,71
2	1	Inóculo (I)	-
	2	I + 70%BE	0,51
	3	I + 60%BE +10%AR	0,68
	4	I + 55%BE +15%AR	0,76
	5	I + 50%BE + 20%AR	0,84
	6	I + 70%BC	0,51
	7	I + 60%BC + 10%AR	0,68
	8	I + 55%BC + 15%AR	0,76
	9	I + 50%BC + 20%AR	0,84

* Para o cálculo, considerou-se o nitrogênio total kjeldahl (NTK) como medida de nitrogênio e demanda química de oxigênio total (DQOt) como medida de carbono. A quantidade de carbono foi corrigida estequiometricamente através das massas molares de carbono e oxigênio, uma vez que DQO é expressa em mg O₂/L. BE=biomassa cultivada no esgoto doméstico; BC=biomassa cultivada no efluente da indústria cervejeira; AR=água ruça; STV=sólidos totais voláteis.

Como o substrato BE se apresentava liofilizado, foi necessário ressuspendê-lo, tendo sido preparada uma solução de 12,0 g STV/L dessa biomassa com água destilada. A solução foi usada de acordo com concentrações tipicamente obtidas na colheita e separação da biomassa algal por sedimentação gravitacional (vide Tabela 6.1, capítulo 6).

Todos os substratos foram manipulados sob um ambiente anaeróbio, através de varrimento de corrente de N₂ gasoso. Antes do fechamento dos reatores com rolhas de silicone e cápsulas de alumínio, a expurga do *headspace* de cada reator foi também realizada para garantir um ambiente anaeróbio. Importante ressaltar que não houve nenhuma adição de nutrientes ou de reagentes para ajuste de pH. Em ambos os ensaios, todas as condições experimentais foram realizadas em triplicata, totalizando 21 unidades de digestão no Ensaio 1 e 27 unidades no Ensaio 2.

Os ensaios tiveram duração de 35 dias, durante os quais a leitura da produção de biogás foi realizada diariamente, por volta do meio dia, através de um transdutor de pressão

(Centrepoint Electronics), previamente calibrado. Uma curva de calibração foi ajustada através de regressão linear simples, relacionando a pressão (mV) no interior dos frascos com o volume (mL) de ar injetado no *headspace* do reator. Um fator de calibração foi calculado para contemplar a conversão dos valores obtidos a 37 °C para as condições normais de temperatura e pressão (CNTP).

8.2.3. Métodos analíticos e cromatográficos

A caracterização do substrato complementar água ruça, do inóculo anaeróbio, do afluente (não digerido) e efluente (após digestão) de cada uma das unidades de digestão foi realizada de acordo com as disposições de APHA (2012) para as seguintes variáveis: alcalinidade total, sólidos totais (ST), sólidos totais voláteis (STV), sólidos totais fixos (STF), sólidos suspensos totais (SST), sólidos suspensos voláteis (SSV), sólidos suspensos fixos (SSF), demanda química de oxigênio total e solúvel (filtrada a 0,45 µm) (DQOt e DQOs), nitrogênio amoniacal (N-NH₃), nitrogênio total kjeldahl (NTK). Fenóis totais foram contabilizados através do método de Singleton e Rossi (1965) reduzido e os resultados expressos em mg de ácido cafeico/L. Os ácidos orgânicos voláteis (AOVs) foram determinados após filtração a 0,2 µm por *high-performance liquid chromatography* (HPLC), através de equipamento Agilent – 1100, equipado com coluna Aminex HPX87H. As condições de análises foram as seguintes: tempo de corrida de 60 minutos, fluxo de 0,6 mL/minuto, injeção de 20 µL de amostra e temperatura de 50 °C. Para quantificação dos ácidos presentes, as áreas dos picos foram comparadas com padrões injetados a cada análise. pH e potencial redox também foram medidos antes e após a incubação, por meio do equipamento InoLab WTW. Kits comerciais foram utilizados para determinação de fósforo (Phosver 3-powder pillows, Hach) usando espectrofotômetro (DR/2010, Hach). Amostras foram filtradas a 0,45 µm e os resultados expressos em mg/L de PO₄³⁻ (fosfato) e de P₂O₅ (pentóxido de fósforo).

A caracterização dos substratos, BE e BC, foi realizada por meio da determinação da composição química das biomassas algais. Para tal objetivo, analisou-se o teor de cinzas, umidade, proteínas, carboidratos e lipídeos em ambas as biomassas. Para isso, a BC que foi utilizada úmida nos testes anaeróbios foi seca em liofilizador (HetoPowerDry LL 3000, Thermoscientific). Os carboidratos presentes na biomassa foram determinados a partir de hidrólise ácida quantitativa, e seu teor mensurado pelo método do reagente fenol-sulfúrico. O teor de lipídeos foi determinado pelo método de extração soxhlet.

Anteriormente à extração, a biomassa seca foi pré-tratada em moinho de bolas vibratório (MM400, Retsh) durante 3 minutos e 50 segundos a 25 s^{-1} . Para extração dos lipídeos neutros, o solvente hexano 99% foi adicionado, tendo a extração duração de 6 horas. Os lipídeos de membrana foram extraídos com etanol a 96%, durante 3 horas. A quantificação foi realizada por gravimetria, após evaporação dos solventes em rotavapor (R200, Buch) com banho termostático. A determinação do teor de proteínas foi realizada pelo método de nitrogênio total kjeldahl (NTK), usando um fator de conversão de $6,25\text{ g g}^{-1}$ do conteúdo de nitrogênio em proteína (AOAC, 2000). O teor de umidade foi determinado pela pesagem da amostra após secagem a 105 °C até massa constante. O teor de cinza foi mensurado após combustão da amostra em mufla a 550 °C , durante 1 hora.

A composição do biogás nas unidades de digestão foi determinada semanalmente por cromatografia gasosa. O equipamento utilizado foi o Varian 430-GC, equipado com detector de condutividade térmica e uma coluna *Varian Capillary Column Select™ Permanent Gases/CO2 HR - Malsieve 5 A Parabond Q Tandem #CP7430*. As temperaturas na coluna, injetor e detector foram 50 , 80 e 120 °C , respectivamente. A temperatura do filamento foi de 220 °C e a pressão do injetor de 13 Psi . O gás hélio foi utilizado como gás de arraste (52 mL min^{-1}). A injeção utilizada no cromatógrafo foi de $0,5\text{ mL}$ de biogás. Para quantificação dos gases gerados, áreas dos picos foram comparadas com padrões gasosos mistos injetados a cada análise. Todas as análises cromatográficas foram realizadas em duplicata. O biogás foi amostrado por utilização de uma seringa de vidro de alta precisão, especial para gases (1 mL de volume, *Pressure Lok®*, USA).

8.3. Resultados e Discussão

8.3.1. Substratos e inóculo

Na Tabela 8.2 são apresentadas as características químicas e físicas do inóculo anaeróbico e do substrato AR.

Tabela 8.2 - Caracterização do substrato água ruça e do inóculo utilizado nos testes de digestão anaeróbia.

Variável	Unidade	Água Ruça	Inóculo anaeróbio
pH		4,76	6,99
Alcalinidade total	gCaCO ₃ /L	1,16	-
DQOs	g/L	47,6 (0)	-
DQOt	g/L	83,1 (2,4)	58,3 (7,7)
NTK	g/L	0,47 (0)	3,8
N-NH₃	g/L	ND	0,445 (0,1)
PO₄⁻³	g/L	0,74	-
P₂O₅	g/L	0,55	-
ST	g/L	58,5 (0,2)	65,0 (1,4)
STV	g/L	38,7 (0,3)	54,6 (1,2)
STV/ST	%	66,1 (0,8)	84,1 (0,04)
SST	g/L	31,2 (3,8)	-
SSV	g/L	27, 6 (3,0)	-
Fenóis totais	g eq ac. cafeico/L	6,71 (0,32)	-

ND = não detectado, - = não realizado. Valores médios e desvio padrão entre parênteses. DQOt=demanda química de oxigênio total; DQOs=demanda química de oxigênio solúvel; NTK=nitrogênio total kjeldhal; N-NH₃=nitrogênio amoniacal; ST=sólidos totais; STV=sólidos totais voláteis; SST=sólidos suspensos totais; SSV=sólidos suspensos voláteis; PO₄⁻³-fosfato; P₂O₅-pentóxido de fósforo.

Água Ruça. A AR se caracterizou como um substrato líquido com material em suspensão, de coloração amarronzada e odor forte e característico da presença de frações de azeite. Os compostos fenólicos presentes na AR são classificados como metabólitos secundários envolvidos nas funções de defesa da oliveira que neste substrato se apresentaram em concentrações de fenóis totais de 6,7 g/L. Estes compostos juntamente com os lipídeos são os responsáveis por conferirem toxicidade à AR, devido às suas características recalcitrantes e tóxicas para o meio ambiente e a maioria dos fungos e bactérias. Além da presença de compostos tóxicos, a digestão anaeróbia da AR é considerada como um processo problemático devido à elevada carga orgânica, baixa alcalinidade, valores ácidos de pH, baixo conteúdo de nitrogênio e, ainda, devido à sazonalidade da sua produção. A AR utilizada no presente estudo era ácida, com um valor de pH médio inferior a 5. A elevada concentração de matéria orgânica desse substrato foi confirmada pelos elevados valores obtidos de DQOt (83 g/L), como apresentado na Tabela 8.2. Aproximadamente 60% da DQOt desse substrato representava a fração solúvel da matéria orgânica (DQOs) indicando que apenas esta fração é de mais fácil degradação. A totalidade da presença de nitrogênio nesse substrato se deu na forma de nitrogênio orgânico, uma vez que o nitrogênio amoniacal não foi detectado.

Inóculo. O lodo anaeróbio, utilizado como inóculo, possuiu aspecto granular, com grânulos densos e bem formados. Apresentou 84% de material volátil em sua composição (Tabela 8.2), valor que infere sobre a quantidade presente de biomassa bacteriana ativa responsável pelo processo de digestão anaeróbia. Este inóculo foi ainda caracterizado por possuir uma elevada concentração de matéria orgânica e um elevado conteúdo de nitrogênio total (NTK), com uma maior contribuição por parte do nitrogênio orgânico em detrimento ao nitrogênio amoniacal.

Na Tabela 8.3 é apresentada a composição química dos substratos BC e BE.

Tabela 8.3 - Composição química dos substratos utilizados nos testes anaeróbios.

Composição (%)	Biomassa de Cerveja	Biomassa de Esgoto
Lipídeos neutros	14,9 (0,14)	11,7 (1,6)
Lipídeos de membrana	3,0 (0,75)	9,9 (1,7)
Lipídeos totais	17,9 (0,61)	21,6 (2,6)
Carboidratos	30,2 (0,53)	3,6 (0,79)
Proteínas	31,4 (0,04)	26,3 (4,7)
Cinzas	15,5 (0,04)	40,0 (8,1)
Umidade	--	7,1 (1,1)

Valores médios e desvio padrão entre parênteses.

Biomassa da indústria cervejeira e Biomassa de esgoto doméstico. Apesar de pequenas diferenças na comunidade fitoplanctônica, podemos observar na Tabela 8.1, que o meio de cultivo utilizado na produção da biomassa afigurou-se como determinante na composição química das biomassas algais. Destaca-se o substrato BC com 30% de seu conteúdo constituído por carboidratos, refletindo a elevada quantidade de açúcares presente no meio de cultivo devido ao processo produtivo da cerveja. O substrato BE, por sua vez, apresentou um conteúdo de carboidratos de apenas 3,6% e um elevado teor em cinzas (40%) que provavelmente foi devido à configuração da estação de tratamento de esgoto doméstico onde o meio de cultivo foi coletado. A ausência de um tratamento preliminar com desarenador, para remoção de areia à montante do reator UASB, se apresentou como a principal causa do elevado teor de cinzas nessa biomassa, adicionalmente à elevada idade do lodo descartado. Adicionalmente, salienta-se o conteúdo de lipídeos de membrana da BE, com uma concentração superior a 3 vezes à da BC. Os principais constituintes dos glicerolipídeos de membrana são os vários tipos de ácidos graxos que são polinsaturados e derivados da insaturação e alongação da cadeia dos ácidos graxos precursores, os ácidos palmítico e oleico (Erwin, 1973). No entanto,

sob condições ambientais desfavoráveis ou sob condições de *stress* durante o crescimento, muitas algas alteram a rota de biossíntese dos lipídeos para a formação e acumulação de lipídeos neutros, basicamente os triacilgliceróis. Diferentemente dos lipídeos de membrana, os triacilgliceróis não desempenham o papel estrutural, mas servem essencialmente para armazenamento de carbono e energia (Hu et al., 2008) e são de interesse para a produção de biocombustíveis. Comparando ambas as biomassas, a BC acumulou mais lipídeos neutros que a BE.

8.3.2. Digestão anaeróbia

Ensaio 1

Os resultados de produção acumulada de biogás e rendimentos em metano das diferentes condições experimentais do Ensaio 1 são apresentados na Tabela 8.4.

Tabela 8.4 - Resultados de produção acumulada de biogás e rendimentos em metano das diferentes condições experimentais do Ensaio 1.

Condição experimental	Volume acumulado biogás (mL)	% CH ₄	Rendimento médio em metano	
			m ³ CH ₄ /kg STV*	m ³ CH ₄ /kg DQO*
Inóculo	50,1 (13,9)	47 (6,7)	0,07 ^c	0,02 ^{cd}
BE	160,6 (40,3)	67 (1,8)	0,14 ^b	0,14 ^a
AR	65,1 (2,4)	0,5 (0,2)	0,00 ^d	0,00 ^d
BE + 5%AR	209,9 (4,8)	65 (0,2)	0,15 ^b	0,04 ^c
BE + 10%AR	273,9 (23,7)	62 (1,3)	0,21 ^a	0,10 ^b
BE + 30%AR	40,9 (0,5)	15 (1,1)	0,00 ^d	0,00 ^d
AR70% +30%H₂O	33,4 (2,2)	4 (0,9)	0,00 ^d	0,00 ^d

Valores médios e desvio padrão entre parênteses. *Foi aplicado teste-t a 5% de probabilidade. Em uma mesma coluna, as médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

Os maiores volumes de biogás provieram dos substratos com as menores proporções de AR (BE+10%AR e BE+5%AR), destacando-se a condição experimental BE+10%AR que proporcionou o volume de gás máximo (273,9 mL, 62% CH₄) e o maior rendimento de metano em termos de sólidos adicionados ($p<0,05$). Em seguida, as condições BE+5%AR e BE apresentaram o volume acumulado de biogás de 209,9 mL e 160,6 mL, com teores em metano de 65% e 67%, respectivamente e rendimentos estatisticamente iguais em termos de STV ($p<0,05$). Comparativamente, apesar de não se ter verificado uma correspondência das produções em gás por partes destas condições com a respectiva

relação C/N inicial (12, 28 e 5 para BE+10%AR, BE+5%AR e BE, respectivamente, vide Tabela 8.1), verificou-se poder haver uma relação entre os volumes obtidos de biogás e razão S/I (substrato/inóculo). Efetivamente, a variação decrescente dos valores de S/I acarretaram na diminuição da produção de biogás e rendimento em metano: 0,6, 0,51 e 0,42 para BE+AR10%, BE+AR5% e BE, respectivamente, indicando a eventual importância deste fator. Assim sendo, para as condições testadas, o fato é indicativo de a biomassa anaeróbia se encontrar apta a degradar o tipo de substrato disponibilizado e, conseqüentemente, um pequeno acréscimo de alimento resultar numa maior eficiência do processo.

Alzate et al. (2014) ao testarem as razões S/I de 0,5, 1 e 3 concluíram que apesar de serem observadas diferenças iniciais no desempenho da digestão anaeróbia, as produtividades totais em metano obtidas no final dos testes foram similares para as três razões ensaiadas. No entanto, destaca-se que as maiores produtividades nos primeiros dias do processo foram obtidas mediante uma razão S/I de 0,5. Zeng et al. (2010) reportaram um maior rendimento acumulado de metano para razão S/I= 0,5 na digestão anaeróbia da cianobactéria *Microcystis* sp., porém o conteúdo de metano no biogás foi elevado para mais de 45% quando S/I=2.

As produções em gás das condições que operaram com 5 e 10% de AR em comparação com os valores da digestão apenas com BE, claramente mostraram que há vantagem em adicionar um efluente como a AR à biomassa cultivada em esgoto doméstico e que essa quantidade não deverá ser inferior a 10% v/v. Os resultados provenientes de condições com uma reduzida produção em biogás sugerem que a junção de volumes iguais ou superiores a 30% de AR à biomassa cultivada em esgoto (BE) não apresentou qualquer interesse devido muito provavelmente à elevada toxicidade exercida por parte da AR nos consórcios microbianos.

A proporção de 30% de AR em mistura com o substrato BE (BE+30%AR, C/N=14) se mostrou demasiadamente elevada, dada a reduzida produção em biogás obtida que revelou a ocorrência da inibição do processo da digestão anaeróbia. Comportamento idêntico foi observado nas demais condições (AR70%+30%H₂O, C/N=7 e AR, C/N=16), nas quais a produção de biogás ficou bem próxima da respiração endógena, representada pela condição que apenas conteve inóculo.

Tal como já tinha sido observado quanto às três condições experimentais com as maiores produções de biogás (condições BE, BE+10%AR e BE+5%AR), os resultados relativos aos pequenos volumes de produção (condições AR70%+30%H₂O, BE+30%AR e AR) também não são relacionáveis com as relações C/N utilizadas. Se por um lado, existiu uma grande variação nos valores de C/N em cada um dos casos (variações de metade para mais do dobro: C/N = 5-12-28 e 7-14-16), a respectiva comparação mostra haver semelhanças entre os valores aplicados em cada um dos blocos de condições experimentais, mas sem correspondência quanto à produção biogás/metano.

Ensaio 2

Produção de biogás

De posse dos resultados do Ensaio 1, foi possível um melhor delineamento do Ensaio 2, com estreitamento, entre 10 e 20%, da faixa de mistura da AR na biomassa algal. Os resultados de produção acumulada de biogás para o Ensaio 2 são apresentados na Figura 8.1 e os rendimentos em metano das diferentes condições experimentais são apresentados na Tabela 8.5.

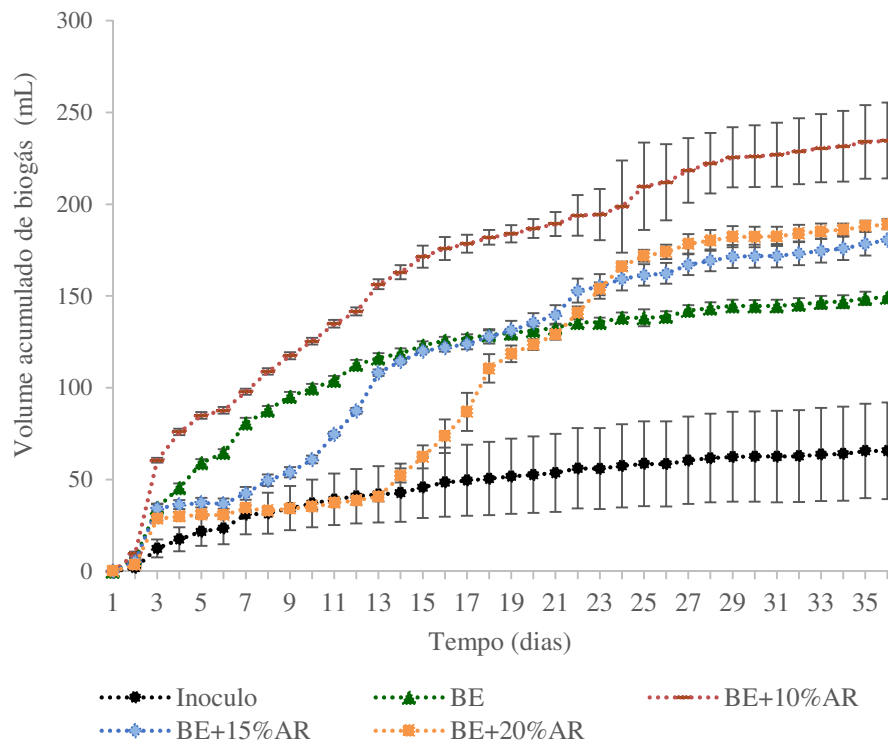
Tabela 8.5 - Resultados de produção acumulada de biogás e rendimentos em metano das diferentes condições experimentais do Ensaio 2.

Condições experimentais	Volume final biogás (mL)	%CH ₄	Rendimento médio em metano	
			m ³ CH ₄ /kg STV*	m ³ CH ₄ /kg DQO*
Inóculo	65,7 (26,3)	54 (8,1)	0,06 ^e	0,025 ^f
BE	149,4 (3,6)	68 (0,1)	0,11 ^d	0,08 ^{cd}
BE + 10%AR	234,7 (13,0)	66 (2,7)	0,15 ^c	0,11 ^b
BE + 15%AR	180,6 (6,6)	62 (3,9)	0,12 ^d	0,05 ^e
BE + 20%AR	189,1 (2,8)	65 (1,2)	0,09 ^d	0,07 ^d
BC	267,2 (8,6)	71 (0,8)	0,21 ^a	0,15 ^a
BC + 10%AR	238,1 (6,0)	67 (0,4)	0,19 ^{ab}	0,08 ^c
BC + 15%AR	281,5 (20,6)	65 (4,4)	0,16 ^{bc}	0,08 ^{cd}
BC + 20%AR	201,8 (35,5)	63 (5,9)	0,12 ^d	0,05 ^e

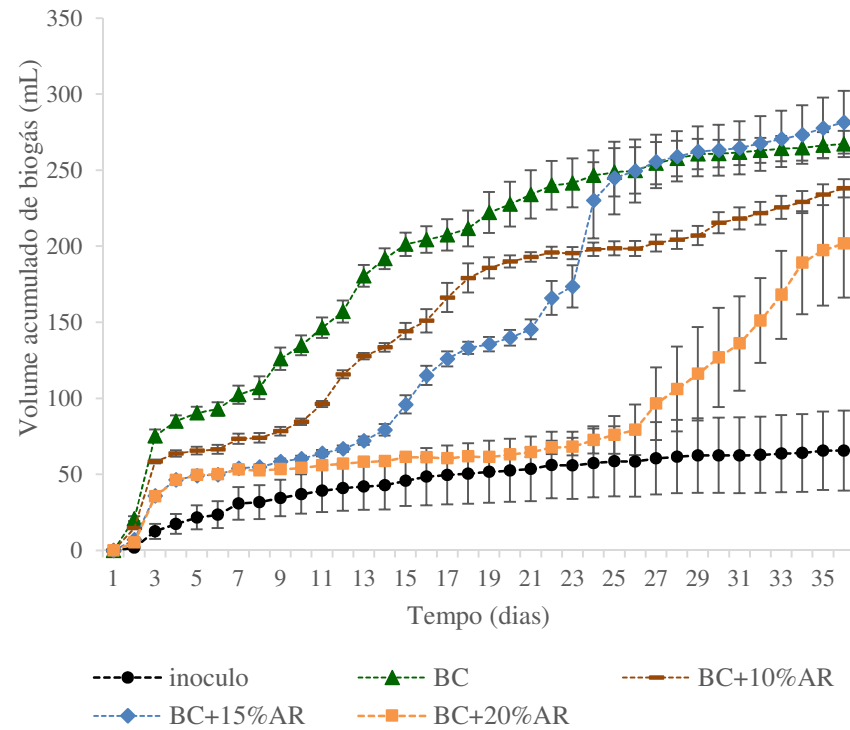
Valores médios e desvio padrão entre parênteses. *Foi aplicado teste-t a 5% de probabilidade. Em uma mesma coluna, as médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si.

No Ensaio 2, todas as condições experimentais apresentaram produções de biogás superiores às produzidas pelo inóculo (Figura 8.1). Confirmando o Ensaio 1, para o meio de cultivo esgoto doméstico, a mistura com 10% de AR no Ensaio 2 foi a que também

apresentou um melhor desempenho, tendo mostrado o maior volume de biogás e a maior porcentagem de metano quando comparado com as demais condições experimentais. Para essa condição, o rendimento em metano foi de 0,15 m³/kg STV, 27% superior ao rendimento da digestão do substrato BE sozinho ($p < 0,05$).



(a)



(b)

Figura 8.1 - Resultados de produção acumulada de biogás ao longo do tempo para as condições experimentais do Ensaio 2. (a) Substrato BE; (b) Substrato BC (barras verticais representam desvio padrão, n=3) .

Os valores dos rendimentos da digestão anaeróbia de biomassa algal, cultivada em LAT utilizando esgoto doméstico como **meio de cultivo (BE)**, tanto do Ensaio 1 quanto do Ensaio 2 (0,14 e 0,11 m³ CH₄/ kg STV, respectivamente), mostram-se condizentes com os valores reportados na literatura. Para semelhantes condições, Passos et al. (2014), a partir de biomassa oriunda de consórcio de espécies, com maior abundância dos gêneros *Scenedesmus* e *Chlorella*, obtiveram o rendimento de 0,172 m³ CH₄/kg STV, operando à temperatura ambiente. Ainda com a utilização da LAT e esgoto doméstico como meio de cultivo, Passos et al. (2013) reportaram o rendimento de 0,148 m³ CH₄/kg STV para o consórcio constituído por *Monoraphidium* sp., *Stigeoclonium* sp., *Nitzschia* sp. e *Amphora* sp., em testes anaeróbios à temperatura ambiente. Kinnunen et al. (2014) operando reatores anaeróbios a 37°C a digerir biomassa composta por *Pediastrum* sp., *Micractinium* sp. e *Scenedesmus* sp. mencionam rendimentos de 0,225 e 0,179 m³ CH₄/kg STV para um reator de mistura contínua e outro reator sem mistura de acúmulo de volume, respectivamente. González-Fernández et al. (2011), a partir de testes de digestão anaeróbia em batelada de biomassa majoritariamente composta por *Chlorella* sp. e *Scenedesmus obliquus* e cultivada em efluente, reportaram um rendimento de 0,13 L CH₄/g DQO.

A comparação da condição BE+10%AR em cada um dos ensaios indica que idênticas misturas produzem volumes semelhantes de gás por terem tido condições análogas de operação, nomeadamente no tocante à proporção de microrganismos anaeróbios. Assim, pode-se afirmar que o volume de 10% v/v de AR foi o mais adequado para digerir conjuntamente a biomassa cultivada em esgoto doméstico.

Usando como meio de cultivo o efluente da **indústria cervejeira**, percebeu-se que a biomassa algal sozinha apresentou maiores valores de volume e porcentagem de metano (267 mL; 71% CH₄) e rendimento (0,21 m³ CH₄/kg STV), o qual se apresentou 16% mais elevado do que o obtido na condição BC+10%AR (condição de segundo maior valor deste ensaio, $p < 0,05$). Contudo, em relação ao volume de biogás acumulado, verificou-se que a unidade BC+15%AR aumentou a produção diária a partir 23° dia de incubação, tendo ultrapassado a unidade anterior ao atingir o volume de 282 mL de biogás ao final do ensaio, embora com rendimento de apenas 0,16 m³ CH₄/kg STV. Entende-se que o incremento substancial da produção de biogás se deveu à adaptação da comunidade

bacteriana anaeróbia (inóculo) à carga tóxica advinda da presença do substrato AR, a qual acabou por ser digerida depois de um tempo de latência.

O tratamento BC+20%AR é um exemplo mais acentuado deste efeito ao apresentar um incremento distinto na produção aos 26 dias de incubação, indicando ser necessário operar com períodos de adaptação tanto mais longos quanto mais tóxicas forem as cargas envolvidas. É ainda de salientar que apesar desta condição experimental não ter atingido as produções de biogás obtidas na condição com 15% de AR, durante o tempo estipulado para o Ensaio 2, é possível inferir que a utilização das maiores proporções de AR (15 e 20%) no afluente, numa operação em modo contínuo, resulte em melhores desempenhos do que os obtidos em condições de operação em batelada, como o presente caso.

O conceito da complementaridade de substratos, utilizando a capacidade de adaptação dos consórcios anaeróbios, foi testada em outros estudos que demonstraram ser possível degradar água ruça sem a necessidade de se fazer qualquer pré-tratamento de destoxificação, correção ou acerto de pH. Gonçalves et al. (2012) e Sampaio et al. (2011) demonstraram que o efluente de suinocultura foi um eficiente substrato que funcionou como complemento da AR durante o seu tratamento em um reator híbrido anaeróbio. O êxito do procedimento desenvolvido deve-se à associação de estratégias de adaptação da biomassa anaeróbia ao substrato a digerir, que, de forma vantajosa, tornou possível o tratamento/valorização da AR, em condições anaeróbias, de forma mais simples, flexível e mais vantajosa economicamente.

A comparação das produções provenientes de cada uma das biomassas em mistura com 10% de AR revela que os volumes de biogás gerados foram independentes do meio de cultivo utilizado no crescimento da biomassa algal. Efetivamente, semelhantes valores de biogás foram registrados em cada uma das situações: 235 mL para a condição BE+10%AR e 238 mL para BC+10%AR. No entanto, a proporção 10% v/v de AR proporcionou rendimentos de produção de metano estatisticamente superiores para a biomassa da cerveja, se comparado com a biomassa do esgoto.

Ao contrário do observado no Ensaio 1 com o substrato BE, para o substrato BC a relação S/I parece ter influenciado inversamente a produção de biogás, de forma que ao aumentar a razão S/I, houve uma tendência de diminuição da produção de metano. Como exemplo, as condições BC, BC+10%AR e BC+15%AR com razões S/I de 0,51, 0,68 e 0,76 (Tabela

8.3) apresentaram como rendimento em metano, respectivamente 0,21, 0,19 e 0,16 m³/kg STV.

A análise do comportamento das biomassas que foram testadas **sem o substrato complementar** (BE e BC, Figura 8.1) ressalta em uma nítida diferença entre as produções, tendo o efluente da indústria cervejeira proporcionado maiores volumes de biogás que o efluente oriundo do cultivo em esgoto doméstico: 149 mL (BE) vs 267 mL (BC). Estas diferenças podem ser relacionadas com a influência da composição química de cada uma das biomassas, já destacada anteriormente (vide Tabela 8.1), na qual se verifica que o substrato BC possuiu proporções mais elevadas de carboidratos e menores de cinzas e, por isso, constituiu-se em um substrato mais facilmente biodegradável. Neste caso, para a biomassa cultivada em efluente da indústria cervejeira, o substrato BC, por si só, foi capaz de garantir o melhor rendimento ($p < 0,05$), não necessitando de um substrato complementar para melhorar sua produção, mesmo apresentando valor da relação C/N menor que o ideal teórico. Fato explicado, possivelmente, devido ao melhor equilíbrio na composição química dessa biomassa, com distribuição mais balanceada entre os diferentes compostos químicos (lipídeos, carboidratos, proteínas e cinzas). Dessa forma, pode-se afirmar sobre a importância do meio de cultivo e conseqüentemente sobre a importância da composição química da biomassa algal para a complementariedade de substratos na digestão anaeróbia.

Na literatura, a abordagem da digestão conjunta de biomassa algal com outros substratos é bastante difundida. O foco da maioria dos estudos é o de superar a limitação do excesso de nitrogênio da biomassa algal, digerindo-a conjuntamente com substratos ricos em carbono. Yen e Brune (2007) conseguiram praticamente dobrar a produção de metano com a digestão conjunta de resíduos de papel e biomassa algal. Ehimen et al. (2011) aumentando a proporção de carbono/nitrogênio para 12,44 através da co-digestão dos resíduos de microalgas com glicerol, observaram um aumento de produção de metano em mais de 50%, comparando-se com a produção de metano quando os resíduos foram digeridos sozinhos. Wang et al. (2013) conduziram processos de digestão de *Chlorella* sp. conjuntamente com resíduos de lodo ativado. O resultado foi um incremento de cerca de 76% na produção do biogás.

No presente estudo verificou-se que o desempenho do processo de digestão anaeróbia de biomassa algal com outro substrato não foi relacionável com a relação C/N utilizada. Por

exemplo, os tratamentos que apresentaram relações C/N semelhantes e próximas de 10 (BE+20%AR, BC e BC+10%AR) revelaram uma variação no rendimento de metano, que se atribui à toxicidade do substrato complementar e à diferença de composição química do substrato mãe.

O bom resultado da mistura de 10% de AR no substrato BE pode ser explicado pelo maior equilíbrio da mistura e não necessariamente pelo incremento da relação C/N. Esperar-se-ia de acordo com os valores de C/N apresentados na Tabela 8.3, um melhor rendimento do tratamento BC+20%AR, dado sua relação C/N de 18. No entanto, as características do substrato complementar, como a presença de compostos tóxicos, limitaram sua proporção na mistura. Além disso, o rendimento do processo de digestão da biomassa cultivada no efluente da indústria cervejeira indicou que mesmo esse substrato apresentando baixa relação C/N de 10, sua composição química conseguiu suprir de maneira balanceada o excesso teórico de proteínas frente à quantidade de carboidratos.

Remoção de poluentes

Os resultados de caracterização da entrada e da saída dos reatores do Ensaio 2 são apresentados na Tabela 8.6. As porcentagens de remoção de DQO variaram entre o máximo de 15,7% para o tratamento BE e o mínimo de 2,7% para BC+10% AR. Os valores de pH para todas as condições apresentaram valores próximos a neutralidade, sendo que nenhuma condição na saída apresentou valor de pH inferior a 6,5.

Inerentemente ao processo de digestão anaeróbia, observou-se o aumento da variável nitrogênio amoniacal na saída para todas as condições. E como esperado, devido ao processo de amonificação, os valores de NTK foram maiores na saída, com exceção do tratamento BE+20%AR em que houve uma discreta diminuição do valor de NTK.

Tabela 8.6 - - Resultados de caracterização da entrada e da saída dos reatores antes e após o Ensaio 2.

		pH	Potencial redox (mV)	ST (g/L)	STV (g/L)	DQO total (g/L)	NTK (g/L)	N-NH ₃ (g/L)	Fenóis totais (g/L)	AOV (g/L)
Inóculo	Entrada	7,3		17,08	14,69	39,55	3,11	0,27	0,0074	0
	Saída	7,08	-387			39,21	3,32	0,61	0,033	0
	Remoção (%)					0,86	-6,76	-127,08	-345,95	-
BE	Entrada	7,48		32,00	22,69	33,79	3,00	0,29	0,021	0,21
	Saída	6,99	-420,5			28,5	3,00	0,87	0,043	0,016
	Remoção (%)					15,66	-0,13	-190,65	-104,76	92,38
BE+10%AR	Entrada	6,79		36,81	27,03	37,63	3,47	0,29	0,43	1,41
	Saída	6,91	-413,3			35,91	3,68	0,74	0,39	0,35
	Remoção (%)					4,57	-6,05	-160,40	9,30	75,18
BE+15%AR	Entrada	6,51		33,93	25,21	61,06	3,42	0,27	0,75	1,64
	Saída	6,67	-315,3			59,29	3,53	0,82	0,88	2,15
	Remoção (%)					2,90	-3,28	-204,17	-17,33	-31,10
BE+20%AR	Entrada	6,4		43,72	33,91	45,7	3,56	0,26	0,91	2,38
	Saída	6,62	-348,1			44,15	3,53	0,784	1,7	2,46
	Remoção (%)					3,39	0,79	-197,87	-86,81	-3,36
BC	Entrada	7,15		27,11	22,87	32,26	2,52	0,29	0,032	0,67
	Saída	6,92	-394,3			30,06	2,98	0,92	0,079	0,059
	Remoção (%)					6,82	-18,33	-214,29	-146,88	91,19
BC+10%AR	Entrada	6,54		26,69	22,26	49,15	3,44	0,28	0,58	1,66
	Saída	6,71	-379,4			47,81	3,52	0,90	0,57	1,79
	Remoção (%)					2,73	-2,24	-225,25	1,72	-7,83
BC+15%AR	Entrada	6,45		34,80	29,40	61,44	3,25	0,27	0,84	1,9
	Saída	6,68	-366,4			59,64	3,35	0,81	0,96	1,89
	Remoção (%)					2,93	-3,12	-195,92	-14,29	0,53
BC+20%AR	Entrada	6,19		34,49	29,15	73,73	3,02	0,27	1,13	2,3
	Saída	6,55	-379,8			71,53	3,20	0,72	1,72	2,64
	Remoção (%)					2,98	-5,79	-163,92	-52,21	-14,78

Os resultados demonstraram que apenas a condição BE+10%AR alcançou a remoção de 9,3% quanto à variável fenóis totais. Verificou-se ainda que a concentração de fenóis totais permaneceu praticamente inalterada entre a entrada e saída, no caso de BC+10% AR. Para as demais condições foram registados incrementos da concentração desse composto (valores negativos de remoção) à saída no Ensaio 2. Apesar da satisfatória produção de biogás dos tratamentos com ou sem período de adaptação, o inóculo utilizado provavelmente não teve condições suficientes e necessárias para adaptação aos compostos tóxicos presentes na AR, nomeadamente os compostos fenólicos e lipídicos. Assim, pode-se inferir do interesse de, anteriormente à incubação, proceder a um período de aclimação do inóculo, como demonstrado por Gonçalves et al. (2011), de forma a melhorar o desempenho na remoção de fenóis totais e de outros possíveis compostos tóxicos presentes no substrato complementar.

Em relação aos AOVs, destacam-se as condições experimentais BE, BE+10% AR e BC com remoções de respetivamente, 92,4%, 75,2% e 91,2%. De maneira geral, os tratamentos com melhor desempenho na produção de biogás se confirmaram como os possuidores de uma maior capacidade de remoção de AOVs e matéria orgânica.

8.4. Conclusões

A água ruça se mostrou um substrato complementar eficiente para digestão anaeróbia da biomassa algal. As características do efluente utilizado como meio de cultivo influenciaram a composição macromolecular da biomassa algal e conseqüentemente o rendimento obtido na digestão anaeróbia. Dessa forma, demonstrou-se que além da relação C/N do substrato, outras características poderão influenciar no processo anaeróbio, como teores de cinzas e carboidratos da biomassa algal e presença de compostos tóxicos no substrato complementar.

A substituição de 10% do volume de biomassa algal pela água ruça foi a condição mais produtiva em termos de biogás e metano, quando utilizada a biomassa algal produzida no esgoto doméstico. Para a biomassa algal produzida no efluente da cerveja, verificou-se que proporções até 20% de água ruça podem ser utilizadas, no entanto, um período de adaptação do inóculo anaeróbio torna-se necessário. A biomassa da cerveja por si só apresentou maior rendimento na produção de metano, do que quando digerida conjuntamente com o substrato água ruça, o que é atribuído à sua composição mais balanceada, apesar da sua baixa relação C/N.

O melhor desempenho do processo de digestão anaeróbia de biomassa algal com outro substrato não foi relacionável com a razão C/N, portanto, conclui-se sobre a importância do meio de cultivo e, conseqüentemente, da composição macromolecular da biomassa algal quanto à função de complementaridade de substratos na digestão anaeróbia.

8.5. Referências Bibliográficas

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*, 243, pp 405-410. 2014.

AOAC, Association of official analytical chemists. *Official methods of analysis*. 18 ed. Washington, D. C.: AOAC, 2000.

APHA. *Standard Methods for examination of water and wastewater*. Washington: American Water Work Association, Water Environmental Federation. 2012.

Brown, M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K., Dunstan, G.A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151, pp 315-331. 1997.

Ehimen, E.A., Sun, Z.F., Carrington, C.G., Birch, E.J., Eaton-Rye, J.J. Anaerobic digestion of microalgae residues resulting from the biodiesel production process. *Applied Energy*, 88, pp 3454 – 3463. 2011.

Elser, J.J, Fagan, W.F., Denno, R.F., Dobberfuhl, D.R., Folarin, A., Huberty, A., Interlandi, S., Kilham, S.S., McCauley, E., Schulz, K.L., Siemann, E.H., Sterner, R.W. Nutritional constraints in terrestrial and freshwater food webs. *Nature*, 408, pp 578-580. 2000.

Erwin, J.A. Comparative biochemistry of fatty acids in eukaryotic microorganisms. In *Lipids and Biomembranes of Eukaryotic Microorganisms* (Erwin, J.A., ed.). New York: Academic Press, pp 141–143. 1973.

Geider, R.J., Roche, J.L. Redfield revisited: variability of C:N:P in marine microalgae and its biochemical basis. *European Journal of Phycology*, 37, pp 1-17. 2002.

Gonçalves, M.R., Costa, J.C., Marques, I.P., Alves, M.M. Inoculum acclimation to oleate promotes the conversion of olive mil wastewater to methane. *Energy*, 36, pp 2138-2141. 2011.

Gonçalves, M.R., Freitas, P., Marques, I.P. Bioenergy recovery from olive mil effluent in a hybrid reactor. *Biomass & Bioenergy*, 39, pp 253-260. 2012.

González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P. Impact of microalgae characteristics on their conversion to biofuel. Part II: Focus on biomethane production. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(2), pp 205–18. 2011.

Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The Plant Journal*, 54, pp 621-639. 2008.

- Kinnunen, V., Craggs, R., Rintala, J. Influence of temperature and pretreatments on the anaerobic digestion of wastewater grown microalgae in laboratory-scale accumulating-volume reactor. *Water Research*, 57, pp 247-257. 2014.
- Passos, F., Astals, S., Ferrer, I. Anaerobic digestion of microalgal biomass after ultrasound pretreatment. *Waste Management*, 34, pp 2098-2103. 2014.
- Passos, F., Solé, M., García, J., Ferrer, I. Biogas production from microalgae grown in wastewater: Effect of microwave pretreatment. *Applied Energy*, 108, pp 168-175. 2013.
- Marques, I.P. Anaerobic digestion treatment of olive mill wastewater for effluent re-use in irrigation. *Desalination*, 137, pp 233-239. 2001.
- Marques, I. P., Sampaio, M. Direct Anaerobic Digestion of Olive Oil Mills Wastes using Microalgae as a Complementary Substrate. Symposium “Olive Oil Mills Wastes and Environmental Protection” 16-18 October 2012, Chania, Crete, 2012.
- Sampaio, M.A., Gonçalves, M.R., Marques, I.P. Anaerobic digestion challenge of raw olive mill wastewater. *Bioresource Technology*, 102, pp 10810-18. 2011.
- Sampaio, M.A.P. Água-ruça: Tratamento anaeróbio e fotoelectroquímico. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Química e Bioquímica. Dissertação. 96p. Lisboa, 2011.
- Sialve, B., Bernet, N., Bernard, O. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances*, 27, pp 409-416. 2009.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, pp 144-158. 1965.
- Sosnowaki, P., Wiczorek, A., Ledakowicz, S. Anaerobic co-digestion of sewage sludge and organic fraction of municipal solid wastes. *Advances in Environmental Research*, 7, pp 609–616. 2003.
- Speece, R.E. *Anaerobic biotechnology for industrial wastewaters*. Nashville: Archae press. 1996.
- Wang, M., Sahu, A.K., Rusten, B., Park, C. Anaerobic co-digestion of microalgae *Chlorella sp.* and waste activated sludge. *Bioresource Technology*, 142, pp 585–590. 2013.
- Yen, H.W., Brune, D.E. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. *Bioresource Technology*, 98, pp 130-134. 2007.
- Zeng, S., Yuan, X., Shi, X., Qiu, Y. Effect of inoculum/substrate ratio on methane yield and orthophosphate release from anaerobic digestion of *Mycrocystis* spp. *Journal of Hazardous Materials*, 178, pp 89-83. 2010.

Capítulo 9 - VALORIZAÇÃO ENERGÉTICA DE BIOMASSA ALGAL EM UM REATOR HÍBRIDO ANAERÓBIO

Resumo

O presente estudo visou avaliar a operação e monitoramento de um reator anaeróbio híbrido alimentado com biomassa algal cultivada em efluente da indústria cervejeira. Três fases de operação foram distinguidas durante os 72 dias de operação do reator em modo semi-contínuo com biomassa algal: Fase 1 (F1), na qual a biomassa algal foi utilizada como substrato; Fase 2 (F2), na qual 10% (v/v) de biomassa algal foi substituída por água ruça; e Fase 3 (F3), na qual 10% (v/v) de biomassa algal pré-tratada termicamente via fervura foi substituída por água ruça. A partir de um tempo de detenção hidráulica de 6 dias, cargas orgânicas volumétricas de 2,4, 2,8 e 4,3 kg DQO m⁻³d⁻¹ foram aplicadas ao reator nas fases 1, 2 e 3, respectivamente. Durante a fase F1 foi observada uma perda de sólidos no efluente tratado, com incremento da DQO à saída e produção de biogás de 0,27 m³ m⁻³d⁻¹. A substituição de 10% do volume de biomassa algal por água ruça se mostrou mais eficiente na produção de biogás, triplicando a produtividade de metano obtida na fase anterior, gerado pela digestão da biomassa algal pura. A fase F2 apresentou remoção de 58,5% DQO com produção de 1,14 m³ m⁻³d⁻¹ biogás e rendimento de 0,25 m³ CH₄/kg STV. O pré-tratamento térmico não se mostrou eficiente na ruptura da parede celular, atingindo a eficiência de 37,2%, e, conseqüentemente, não teve qualquer efeito no aumento da produção de biogás durante a fase F3. Destaca-se que a complementariedade de substratos permitiu melhorar o rendimento da digestão anaeróbia de biomassa algal em reator híbrido, além de proporcionar economia de recursos, simplicidade operacional e valorização energética de mais de um resíduo.

Palavras-chave: bioenergia, biogás/metano, digestão anaeróbia, microalgas, pré-tratamento térmico, substrato complementar.

9.1. Introdução

Um dos mais importantes processos de conversão de biomassa em energia é o processo de digestão anaeróbia que consiste na conversão bioquímica de matéria orgânica em biogás. O biogás é capaz de gerar de 20 a 300 kWh de energia líquida por tonelada de substrato (European Commission, 2005) e a biomassa residual após o processo de digestão anaeróbia ainda contém nutrientes mineralizados, podendo, por isso, ser utilizada como fertilizante orgânico após o processo de geração de energia (Vergara-Fernandez et al., 2008; Ward et al., 2008).

A tecnologia de digestão anaeróbia apresenta grande aplicabilidade a uma ampla variedade de substrato, sendo bem difundida e utilizada no mundo todo por funcionar satisfatoriamente em grande escala. A fração orgânica de resíduos sólidos urbanos, resíduos vegetais e animais, lodos oriundos de estações de tratamento de esgoto e outras fontes podem ser utilizados como substratos no processo (Karagiannidis et al., 2009). Mais recentemente, as microalgas surgem como um novo substrato de grande interesse para a produção de biocombustíveis através da digestão anaeróbia.

A habilidade das microalgas de se adaptarem e sobreviverem numa grande variedade de ambientes é enorme, podendo o seu cultivo ser aliado aos objetivos do tratamento de águas residuárias e de geração de energia. Atualmente, o uso energético mais visado para a biomassa algal é a produção de biodiesel, devido à grande capacidade desses microrganismos em acumular lipídeos. No entanto, microalgas com baixo conteúdo lipídico são comuns em cultivo em efluentes (Chen et al., 2014). De acordo com Mehrabadi et al. (2015), a razão principal para o reduzido acúmulo lipídico da biomassa cultivada em lagoas de alta taxa com efluentes é a biomassa mista, composta por uma mistura de algas e bactérias. A valorização dessa biomassa por digestão anaeróbia passa, portanto, a ser uma alternativa potencialmente interessante do ponto de vista energético, na qual a presença de bactérias e outros microrganismos não constitui nenhum problema, sendo pelo contrário, até desejada, na medida em que ajuda a melhorar a biodegradabilidade do substrato e a minimizar o efeito recalcitrante da parede celular presente nas microalgas.

O tipo de reator selecionado para realizar a digestão anaeróbia é um fator importante para se atingir um bom desempenho e a viabilidade econômica do processo. O uso de reatores de alta taxa, como os reatores *Upflow Anaerobic Sludge Blanket* (UASB), filtros anaeróbios e bioreatores anaeróbios de membrana, foram propostos como uma alternativa

para a direta digestão da biomassa algal sem a necessidade de proceder à secagem da biomassa (Zamalloa et al., 2011), podendo o custo associado ao processo de separação e colheita ser diminuído e a retenção de sólidos maximizada (Zamalloa et al., 2012a). No entanto, as pesquisas disponíveis concentram-se na pequena escala e na alimentação de reatores feita em batelada. São poucos os estudos envolvendo reatores com alimentação contínua (Prajapati et al., 2013), o que dificulta a aplicação dos resultados obtidos. Segundo González-Fernández et al. (2015), nos últimos anos, a maioria dos estudos conduzidos foram destinados a melhorar a produção de metano usando pré-tratamentos para hidrólise ou ruptura da parede celular. A eficiência desses pré-tratamentos foi na maioria dos casos testada em ensaios de operação em batelada para uma mais rápida e fácil comparação com a biomassa bruta (Mendez et al., 2013; Passos e Ferrer, 2015). Dados obtidos de ensaios em batelada podem fornecer orientação, mas a avaliação dos benefícios dos pré-tratamentos aplicados em operação semi-contínua é altamente recomendada, de forma a se aprofundar nos estudos de performance dos microrganismos anaeróbios quando alimentados com biomassa algal pré-tratada. Adicionalmente, a maioria dos estudos com reatores para digestão anaeróbia de biomassa algal utiliza biomassa cultivada em meio sintético sob condições ambientais altamente controladas (Tabela 9.1), o que inviabiliza toda a cadeia produtiva.

Segundo Kwietniewska e Tys (2014), o futuro da pesquisa no campo da digestão anaeróbia de biomassa algal irá provavelmente incluir o desenvolvimento de novos métodos de monitoramento e controle (medição em tempo real), que são escassos atualmente; melhoria dos métodos de pré-tratamento e co-digestão; e também análises moleculares da comunidade microbiológica anaeróbia. Alguns estudos visam a imobilização de bactérias como forma de melhoria da eficiência do reator assim como a redução do tempo de detenção hidráulica (Ward et al., 2008; Weiland, 2010; Khalid et al., 2011).

Tabela 9.1 - Diferentes configurações e parâmetros de operação de reatores anaeróbios para digestão de biomassa algal.

Nº	Reator, volume, temperatura	Microalga, meio de cultivo	Ações adicionais	TDH (dias)	COV (kgDQO/m³dia)	Rendimento Biogás	Remoção DQO (%)	Referências
1	CSTR, 1L, 35°C	<i>Chlorella vulgaris</i> , meio sintético	Diluição do substrato	16	1	0,11 LCH ₄ /gDQO	33	Ras et al. (2011)
2	CSTR, 1L, 35°C	<i>Chlorella vulgaris</i> , meio sintético	—	15	1,5	0,05 LCH ₄ /gDQO	—	Mahdy et al. (2015)
3	CSTR, 1L, 35°C	<i>Scenedesmus</i> sp., meio sintético	—	15	1	0,03 LCH ₄ /gDQO	10	González-Fernández et al. (2013)
4	CSTR, 1,5L, 37°C	<i>Oocystis</i> sp., esgoto doméstico	—	20	2,3	0,08 LCH ₄ /gDQO	28,5	Passos e Ferrer (2015)
5	UASB, 3,5L, 35°C	<i>Scenedesmus</i> sp., meio sintético	Adição de tampão	3,8	2,25 g STV/L.d	0,22 LCH ₄ /g STV	—	Tartakovsky et al. (2015)
6	CSTR, 10L, 35°C	<i>Scenedesmus</i> sp., meio sintético	Adição de tampão	16	0,65 g STV/L.d	0,19 LCH ₄ /g STV	53	Tartakovsky et al. (2013)
7	Híbrido tipo UASB, 2L, 33°C	<i>Scenedesmus</i> sp., meio sintético	Controle de pH pela adição de tampão	2,2	2,7 g STV/L.d	0,11 LCH ₄ /g STV	—	Zamalloa et al. (2012a)
8	AnMBR, 8L, mesofílica	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> , meio sintético	—	2,6	1-5,8	0,35 LCH ₄ /g DQO convertida	52,2	Zamalloa et al. (2012b)
9	CSTR, 1,5L, 37°C	<i>Pediastrum</i> sp., <i>Micractinium</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp., esgoto doméstico	—	14-16	1,0 g STV/L.d	0,225 LCH ₄ /g STV	—	Kinnunen et al. (2014)

CSTR = reator de agitação contínua. UASB = reator ascendente de manta de lodo. AnMBR = bioreator anaeróbio a membrana. TDH = tempo de detenção hidráulica.

O reator anaeróbio híbrido é um reator de fluxo ascendente de leito fixo que reúne os aspectos positivos dos reatores UASB e do filtro anaeróbio, nomeadamente a maior tolerância a altas cargas orgânicas e a garantia de menor perda de sólidos suspensos. Consequentemente, a eficiência do reator aumenta e é atingida uma melhor qualidade do efluente tratado (Ayati e Ganjidoust, 2006; El-Gohary et al., 2009). A ampliação da escala é de fundamental importância quanto à viabilidade e sustentabilidade do processo, à medida em que permite uma maior confiabilidade dos dados e difusão da tecnologia. Além disso, como a digestão anaeróbia representa um sistema ecológico balanceado, envolvendo processos metabólicos complexos que ocorrem em etapas sequenciais com grande sensibilidade a choques de carga, pH e temperatura, o escalonamento do processo é essencial para definição dos parâmetros de controle e monitoramento do processo.

O presente estudo visou avaliar a operação e monitoramento de um reator anaeróbio híbrido alimentado com biomassa algal cultivada em efluente da indústria cervejeira. A geração de biogás e a eficiência de degradação da matéria orgânica foram monitorados ao longo de três fases de operação da unidade, caracterizadas pelo uso de um substrato complementar à biomassa algal e pela aplicação de um pré-tratamento para ruptura da parede celular das microalgas.

9.2. Materiais e Métodos

9.2.1. Substratos

Biomassa algal

Biomassa algal úmida foi utilizada como um dos substratos do reator híbrido anaeróbio. A biomassa algal foi cultivada em reatores coluna de bolhas (Figura 9.1) mantidos *indoor* sob iluminação artificial de lâmpadas fluorescentes e adição de ar para mistura. Foram utilizados 30 reatores de 5L com produção em batelada e 10% do volume de cada reator foi preenchido com inóculo da espécie *Scenedesmus obliquus* (ACOI 204/07, Universidade de Coimbra – Coleção de culturas, Portugal).

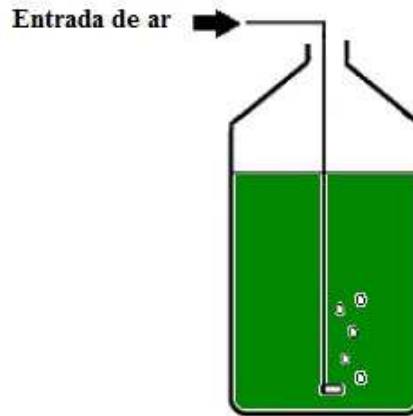


Figura 9.1 - Reator coluna de bolhas utilizado para cultivo de biomassa algal em efluente da indústria cervejeira.

O meio de cultivo foi o efluente previamente tratado em reator anaeróbio BIOPAQ®IC da indústria de cerveja SCC-Sociedade Central de Cervejas e Bebidas S.A., localizada na cidade de Vialonga, Portugal. A caracterização do efluente utilizado como meio de cultivo é apresentada na Tabela 9.3. A produção da biomassa foi diariamente monitorada através da leitura de densidade ótica a 540 nm em espectrofotômetro (HITACHI U-2000) de amostras de cada um dos reatores. A biomassa era coletada por sedimentação em provetas quando valor de absorvância ultrapassava 0,80 e armazenada sob refrigeração para posterior utilização. Em média, o volume final da biomassa concentrada era 50 vezes menor que o volume do efluente a ser sedimentado.

Água Ruça

Água ruça (AR) foi utilizada como substrato complementar à biomassa algal para alimentação do reator híbrido anaeróbio. A AR foi coletada em uma planta de produção de azeite de oliva equipada com um processo de extração de três estágios, localizada em Rio Maior, Portugal. Sua caracterização está apresentada na Tabela 9.2.

Tabela 9.2 - Caracterização do efluente da indústria cervejeira e da água ruça.

		Efluente da indústria cervejeira	Água ruça
pH		7,24	4,76
DQO_{total}	g/L	0,63 (17,9)	83,1 (2,4)
NTK	mg/L	120,4 (8,4)	0,47 (0)
N-NH₃	mg/L	24,5 (2,1)	ND
SST	mg/L	515 (55)	31,2 (3,8)
SSV	mg/L	410 (40)	27,6 (3,0)
SSF	mg/L	105 (15)	3,6 (0,8)
PO₄⁻³	mg/L	41,25	0,74
P₂O₅	mg/L	30,75	0,55
Fenóis totais	g eq ácido cafeico/L	-	6,7 (0,3)

Valores médios e desvio padrão, entre parênteses. DQO_{total}=demanda química de oxigênio total; NTK=nitrogênio total de kjeldhal; N-NH₃=nitrogênio amoniacal; SST=sólidos suspensos totais; SSV=sólidos suspensos voláteis; SSF=sólidos suspensos fixos; PO₄⁻³=fosfato; P₂O₅=pentóxido de fósforo. ND=não detectado.

9.2.2. Digestão anaeróbia: modo de funcionamento e configuração experimental

Aparato experimental

Os experimentos de digestão anaeróbia foram realizados em um reator híbrido de fluxo ascendente. O reator (Figura 9.2) foi projetado em acrílico transparente com um volume total de 2,8 L e volume útil de 1,7 L. O leito fixo, concebido e previamente testado em outros estudos (Marques, 2001), foi usado para preencher apenas 1/3 da altura do reator. Nenhum dispositivo de separação de sólido/líquido/gás foi instalado e não houve nenhuma recirculação de substrato. O reator foi alimentado com uma vazão de 0,283 L/dia de forma semi-contínua, três vezes, respeitando o intervalo de tempo de 4 horas entre as alimentações, por uma bomba peristáltica (Watson Marlow, 520 Du) a 12 rpm. O reator foi mantido à temperatura de 37±2 °C por intermédio de circulação de água na camisa externa do reator, sujeita a prévio aquecimento em banho termostático. A produção de gás foi medida por um gasômetro (Actaris) e o volume de biogás gerado diariamente foi corrigido para condições padrões de temperatura e pressão (0°C, 100 kPa). Três pontos localizados ao longo da altura do reator permitiram o acesso a diferentes zonas da unidade: manta de lodo (P3: 7,5 cm), imediatamente abaixo da zona de filtração (P2: 31 cm) e no meio do leito filtrante (P1: 41 cm).

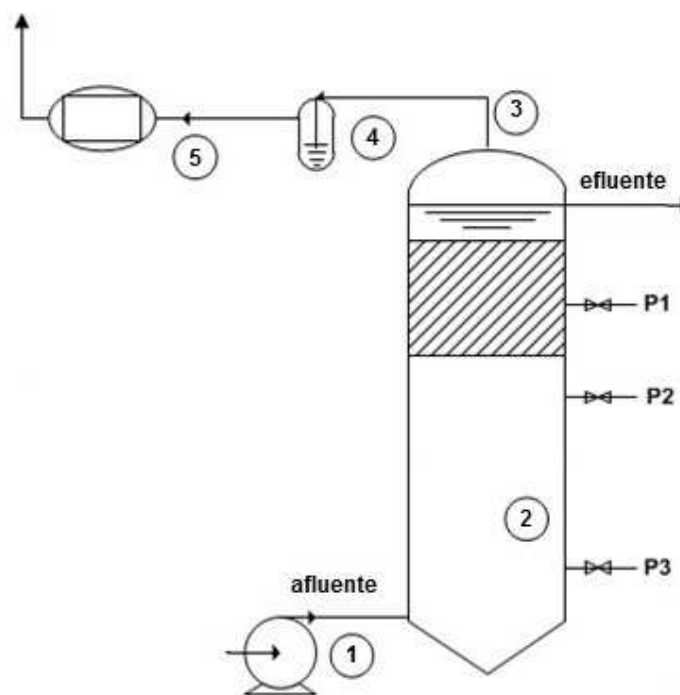


Figura 9.2 - Esquema experimental do reator híbrido anaeróbico: (1) bomba peristáltica; (2) reator híbrido; (3) saída de biogás; (4) selo hidráulico; e (5) gasômetro. Pontos de amostragens: P3 - 7,5 cm, P2 - 31cm, P1 - 41 cm. Fonte: Adaptado de Gonçalves et al. (2012a).

Partida, inoculação e operação

Previamente à operação do reator com biomassa algal, o reator híbrido anaeróbico operou com efluente de bovinocultura oriundo de uma exploração de gado de leite confinado, com cerca de 400 animais, na região de Loures, Portugal. Após os 140 dias de operação com efluente da bovinocultura, o reator anaeróbico híbrido foi deixado 7 dias sem qualquer alimentação, depois desse período foi iniciado o fornecimento de biomassa algal, sem o esvaziamento do reator.

Durante os seguintes 72 dias, foram realizadas três fases de operação distinguidas entre si pela alteração da composição do substrato a ser digerido, como apresentado na Tabela 9.3.

Tabela 9.3 - Condições operacionais aplicadas ao reator híbrido.

	Duração (d)	TDH (d)	COV (kg DQO m ⁻³ d ⁻¹)	Alimentação	Substrato
Fase 1 (F1)	32	6	2,4	semi-contínua	Biomassa algal
Fase 2 (F2)	20	6	2,8	semi-contínua	Biomassa algal + 10% (v/v) AR
Fase 3 (F3)	20	6	4,3	semi-contínua	Biomassa algal pré- tratada termicamente* + 10% (v/v) AR

TDH = tempo de detenção hidráulica. COV = carga orgânica volumétrica. AR = água ruça. *O pré-tratamento aplicado à biomassa algal foi térmico, imergindo tubos de ensaio preenchidos com biomassa algal em água a ferver, durante 15 minutos.

9.2.3. Métodos analíticos, cromatográficos e de citometria de fluxo

Métodos analíticos e cromatográficos

O substrato biomassa algal foi caracterizado em função da sua composição química. Para tal objetivo, analisou-se teor de cinzas, umidade, proteínas, carboidratos e lipídeos na biomassa. A biomassa depois de concentrada em provetas, foi seca em liofilizador (HetoPowerDry LL 3000, Thermoscientific, USA). Os carboidratos presentes foram determinados a partir de hidrólise ácida quantitativa e seu teor mensurado pelo método do reagente fenol-sulfúrico. A identificação e quantificação dos carboidratos presentes na biomassa foi realizada após filtração em 0,2 µm, obtida após o procedimento de hidrólise ácida por *High-performance liquid chromatography* (HPLC), através de equipamento Agilent – 1100, equipado com coluna Aminex HPX87H. As condições de análises foram as seguintes: tempo de corrida de 30 minutos, fluxo de 0,6 mL/minuto, injeção de 20 µL de amostra e temperatura de 50 °C. Para quantificação dos açúcares presentes, as áreas dos picos foram comparadas com padrões injetados a cada análise e o teor de lignina foi obtido de acordo com Klason, lignina Klason, através da determinação da lignina como resíduo.

O teor de lipídeos foi determinado pelo método de extração soxhlet. Anteriormente à extração, a biomassa seca foi pré-tratada em moinho de bolas vibratório (Retsh, MM400) durante 3 minutos e 50 segundos a 25 s⁻¹. Para extração dos lipídeos neutros, adicionou-se o solvente hexano 99% com duração de 6 horas. Para extração dos lipídeos de membrana, o procedimento foi realizado com etanol 96% durante 3 horas. A quantificação foi realizada por gravimetria, após evaporação dos solventes em rotavapor

(Buch, R200) com banho termostático. A determinação do teor de proteínas foi realizada pelo método de nitrogênio total kjeldahl (NTK), usando um fator de conversão de 6,25 g g⁻¹ do conteúdo de nitrogênio em proteína (AOAC, 2000). O teor de umidade foi determinado pela pesagem da amostra após secagem a 105 °C até massa constante. E o teor de cinza foi mensurado após combustão da amostra em mufla a 550 °C durante 1 hora.

Adicionalmente, determinou-se para o substrato biomassa algal ainda úmida, recolhida após sedimentação, o teor de clorofila-*a* e concentração de sólidos totais voláteis (STV) (análise de acordo com APHA, 2012). Para determinação de clorofila-*a*, foi utilizada a técnica de extração via solvente, no qual acetona foi utilizada. Choques mecânicos (pérolas de vidro com agitação em vórtex) e térmicos (gelo) foram aplicados para a posterior quantificação via espectrometria (HITACHI U-2000) e o cálculo foi realizado de acordo com Ritchie (2008).

Ao final de cada fase de operação do reator, após a unidade ter atingido a estabilidade, foram coletadas amostras do afluente (entrada) e efluente (saída) para análise. Da mesma forma, amostras dos três pontos (P1, P2 e P3), localizados ao longo da altura do reator (Figura 9.2), foram coletadas como forma de caracterizar as diferentes zonas de digestão existentes no interior do reator. A estabilidade de um digestor anaeróbio é considerada quando não se verificam elevadas instabilidades na produção e qualidade do biogás obtido diariamente nem na eficiência de remoção da carga orgânica aplicada. De acordo com as disposições da APHA (2012), as seguintes variáveis foram avaliadas: sólidos totais (ST), sólidos totais voláteis (STV), sólidos totais fixos (STF), demanda química de oxigênio total (DQO_{total}) e solúvel (amostras filtradas a 0,45 µm) (DQO_{solúvel}), nitrogênio amoniacal (N-NH₃), nitrogênio total kjeldahl (NTK). Os ácidos orgânicos voláteis (AOVs) foram determinados após filtração a 0,2 µm por *High-performance liquid chromatography* (HPLC), através de equipamento Agilent – 1100, equipado com coluna Aminex HPX87H. As condições de análises foram as seguintes: tempo de corrida de 60 minutos, fluxo de 0,6 mL/minuto, injeção de 20 µL de amostra e temperatura de 50 °C. Para quantificação dos ácidos presentes, as áreas dos picos foram comparadas com padrões injetados a cada análise. pH também foi medido por meio do equipamento InoLab WTW. Nas fases F2 e F3, análises de fenóis totais foram realizadas através do método de Singleton e Rossi (1965) reduzido e os resultados expressos em mg de ácido cafeico/L. Adicionalmente, observações em microscópio óptico (Olympus BX 60), com aumentos de 40x e 100x foram realizadas.

Nas duas últimas semanas, antes do fim de cada fase, amostras do biogás foram recolhidas em seringa de vidro de 1 mL, especial para gases (*Pressure Lok*®, USA) de alta precisão, e levadas para análise em cromatografia gasosa para determinação da sua composição. O equipamento utilizado foi o Varian 430-GC, equipado com detector de condutividade térmica e uma coluna *Varian Capillary Column Select™ Permanent Gases/CO2 HR - Malsieve 5 A Parabond Q Tandem #CP7430*. As temperaturas na coluna, injetor e detector foram 50, 80 e 120 °C, respectivamente. A temperatura do filamento foi de 220 °C e a pressão do injetor de 13 Psi. O gás hélio foi usado como gás de arraste (52 mL mn⁻¹). A injeção utilizada foi de 0,5 mL de biogás da amostra coletada após o selo hidráulico. Para quantificação dos gases gerados, as áreas dos picos foram comparadas com as dos padrões gasosos mistos injetados a cada análise. Todas as análises cromatográficas foram realizadas em duplicata.

Citometria de fluxo

De forma a se avaliar a eficiência do processo de digestão anaeróbia, além de mensurar a eficácia do pré-tratamento aplicado na fase F3, a atividade enzimática e integridade da membrana das células algais foram monitoradas por citometria de fluxo nas amostras afluente e efluente de todas as fases do reator híbrido anaeróbio. O equipamento usado foi o FACSCalibur (Benton-Dickinson Instruments, Bélgica) composto de laser azul (488 nm) e laser vermelho (650 nm). Para análise e interpretação dos citogramas, o software Flowing Software (versão 2.5.0) foi utilizado.

Amostras foram previamente tratadas em um banho de ultrassom não destrutivo por 10 segundos de forma a romper possíveis agregados. A suspensão de algas e a solução tampão foram ajustadas para 1000 eventos s⁻¹ e o volume final de análise foi de 500 µL. A integridade da membrana foi determinada através de detecção da permeabilidade da membrana com iodeto de propídio (IP). As amostras foram diluídas com solução tampão de fosfato (PBS, pH 7,0) e coradas com 4 µL de solução estoque de IP (Invitrogen, Carlsbad, USA). O corante IP foi excitado a 488 nm e detectado pelo canal FL2. A integridade da membrana foi expressa como porcentagem de células com membrana permeabilizada (células rotas, coradas) em relação do número total de células analisadas. A atividade enzimática foi medida pela detecção da atividade de esterase diacetato de carboxifluoresceína (cFDA). Amostras foram diluídas com solução tampão, coradas com 5µL de cFDA e incubadas no escuro por 40 minutos antes de serem analisadas. O corante cFDA foi excitado a 488 nm e detectado pelo canal FL1. A atividade enzimática de células algais foi expressa como porcentagem de células sem atividade enzimática (células não

coradas) em relação ao número total de células analisadas. Além das amostras de entrada e saída do reator híbrido, amostras controle (controle positivo de células vivas e metabolicamente ativas e controle negativo de células mortas e metabolicamente inativas) foram analisadas, de forma a delimitar as regiões controle para cada corante. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

9.3. Resultados e Discussão

9.3.1. Substratos

A caracterização da biomassa está apresentada na Tabela 9.4.

Tabela 9.4 - Composição química da biomassa algal utilizada como substrato do reator anaeróbio híbrido.

Composição	Média (% base seca)	Desvio Padrão
Lipídeos totais	31,6	
Lipídeos neutros	25,3	
Lipídeos de membrana	6,3	
Proteínas	36,9	0,6
Cinzas	28,7	0,1
Carboidratos	4,3	0,2
Celulose	0,36	0,26
Xilose	0,17	0,58
Arabinose	0,0	0
Grupos acetil*	0,06	0,09
Klason lignina*	0,71	1,96

*Incluídos em carboidratos com o objetivo de simplificar a discussão dos dados.

Como pode ser observado na Tabela 9.4, a biomassa algal, utilizada como substrato do reator anaeróbio híbrido, apresentou uma composição química caracterizada principalmente por proteínas e lipídeos totais, com porcentagens de ambos os compostos superiores a 30% (% base seca). Adicionalmente, destaca-se a quantidade de cinzas presentes na biomassa, de 28,7% (% bs) e a pequena quantidade de carboidratos, de 4,3% (% bs).

Os carboidratos identificados corresponderam a 30% do total presente na biomassa algal, destacando-se a presença de celulose e lignina em maiores proporções. Salienta-se que a concentração de lignina pode estar sobreavaliada, uma vez que há a interferência na análise pela contaminação por compostos tipicamente encontrados na biomassa algal, por exemplo, proteínas e compostos insolúveis, como os lipídeos e pigmentos.

A ultraestrutura da parede celular do gênero encontrado nesse estudo, *Scenedesmus* sp., é bem conhecida. Ela é composta de duas camadas: a interna que consiste em microfibras de celulose e matriz amorfa; e a externa, que na sua forma trilaminar pode conter substâncias como carotenóides e lignina (esporopolenina) (Atkinson et al., 1972; Burczyk, 1982; Weng e Chapple, 2010).

O elevado teor de cinzas na biomassa pode ter como origem o efluente utilizado como meio de cultivo, que traz na sua composição material inerte, principalmente oriundo do lodo anaeróbio do reator utilizado para tratamento do efluente. O descarte do lodo do interior do reator era realizado de forma irregular, sem controle de frequência. Assim, além de haver perda de lodo em conjunto com o efluente tratado, a mineralização do lodo no interior do reator contribui para o aumento do teor de material inerte no efluente utilizado como meio de cultivo das algas. Essa questão pode ser demonstrada pelo valor de SSF no efluente da indústria cervejeira (Tabela 9.3), indicando que aproximadamente 20% dos sólidos no efluente eram compostos de sólidos inertes.

A proporção de biomassa algal presente na biomassa total pode ser representada pela relação percentual entre os valores de clorofila-*a* e STV. No presente caso, essa relação média para a biomassa coletada após sedimentação foi de 0,65%. Segundo Veloso et. al (1991), o valor dessa relação pode ser utilizado como um indicador simples do estado da cultura. Valores inferiores a 1% indicam uma maior contribuição por parte da cultura de organismos heterotróficos do que de organismos autotróficos, como por exemplo uma maior presença de bactérias em detrimento à população de microalgas.

9.3.2. Desempenho do reator híbrido anaeróbio nas diferentes fases de operação

Produção de biogás

O desempenho do reator híbrido anaeróbio em termos de geração de biogás está apresentado na Figura 9.3.

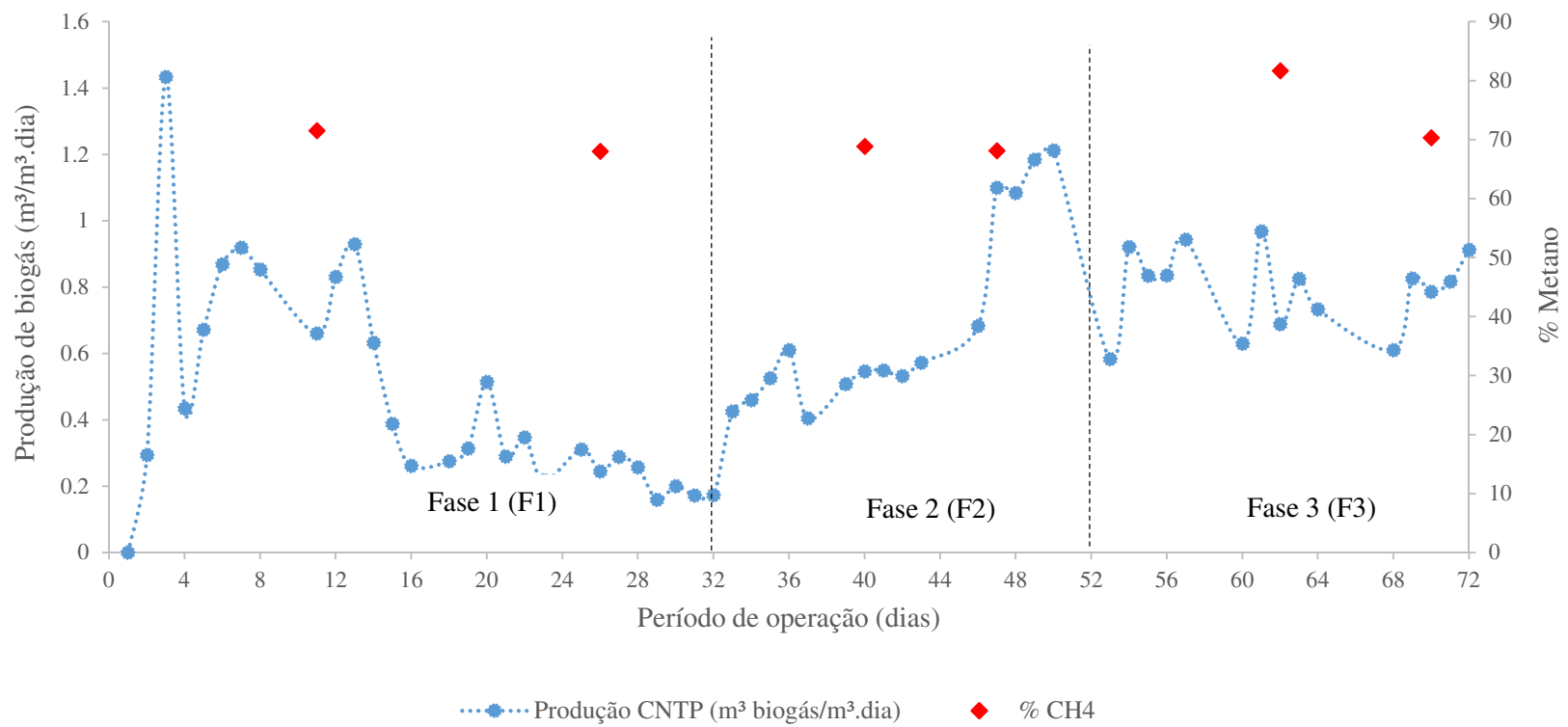


Figura 9.3 - Produção de biogás do reator híbrido anaeróbico para as três fases de operação.

Durante os 72 dias de operação do reator, observou-se uma produção de biogás variável, com tendências de crescimento ao longo do tempo. Em termos gerais, a qualidade do biogás, ou seja, a porcentagem de metano no biogás, pouco sofreu alterações entre as fases, no entanto, a quantidade de biogás gerada variou em cada uma das fases de operação.

A fase F1 apresentou dois comportamentos distintos, podendo ser distinguidas duas subfases. Nos primeiros 15 dias, notou-se a interferência da alimentação anterior (efluente da bovinocultura) com média de produção de $0,77 \text{ m}^3/\text{m}^3.\text{dia}$ (desvio padrão de 0,3). Portanto, até metade da fase F1, o reator operou com dois substratos: biomassa algal e efluente de bovinocultura, gerando uma grande variabilidade e os elevados valores de produção observados no início dessa fase. A segunda metade da fase F1 foi caracterizada pela operação do reator apenas com o substrato biomassa algal, já sem grande interferência por parte do efluente da bovinocultura, que resultou numa maior estabilidade refletida na menor variação e na média de produção de $0,27 \text{ m}^3/\text{m}^3.\text{dia}$ (desvio padrão de 0,09). Produtividades relativas atingiram valores de $0,05 \text{ L CH}_4/\text{g DQO}$ ou $0,08 \text{ L CH}_4/\text{g STV}$.

Em relação à literatura de digestão anaeróbia de biomassa algal, de acordo com Tabela 9.1, percebe-se que o desempenho do reator híbrido foi comparável com os resultados apresentados em literatura, com produções próximas das descritas para outros tipos de reatores anaeróbios digerindo biomassa algal pura.

Na fase F2, a adição de água ruça ao substrato biomassa algal serviu para testar o efeito da complementariedade de substratos, efeito este que somente foi sentido após duas semanas de alimentação, a partir do 46º dia de operação. Dessa forma, a subfase inicial da fase F2, com a média de produção de $0,52 \text{ m}^3/\text{m}^3.\text{dia}$ (desvio padrão de 0,08), caracterizou-se por ser um período de adaptação da biomassa estabelecida no reator ao novo substrato que continha a água ruça, resíduo rico em carga orgânica e em compostos tóxicos (vide Tabela 9.3). O sucesso da adaptação pôde ser observado nos elevados valores de produção de biogás - média de $1,14 \text{ m}^3/\text{m}^3.\text{dia}$ (desvio padrão de 0,06) - atingidos na última semana de operação. Produtividades relativas foram 3 vezes superiores ao rendimento obtido na fase F1, com $0,16 \text{ L CH}_4/\text{g DQO}$ ou $0,25 \text{ L CH}_4/\text{g STV}$.

A fase F3, por sua vez, apresentou a média de produção de $0,79 \text{ m}^3/\text{m}^3.\text{dia}$ (desvio padrão de 0,12) e produtividades relativas de $0,08 \text{ L CH}_4/\text{g DQO}$ ou $0,21 \text{ L CH}_4/\text{g STV}$,

indicando que o pré-tratamento térmico não garantiu uma maior produção de biogás, tampouco a estabilidade do processo. No entanto, foi na fase F3 que a maior porcentagem de metano no biogás foi observada, atingindo valores próximos de 82%. Nas demais fases, o teor de metano no biogás ficou estável, variando entre 68 e 72%. Ademais, apesar de apresentar rendimento semelhante ao da fase F2 em termos de produção de metano, a COV aplicada na fase F3 foi superior em quase o dobro das demais fases, indicando a maior adaptação da biomassa para suportar elevadas cargas orgânicas nessa fase. Essa adaptação pode ser explicada devido ao prolongado tempo de operação do reator.

A fase F2 se mostrou mais eficiente na produção de biogás, destacando que a complementariedade de substratos nas condições avaliadas atingiu melhores resultados do que o pré-tratamento da biomassa algal.

Remoção de poluentes

O desempenho do reator para as variáveis monitoradas está apresentado na Tabela 9.5.

Tabela 9.5 - Desempenho de remoção do reator para as variáveis monitoradas nas diferentes fases de operação.

Fases de operação		NTK (g/L)	N-NH ₃ (g/L)	Fenóis totais (g/L)	ST (g/L)	STV (g/L)
F1	Entrada	1,96	0,03	NR	23,31	15,28
	Saída	2,00	0,37	NR	21,42	13,53
	Remoção (%)	-2,04	-1220	-	8,09	11,43
F2	Entrada	1,54	0,02	0,77	27,51	18,64
	Saída	0,92	0,22	0,60	12,46	7,72
	Remoção (%)	40,00	-1233	21,62	54,71	58,59
F3	Entrada	1,48	0,02	0,86	26,48	16,77
	Saída	2,02	0,32	0,66	14,97	8,58
	Remoção (%)	-36,48	-1325	23,83	43,49	48,85

NR = não realizado. NTK=nitrogênio total kjeldahl; N-NH₃=nitrogênio amoniacal; ST=sólidos totais; STV=sólidos totais voláteis. Valores negativos de remoção indicam incremento.

Como era de se esperar, observou-se o aumento da concentração de nitrogênio amoniacal na saída do reator em todas as fases de operação. O NTK apresentou uma redução da sua concentração à saída no ensaio F2, tendo sido mantido em valores próximos do registrado no afluente para os ensaios das fases F1 e F3. Os resultados das fases F1 e F3 podem ser relacionados com o desprendimento do manto anaeróbio e a sua consequente saída em conjunto com o substrato digerido.

A eficiência de remoção para fenóis totais foi de 22-24%. As remoções de fenóis obtidas em cada uma das fases experimentais com água ruça (F2 e F3) foram semelhantes entre si, mas podem ser consideradas baixas em comparação com outros estudos. Gonçalves et

al. (2012a), utilizando o mesmo reator no tratamento de água ruça através de substituições sucessivas de efluente de suinocultura, atingiram remoções entre 51-61%. Remoção média de 38% de fenóis totais foi obtida em reator anaeróbio ascendente para biomassa não aclimatada e alimentação contínua utilizando como substrato água ruça (Gonçalves et al., 2012b).

Em relação aos sólidos, verifica-se que a fase F1 se destaca negativamente em relação às outras fases, com uma pequena remoção tanto para ST como para STV. Como já destacado, esse comportamento foi devido à perda de sólidos na saída do reator. Comparativamente, a fase F2 apresentou uma maior capacidade de remoção em sólidos do que a fase F3. No entanto, ressalta-se que a remoção de STV foi sempre superior à de ST, indicando o acúmulo de material orgânico no interior do reator.

Na Figura 9.4 são apresentados os resultados de monitoramento do perfil do reator durante as três fases de operação para as demais variáveis monitoradas.

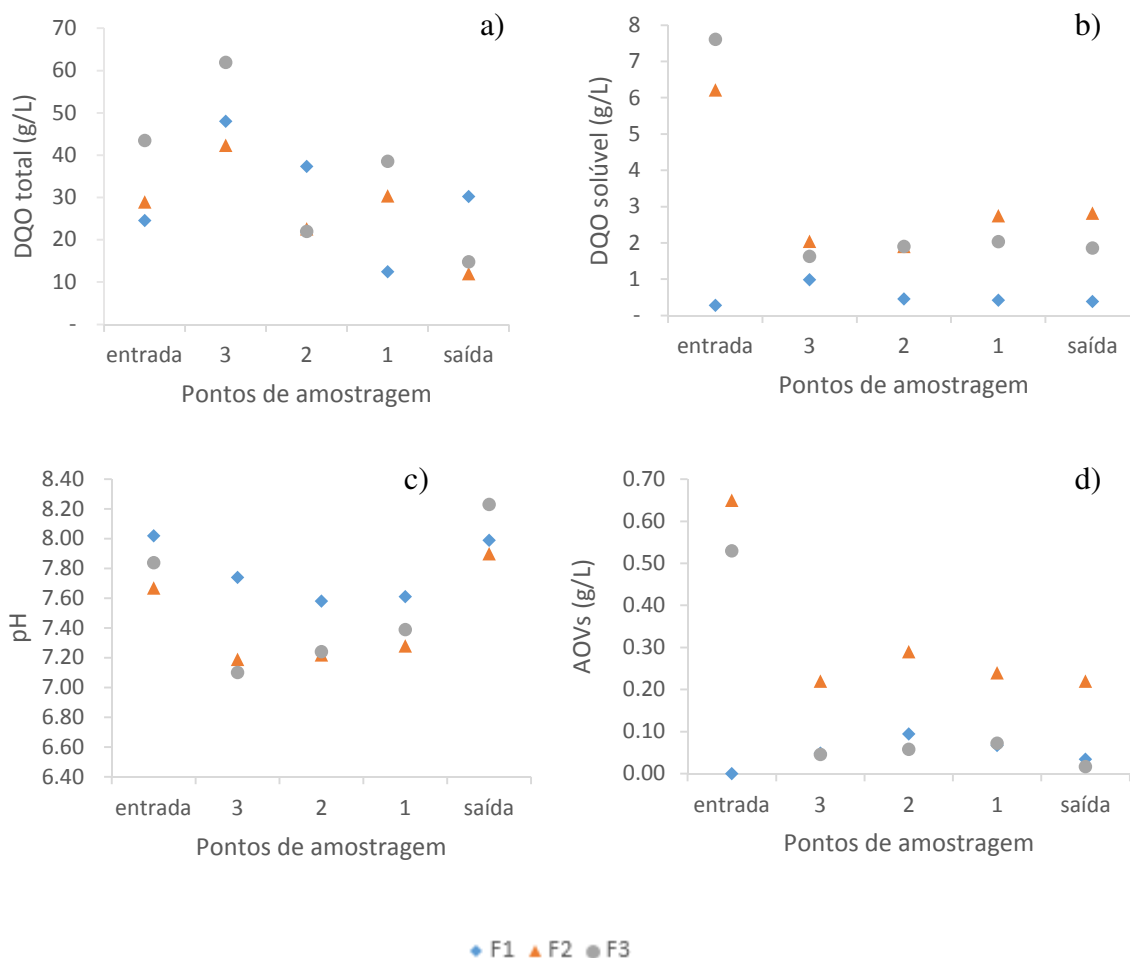


Figura 9.4 - Resultados do perfil do reator para as três fases de operação do reator híbrido anaeróbico (F1= substrato biomassa algal; F2= substratos biomassa algal +10% (v/v) água ruça; F3= biomassa algal pré-tratada + 10% (v/v) água ruça): a) DQO total; b) DQO solúvel; c) pH; d) ácidos orgânicos voláteis (AOVs).

O comportamento do reator híbrido durante a digestão da biomassa algal úmida (F1) diferenciou-se dos comportamentos observados nos ensaios F2 e F3, em que o substrato a ser digerido continha algas e 10% (v/v) de água ruça. Por outro lado, os ensaios F2 e F3 apresentaram um comportamento bastante semelhante entre si, sugerindo a influência da presença da água ruça no processo.

Em termos de DQO_{total}, as fases 2 e 3 apresentaram comportamentos semelhantes ao longo do perfil do reator, com remoções de 66 e 58,5% para as fases 3 e 2, respectivamente. O substrato complementar, água ruça, ajudou no processo de remoção de matéria orgânica, muito provavelmente pelo melhor equilíbrio do substrato total, ajudando na melhor adaptação dos organismos responsáveis pela digestão. O pré-tratamento térmico, com a fervura da biomassa algal (F3), pouco acrescentou em termos de concentração final de DQO_{total} do digerido. Contudo, apresentou uma maior eficiência de remoção de matéria orgânica, quando comparado com a fase F2, uma vez

que o valor de DQO_{total} do afluente foi cerca de duas vezes maior do que os valores aplicados nas fases F1 e F2.

O comportamento distinto da fase F1 indica que não houve degradação do substrato biomassa algal, mas sim incremento da DQO_{total} no efluente, o que pode ser atribuído à ocorrência de perda de biomassa ativa do interior do reator.

O perfil de remoção ao longo das alturas do reator, indicou que o ponto mais importante de degradação da matéria orgânica foi o P3, ou seja, os primeiros 7,5 cm da base do reator, onde se verificou uma maior remoção da matéria em solução. Para esse mesmo ponto, destaca-se a boa formação e consistência do manto com acúmulo de biomassa ativa, observados através do comportamento de aumento da DQO_{total} e do decréscimo da $DQO_{solúvel}$ em todas as fases de operação, em relação às concentrações registradas no afluente ao reator. O P1, por sua vez, indica a importância quanto à eficiência do meio de enchimento. Para esse ponto, volta-se a destacar a ocorrência de comportamentos opostos entre a fase F1 e as fases F2 e F3 em termos de DQO_{total} . Comportamento idêntico ao registrado para a variável DQO_{total} foi observado para a variável $DQO_{solúvel}$, em que a proximidade dos valores finais para as fases F2 e F3, indicam que a aplicação do pré-tratamento não se apresentou de grande interesse por não se verificar ganhos de remoção, em comparação com a estratégia de adição de um substrato complementar. A fase F1, na qual não houve adição de AR, apresentou valores mais baixos de $DQO_{solúvel}$, se diferenciando das demais fases no comportamento de remoção da matéria orgânica solúvel ao longo da altura do reator.

O pH encontrou-se entre valores de 7,1 e 8,2, tendo sido observado uma tendência crescente ao longo da altura do reator, em todas as fases de operação. A exceção diz respeito ao ponto P3, onde se registraram os valores mais baixos de pH, indicando novamente que a degradação de matéria orgânica ocorreu com preponderância na base do reator. A confirmação desta constatação foi a intensa atividade acidogênica, ilustrada pela maior remoção de AOVs observada no P3. Ressalta-se a diferença de remoção dos AOVs nesse mesmo ponto entre as fases F2 e F3, com maior eficiência de remoção para a fase F3. Na fase F1, na qual não houve adição de água ruça ao substrato biomassa algal, observa-se a formação de AOVs ao longo da coluna do reator que se considera ser inerente ao desenvolvimento do processo de digestão anaeróbia.

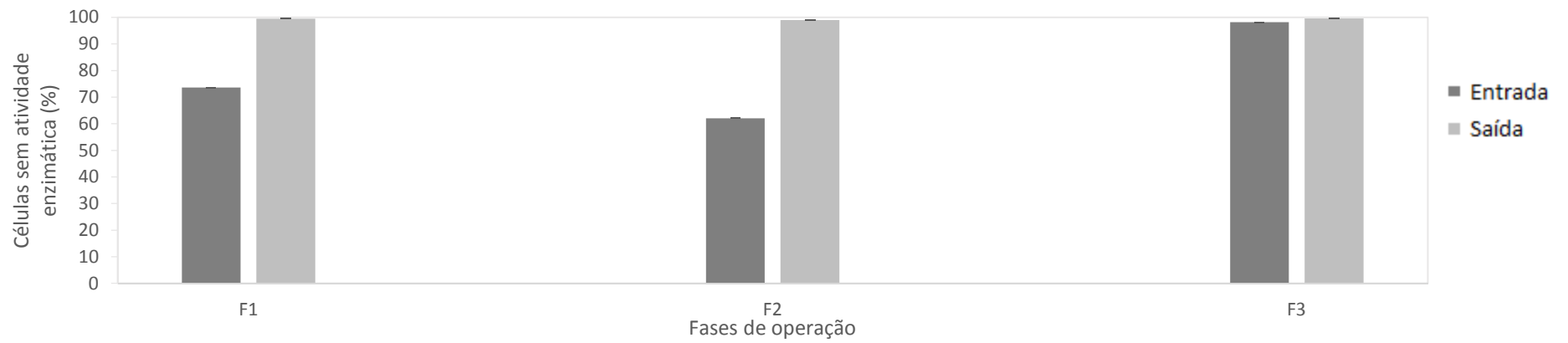
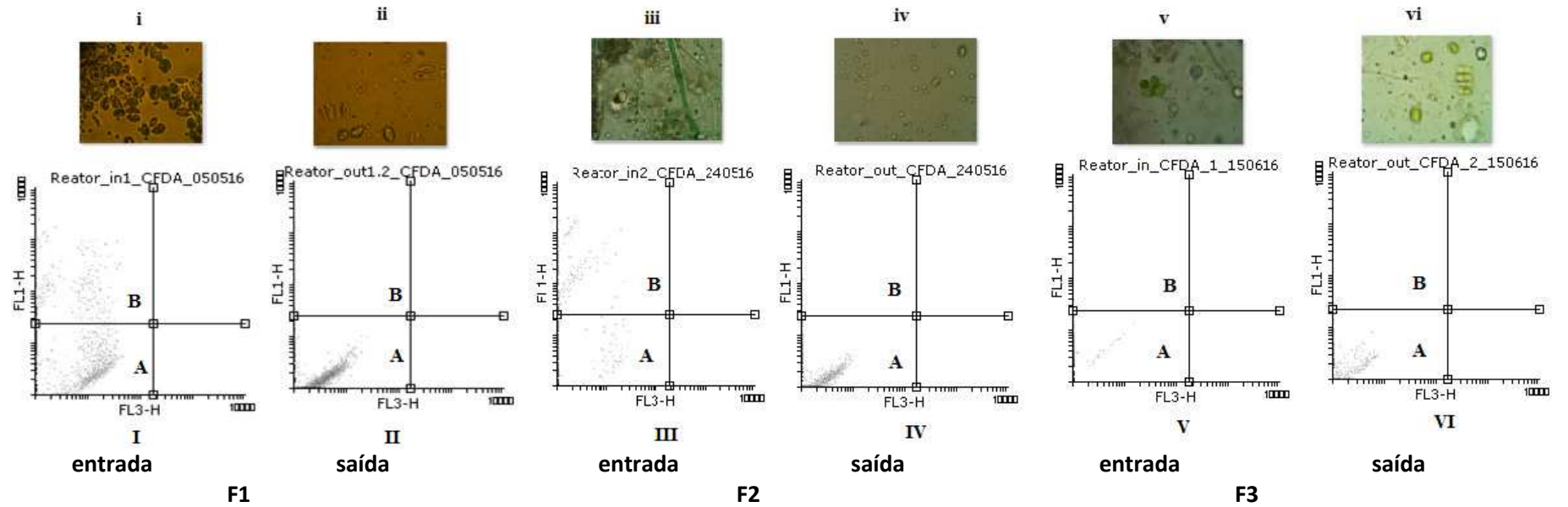
Comparando a eficiência do reator híbrido do atual estudo com a eficiência do mesmo reator na digestão de outros substratos, constatou-se o mau desempenho do mesmo

quando é utilizada a biomassa algal como substrato. Gonçalves et al. (2012a) operando o mesmo reator com 83% de volume preenchido com água ruça e TDH=5,7 dias, reportaram produções de biogás superiores a 3 m³/m³ dia, com teor de metano de 62% e remoção de 80% de DQOsolúvel. O baixo desempenho do reator com a utilização da biomassa algal como substrato pode ser atribuído à difícil biodegradabilidade da biomassa algal, devida à dificuldade em romper a parede celular mesmo após tratamento térmico. Outro provável argumento diz respeito à elevada fração particulada do substrato, podendo este substrato não ser ideal para um reator híbrido. Durante o período de monitoramento, a expansão do leito levou à perda de sólidos e, provavelmente, à perda de biomassa anaeróbia ativa com o efluente tratado. Dessa forma, a formação de um manto resistente e bem adaptado, que constitui o fator primordial para o bom funcionamento de um reator híbrido, foi prejudicada. Na fase F1, durante a qual esse problema foi mais acentuado, a porcentagem de sólidos no volume total do efluente coletado variou de 25 a 80% (v/v).

Atividade e integridade das células algais

Os resultados de citometria de fluxo para as células algais na entrada e saída do reator híbrido em cada fase de operação estão apresentados nas Figuras 9.5a e 9.5b.

a)



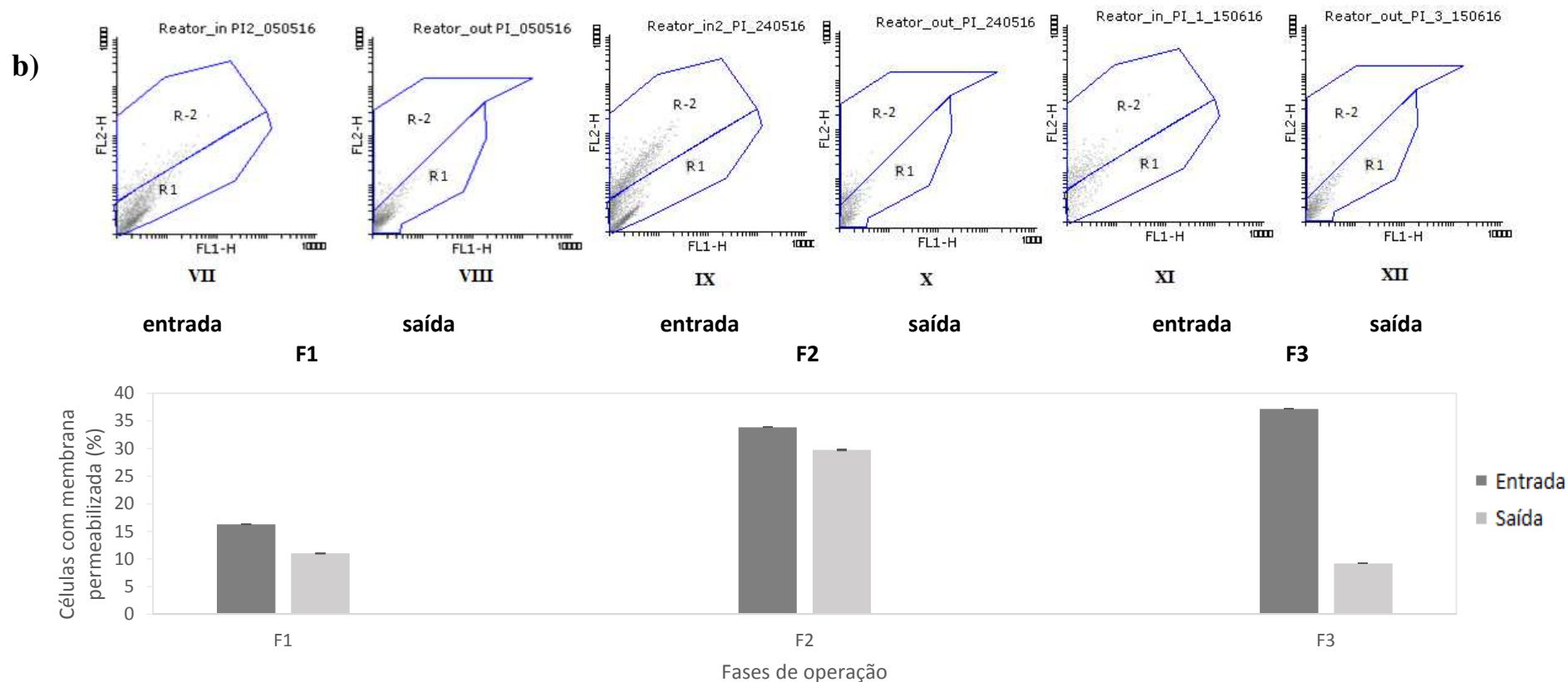


Figura 9.5 - Citometria de fluxo para as células algais na entrada e saída do reator híbrido em cada fase de operação. a) % de células sem atividade enzimática; i, ii, iii, iv, v e vi correspondem à análise microscópica (x100); I, II, III, IV, V e VI correspondem aos gráficos de densidade; Quadrante A corresponde à região do citograma não marcada (sem atividade enzimática) pelo corante cFDA; Quadrante B corresponde à região do citograma marcada pelo corante cFDA. b) % de células com membrana permeabilizada; VII, VIII, IX, X, XI e XII correspondem aos gráficos de densidade; Região R-1 corresponde à região do citograma não marcada (células impermeáveis) pelo corante IP; Região R-2 corresponde à região do citograma marcada pelo corante IP.

Independente da fase de operação, as amostras do digestato apresentaram maiores porcentagens de células sem atividade metabólica, com valores próximos de 100%, quando comparadas com as amostras de entrada do reator. No caso da fase F3, o fato de o valor da entrada ter praticamente igualado o da saída pode ser atribuído ao efeito do pré-tratamento aplicado à biomassa algal, usada como substrato.

Por outro lado, as maiores porcentagens de células com membrana permeabilizada foram observadas nas amostras da entrada do reator, em todas as fases de operação, com uma maior expressão nos ensaios das fases F2 e F3, devido à adição do substrato AR e do pré-tratamento térmico aplicado à biomassa algal afluyente ao reator. Na fase F3 esse resultado é mais evidente, indicando que células com membrana rotas, devido à aplicação do pré-tratamento, estão se mantendo no interior do reator, enquanto as células intactas seguem o fluxo de saída. Os resultados de células impermeáveis/ativas refletem a integridade da membrana celular, podendo indicar a eficiência do pré-tratamento aplicado para a ruptura da parede celular das microalgas. No presente caso, a utilização da fervura proporcionou uma eficiência de 37,2% no rompimento das células algais. A baixa eficiência pôde ser comprovada em análises de microscopia óptica que indicaram células algais (Figura 4.8a), tanto na entrada quanto na saída do reator durante a fase F3, com parede celular íntegra e bem delimitada, indicando que grande parte do substrato não esteve disponível para a degradação mesmo com o pré-tratamento. Provavelmente, o tempo utilizado na fervura foi insuficiente para a quebra da parede celular. A adição do substrato AR foi responsável por um aumento de células com membrana permeabilizada na entrada do reator de 16,3% na fase F1 para 33,8% na fase F2.

9.4. Conclusões

O reator híbrido anaeróbico se mostrou uma alternativa tecnicamente viável para maximizar a recuperação energética da biomassa algal. No entanto, perdas de biomassa anaeróbia foram frequentemente observadas durante a operação. A base do reator foi caracterizada como a seção biologicamente mais ativa, sendo responsável pela degradação de grande parte da fração solúvel da matéria orgânica disponível e onde houve a predominância da fase acidogênica da degradação.

O pré-tratamento térmico não se mostrou eficiente na ruptura da parede celular, refletindo o não incremento da produção de biogás.

Foi demonstrado que a estratégia de alimentação baseada na complementariedade de substratos, com a substituição de 10% do volume de biomassa algal por água ruça se mostrou eficiente na produção de biogás, triplicando a produtividade de metano obtida com a digestão da biomassa algal pura. Adicionalmente, destaca-se a economia de recursos e a facilidade operacional proporcionados, quando comparada com a operação do reator a operar com a biomassa algal pré-tratada.

9.5. Referências Bibliográficas

AOAC, Association of official analytical chemists. Official methods of analysis. 18 ed. Washington, D. C.: AOAC, 2000.

APHA. Standard Methods for examination of water and wastewater. Washington: American Water Work Association, Water Environmental Federation. 2012.

Atkinson, A.W.Jr., Gunning, B.E.S., John, P.C.L. Sporopollenin in the cell wall of *Chlorella* and other algae: ultrastructure, chemistry, and incorporation of ¹⁴C-acetate, studied in synchronous cultures. *Planta*, 107, pp 1–32. 1972.

Ayati, B., Ganjidoust, H. Comparing the efficiency of UAFF and UASB with hybrid reactor in treating wood fiber wastewater. *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 3(1), pp 39-44. 2006.

Burczyk, J. Studies concerning carotenoids and sporopollenin in algal cell walls. Postdoctoral degree thesis .Cracov, Institute of Zootechnics. 1982.

Chen, W.T., Zhang, Y., Zhang, J., Yu, G., Shideman, L.C., Zhang, P., Minarick, M. Hydrothermal liquefaction of mixed-culture biomass from wastewater treatment system into bio-crude oil. *Bioresource Technology*, 152, pp 130-139. 2014.

El-Gohary F, Tawfik A, Badawy M, El-Khateeb MA. Potentials of anaerobic treatment for catalytically oxidized olive mill wastewater (OMW). *Bioresource Technology*, 100(7), pp 2147-54. 2009.

European Commission. Reference document on best available techniques for the waste treatments industries. Integrated pollution prevention and control. 2005.

Gonçalves, M.R., Freitas, P., Marques, I.P. Bioenergy recovery from olive mil effluent in a hybrid reactor. *Biomass & Bioenergy*, 39, pp 253-260. 2012a.

Gonçalves, M.R., Costa, J.C., Marques, I.P, Alves, M.M. Strategies for lipids and phenolics degradation in the anaerobic treatment of olive mill wastewater. *Water Research*, 46, pp 1684-1692. 2012b.

González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P. Effect of organic loading rate on anaerobic digestion of thermally pretreated *Scenedesmus* sp. biomass. *Bioresource Technology*, 129, pp 219–223. 2013.

- González-Fernández, C., Sialve, B., Molinuevo-Salces, B. Anaerobic digestion of microalgal biomass: Challenges, opportunities and research needs. *Bioresource Technology*, 198, pp 896-906. 2015.
- Karagiannidis, A., Perkoulidis, G. A multi-criteria ranking of different technologies for the anaerobic digestion for energy recovery of the organic fraction of municipal solid wastes. *Bioresource Technology*, 100, pp 2355-60. 2009.
- Khalid, A., Arshad, M., Anjum, M., Mahmood, T., Dawson, L. Review-the anaerobic digestion of solid organic waste. *Waste Management*, 31, pp 1737-44. 2011.
- Kinnunen, V., Craggs, R., Rintala, J. Influence of temperature and pretreatments on the anaerobic digestion of wastewater grown microalgae in a laboratory-scale accumulating-volume reactor. *Water Research*, 57, pp 247-257. 2014.
- Kwietniewska, E., Tys, J. Process characteristics, inhibition factors and methane yields of anaerobic digestion process, with particular focus on microalgal biomass fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 34, pp 491-500. 2014.
- Mahdy, A., Mendez, L., Ballesteros, M., González-Fernández, C. Protease pretreated *Chlorella vulgaris* biomass bioconversion to methane via semicontinuous anaerobic digestion. *Fuel*, 158, pp 3–41. 2015.
- Marques, I.P. Anaerobic digestion treatment of olive mill wastewater for effluent re-use in irrigation. *Desalination*, 137, pp 233-9. 2001.
- Mehrabadi, A., Craggs, R., Farid, M.M. Wastewater treatment high rate algal ponds (WWT HRAP) for low-cost biofuel production. *Bioresource Technology*, 184, pp 202-14. 2015.
- Mendez, L., Mahdy, A., Timmers, R.A., Ballesteros, M., González-Fernández, C. Enhancing methane production of *Chlorella vulgaris* via thermochemical pretreatments. *Bioresource Technology*, 149, pp 136–141. 2013.
- Passos, F., Ferrer, I. Influence of hydrothermal pretreatment on microalgal biomass anaerobic digestion and bioenergy production. *Water Research*, 68, pp 364– 373. 2015.
- Prajapati, S.K., Kaushik, P., Malik, A., Vijay, VK. Phycoremediation coupled production of algal biomass, harvesting and anaerobic digestion: Possibilities and challenges. *Biotechnology Advances*, 31, pp 1408-1425. 2013.
- Ras, M., Lardon, L., Sialve, B., Bernet, N., Steyer, J.P. Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 102, pp 200–206. 2011.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, pp 144-158. 1965.
- Tartakovsky, B., Lebrun, F.M., McGinn, P.J., O’Leary, S.J.B., Guiot, S.R. Methane production from the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD in a continuous anaerobic reactor. *Algal Research*, 2, pp 394–400. 2013.

- Tartakovsky, B., Lebrun, F.M., Guiot, S.T. High-rate biomethane production from microalgae biomass in a UASB reactor. *Algal Research*, 7, pp 86-91. 2015.
- Veloso, V., Reis, A., Gouveia, L., Fernandes, H.L., Empis, J.A., Novais, J.M. Lipid Production by *Phaeodactylum tricornutum*. *Bioresource Technology*, 38(2-3), pp 115-119. 1991
- Vergara-Fernandez, A., Vargas, G., Alarcon, N., Velasco, A. Evaluation of marine algae as a source of biogas in a two-stage anaerobic reactor system. *Biomass and Bioenergy*, 32, pp 338-344. 2008.
- Ward, A.J., Hobbs, P.J., Holliman, P.J., Jones, D.L. Optimization of the anaerobic digestion of agricultural resources. *Bioresource Technology*, 99, pp 7928-40. 2008.
- Weiland, P. Biogas production: current state and perspectives. *Applied Microbiology*, 102, pp 207-14. 2011.
- Weng, J.K., Chapple, C. The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytology*, 187, pp 273–85. 2010.
- Zamalloa, C., Boon, N., Verstraete, W. Anaerobic digestibility of *Scenedesmus obliquus* and *Phaeodactylum tricornutum* under mesophilic and thermophilic conditions. *Applied Energy*, 92, pp 733-738. 2012a.
- Zamalloa, C., De Vrieze, J., Boon, N., Verstraete, W. Anaerobic digestibility of marine microalgae *Phaeodactylum tricornutum* in a lab-scale anaerobic membrane bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, pp 859–869. 2012b.
- Zamalloa, C., Vulsteke, E., Albrecht, J., Verstraete, W. The techno-economic potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae. *Bioresource Technology*, 102, pp 1149-1158. 2011.

10. CONCLUSÃO GERAL

A extração lipídica aumentou o rendimento da produção de biogás, tornando mais disponível o conteúdo intracelular e se caracterizando como um eficiente pré-tratamento da biomassa algal. No entanto, após análise energética, concluiu-se pelo pouco ganho energético acumulado da etapa de extração lipídica, devido ao baixo acúmulo lipídico da biomassa produzida em efluentes. O aproveitamento lipídico da biomassa se mostrou inviável energeticamente e a geração de biogás da biomassa bruta foi a rota energética mais favorável, tanto para biomassa produzida em lagoas de alta taxa com esgoto doméstico, como para biomassa cultivada em fotobiorreator coluna de bolhas com efluentes da indústria de processamento de carnes.

O reator híbrido anaeróbio se apresentou como uma alternativa tecnicamente viável para maximizar a recuperação energética da biomassa algal, no entanto, o pré-tratamento térmico não se mostrou eficiente na ruptura da parede celular, refletindo o não incremento da produção de biogás. A água ruça se mostrou um substrato complementar eficiente para digestão anaeróbia da biomassa algal produzida em esgoto doméstico e em efluente da indústria cervejeira, permitindo melhor rendimento do processo, tanto nos testes em batelada quanto em modo de alimentação semi-contínua do reator híbrido, além de economia de recursos, facilidade operacional e aproveitamento energético de mais de um resíduo. A importância do meio de cultivo e conseqüentemente da composição química da biomassa algal para a complementariedade de substratos na digestão anaeróbia puderam ser confirmados.

Acredita-se que através do presente estudo foi possível avaliar uma rota promissora de produção de biocombustíveis a partir do tratamento de efluentes, elucidando limitações importantes para a aplicação e ampliação do processo. Temas emergentes e de grande importância no contexto mundial e principalmente nacional, foram abordados, nomeadamente o aproveitamento de resíduos e a questão energética, tornando o saneamento ambiental mais atrativo dos pontos de vista econômico e de sustentabilidade, e propondo alternativas de diversificação da matriz energética com o uso de biocombustíveis oriundos de biomassa algal.

11.SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS

A digestão anaeróbia de biomassa algal apesar de muito explorada em literatura, ainda carece de elucidações, principalmente no que tange a utilização de efluentes como meio de cultivo. A influência de diferentes efluentes nas características da biomassa a ser digerida merece mais destaque, bem como possíveis usos da biomassa residual após o processo. Aplicações da biomassa residual após a digestão anaeróbia devem ser demonstradas, de forma a se fechar o ciclo de produção, maximizando o aproveitamento da biomassa e agregando valor ao produto final. Em um contexto de biorrefinaria, a digestão anaeróbia já é empregada como tecnologia auxiliar para valorizar correntes residuais, no entanto, deve-se potencializar seu uso como tecnologia principal. Portanto, produtos mais valorados economicamente como os AOVs e AGCM devem ser explorados dentro de uma biorrefinaria de biomassa algal baseada na digestão anaeróbia.

De forma a tornar o processo viável e aplicável em escala real, estudos devem focar na melhoria da digestão anaeróbia de biomassa algal através da implementação de processos inovadores de pré-tratamento e complementariedade de substratos, bem como estratégias de operação e de configurações de reatores, além de estudos sobre a comunidade microbiológica anaeróbia estabelecida durante o processo.

Em relação aos reatores, pesquisas devem focar no desenvolvimento de novos modelos de reatores, que permitam a operação com baixos TDH e elevada COV (González-Fernández et al., 2015). Estudos disponíveis concentram-se na pequena escala e na alimentação de reatores feita em batelada. São poucos os estudos envolvendo reatores com alimentação contínua para digestão de biomassa algal, o que dificulta a aplicação dos resultados obtidos (González-Fernández et al., 2015). A ampliação da escala é de fundamental importância quanto à viabilidade e sustentabilidade do processo, na medida em que permite uma maior confiabilidade dos dados e difusão da tecnologia. Além disso, como a digestão anaeróbia representa um sistema ecológico delicadamente balanceado, envolvendo processos metabólicos complexos que ocorrem em etapas sequenciais com grande sensibilidade a choques de carga, pH e temperatura, o escalonamento do processo é essencial para definição dos parâmetros de controle e monitoramento do processo. Além disso, estudos econômicos disponíveis são baseados em modelos teóricos. A disponibilidade de dados de plantas em escala real certamente ajudaria na obtenção de informações mais confiáveis sobre a viabilidade econômica de uma biorrefinaria de

microalgas. A maioria dos resultados são suposições e extrapolações de experimentos laboratoriais e sistemas de pequena escala ao ar livre

Por último, mas não menos importante, ressalta-se a grande aplicabilidade da citometria de fluxo para o campo da biotecnologia de microalgas. Essa ferramenta deve ser mais explorada, principalmente no que diz respeito ao monitoramento da produção, simplificando e acelerando procedimentos analíticos tradicionalmente aplicados e também na decisão sobre o uso final da biomassa a ser colhida. Metodologias e técnicas dessa ferramenta para cultivos mistos ainda carecem de otimização e sua aplicação na área de produção de biomassa algal durante o tratamento de efluentes merece maior atenção.

12.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmad, A.L., Mat Yasin, N.H., Derek, C.J.C., Lim, J.K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15, pp 584-593. 2011.

Alzate, M.E., Muñoz, R., Rogalla, F., Fdz-Polanco, F., Pérez-Elvira, S.I. Biochemical methane potential of microalgae: influence of substrate to inoculum ratio, biomass concentration and pretreatment. *Bioresource Technology*, 123, pp 488-494. 2012.

Assemany, P. P. Efeito da radiação solar e pré-desinfecção na caracterização lipídica de biomassa cultivada em lagoas de alta taxa utilizando esgoto doméstico. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Universidade Federal de Viçosa. 113 p. 2013.

Assemany, P. P., Calijuri, M. L., Couto, E. A., Santiago, A. F., Reis, A. J. D. Biodiesel from wastewater: lipid production in high rate algal pond receiving disinfected effluent. *Water Science and Technology*, 71(8), pp 1229-1234. 2015.

Assemany, P.P., Calijuri, M.L., Santiago, A.F., do Couto, E.A., Leite, M. O., Sierra, J.J.B. Effect of solar radiation on the lipid characterization of biomass cultivated in high-rate algal ponds using domestic sewage. *Environmental Technology*, 35(18), pp 2296-2305. 2014.

Assis, L.R. Cultivo de microalgas em esgoto doméstico com utilização de sistemas híbridos: lagoas de alta taxa e biorreator em filme. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Universidade Federal de Viçosa. 102p. 2016.

Brennan, L., Owende, P. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, pp 557-577. 2010.

Castro, J.S. Biofilme de microalgas no solo: emissão de gases de efeito estufa, volatilização de amônia e crescimento de *Pennisetum glaucum*. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Universidade Federal de Viçosa. 112p. 2016.

Castro, J.S.; Calijuri, M.L.; Assemany, P. P.; Cecon, P. R.; Assis, I. R.; Ribeiro, V. J. Microalgae biofilm in soil: Greenhouse gas emissions, ammonia volatilization and plant growth. *Science of the Total Environment*, 574, pp 1640-1648, 2017.

Chen, P.H., Oswald, W.J. Thermochemical treatment for algal fermentation. *Environmental International*, 24, pp 889-897. 1998.

Collet, P., Hélias, A., Lardon, L., Ras, M., Goy, R.A., Steyer, J.P. Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production. *Bioresource Technology*, 102, pp 207-214. 2011.

Costa, L.S. Tratamento de efluentes primário e secundário da indústria de carnes com microalgas. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Universidade Federal de Viçosa. 114p. 2016b.

Costa, T.O. Potencial energético de biomassas algais obtidas em lagoas de alta taxa para a produção de biocombustíveis sólidos. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil). Universidade Federal de Viçosa. 67p. 2016a.

Costa, T.O., Calijuri, M.L., Avelar, N.V., Carneiro, A.C.O., Assis, L.R. Energetic potential of algal biomass from high rate algal ponds for the production of solid biofuels. *Environmental Technology*, 17, pp 1-11. 2016.

Couto, E.A. Produção de biomassa em lagoas de alta taxa com diferentes profundidades e seu aproveitamento para geração de energia via liquefação hidrotérmica. Tese (Doutorado em Engenharia Civil). Universidade Federal de Viçosa. 244p. 2016.

Eisenberg DM, Benemann JR, Weissman JC, Oswald WJ. Large-scale freshwater microalgae biomass production for fuel and fertilizer, final report. Golden, Colorado: Solar Energy Research Institute, 1981

Fu, C.C., Hung, T.C., Chen, J.Y., Su, C.H., Wu, W.T. Hydrolysis of microalgae cell walls for production of reducing sugar and lipid extraction. *Bioresource Technology*, 101, pp 8750-8754. 2010.

Golueke CG, Oswald WJ, Gotaas HB. Anaerobic digestion of algae. *Applied Microbiological*, 5, pp 47-55. 1957.

González-Delgado, A.D., Kafarov, V. Microalgae based biorefinery: issues to consider. *CT&F—Ciencia, Tecnología y Futuro*, 4(4), pp 5–22. 2011.

González-Fernández, C., Sialve, B., Molinuevo-Salces, B. Anaerobic digestion of microalgal biomass: Challenges, opportunities and research needs. *Bioresource Technology*, 198, pp 896-906. 2015.

Harun, R., Davidson, M., Doyle, M., Gopiraj, R., Danquah, M., Forde, G. Technoeconomic analysis of an integrated microalgae photobioreactor, biodiesel and biogas production facility. *Biomass and Bioenergy*, 35, pp 741-747. 2011.

Kwietniewska, E., Tys, J. Process characteristics, inhibition factors and methane yields of anaerobic digestion process, with particular focus on microalgal biomass fermentation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 34, pp 491-500. 2014.

Mussnug JH, Klassen V, Schluter A, Kruse O. Microalgae as a substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of Biotechnology*, 150, pp 51-56. 2010.

Passos, F., Solé, M., García, J., Ferrer, I. Biogas production from microalgae grown in wastewater: Effect of microwave pretreatment. *Applied Energy*, 108, pp 168-175. 2013.

Ramos-Suárez, J., Carreras, N. Use of microalgae residues for biogas production. *Chemical Engineering Journal*, 242, pp 86-95. 2014.

Ritchie, RJ. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c and d, and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica*, 46 (1), pp 115-126. 2008.

Santiago, A. F. Avaliação do desempenho de lagoas de alta taxa no tratamento de esgoto pré-desinfestado submetidas a diferentes níveis de radiação solar. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) Universidade Federal de Viçosa. 158p. 2013.

- Santiago, A. F., Calijuri, M. L., Assemany, P. P., Calijuri, M. C., Reis, A. J. D. Algal biomass production and wastewater treatment in high rate algal ponds receiving disinfected effluent, *Environmental Technology*, 4, pp 1877 – 1885. 2013.
- Sialve, B., Bernet, N., Bernard, O. Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances*, 27, pp 409-16. 2009.
- Silva, T.L., Rosserio, J.C., Reis, A. Applications and perspectives of multi-paramter flow cytometer to microbial biofuels production. *TIBTECH*, 30, pp 225-232. 2012.
- Tango, M.D. Cultivo de microalgas em efluentes da indústria de beneficiamento de carnes em fotobiorreator do tipo coluna de bolhas. Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil. Dissertação. 100p. Viçosa, 2015.
- Uziel, M. Solar energy fixation and conversion with algal bacterial systems. PhD thesis. University of California, Berkeley, CA, USA, 1978.
- Ververis, C., Georgiou, K., Danielidis, D., Hatzinikolaou, D.G., Santas, P., Santas, R., Corleti, V. Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash content of some organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. *Bioresource Technology*, 98, pp 296-301. 2007.
- Wang, M., Sahu, A.K., Rusten, B., Park, C. Anaerobic co-digestion of microalgae *Chlorella* sp. and waste activated sludge. *Bioresource Technology*, 142, pp 585–590. 2013.
- Yang, Z., Guo, R., Xu, X., Fan, X., Luo, S. Hydrogen and Methane production from lipid-extracted microalgae biomass residues (Technical communication). *International Journal of Hydrogen Energy*, 36, pp 3465-3470. 2011.
- Zamalloa, C., Boon, N., Verstraete, W. Anaerobic digestibility of *Scenedesmus obliquus* and *Phaeodactylum tricorutum* under mesophilic and thermophilic conditions. *Applied Energy*, 92, pp 733-738. 2012.
- Zhao, B., Ma, J., Zhao, Q., Laurens, L., Jarvis, E., Chen, S., Frear, C. Efficient anaerobic digestion of whole microalgae and lipid-extracted microalgae residues for methane energy production. *Bioresource Technology*, 161, pp 423-430. 2014.

13.ANEXOS

Produtos originados dessa tese.

Anexo 1

ASSEMANY, P. P., CALIJURI, M. L., BATALHA, M. H., COUTO, E. A. Energy recovery in high rate algal pond used for domestic wastewater treatment In: 11th IWA Specialist Group Conference on Wastewater Pond Technology Conference, 2016, Leeds. IWA Specialist Group, Leeds, 2016.

Energy recovery in high rate algal pond used for domestic wastewater treatment

P.P. Assemany^{1*}, M.L. Calijuri¹, M.H.B. de Souza¹ and E.A. do Couto¹

¹*Department of Civil Engineering, Núcleo de Pesquisas Ambientais Avançadas – nPA, Universidade Federal de Viçosa, Av. P.H. Rolfs – Campus da Universidade Federal de Viçosa – Viçosa, MG – Brazil – Postal Code: 36570-900.*

* *Corresponding Author, email: paula_assemany@hotmail.com*

ABSTRACT

High rate algal pond (HRAP) was evaluated according to its energy potential and productivity by two rates, net energy ratio (NER) and specific biomass productivity. All energy inputs were calculated according to one HRAP with pre-ultraviolet disinfection treating domestic sewage. The outputs were calculated for three energetic pathways: biomass burning, lipid and biogas production for the raw biomass and biomass after lipid extraction. The total lipid in dry biomass was 7.37% reaching a daily productivity of 4.6 mg/L and the biogas production potential was 0.22 m³/kg solids. For the biomass after lipid extraction, the biogas production reached 2.55 m³/kg solids, 10 times higher than the biogas potential production of the raw biomass. NER values for the raw biomass were 0.134, 0.0122 and 0.0141 for burning, lipids and biogas, respectively. The specific biomass productivity was 4.26 mg/kJ. For the residual biomass, after lipid extraction, NER value was 0.0173 for the integrated route (lipids + biogas). The biogas generation from the raw biomass was the most favorable energy route.

KEYWORDS

Bioenergy; biogas; biorefinery; lipids; microalgae.

INTRODUCTION

The search for renewable energy sources is a world reality across the depletion of fossil fuels, and due to the environmental impacts caused by them. Among renewable energy sources like sun, wind and hydroelectric, biomass is a promising source of bioenergy. Energy from biomass is regarded as one of the most important future renewable energy sources, because it can provide a continuous generation and it plays an important role in the current CO₂ mitigation policy (Appels *et al.*, 2011). Non-food alternatives and more efficient than vegetables crops used as biomass for biofuels production has been studied, and among them, microalgae come with a great potential.

The ability of microalgae to adapt and survive in a wide variety of environments is enormous and its cultivation can be combined with wastewater treatment and energy generation. Nowadays, the most targeted energy use for algal biomass is the production of biodiesel, due to large capacity of these microorganisms to accumulate lipids. However, microalgae with low lipid content are common in effluent cultivation (Chen *et al.*, 2014). In effluents, there are the presence of suspended solids that prevent solar radiation penetration, toxic substances, and other microorganisms that require nutrients and space, turning difficult the development of algal biomass, compared with cultivation

in a synthetic medium. Therefore, the anaerobic digestion of the biomass could be a potentially attractive alternative for energetic purposes.

Regardless of the production system and of the final energetic product, for the viable large-scale production of biofuels, the energy used for cultivation must be minimized in order to maximize the energy yield. The net energy analysis, which uses concepts of the lifecycle analysis, is one of the most widely accepted methods for assessing the energy potential of a system in general (Poldy, 2008). Another coefficient for assessing the efficiency of the cultivation system is biomass specific productivity, defined as the ratio between biomass productivity and the energy input, as proposed by Pegallapati *et al.* (2014).

The proposal in the current paper was to apply energy analysis in an integrated context of biorefinery, with the main objective of defining the best use of biomass, in addition to determining the energy efficiency of the production system. Therefore, we assessed the energy potential, in terms of lipids and biogas, of the biomass, prior and after lipid extraction, cultivated in a high rate algal pond (HRAP) using domestic sewage as culture medium.

MATERIALS AND METHODS

Biomass production unit

The experimental HRAP was operated with domestic sewage pre-treated by a full-scale upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor and pre-disinfected by ultra-violet (UV) disinfection. The HRAP was operated in batch mode (four batch operations: July and September 2014; and February and March 2015), until the decay phase of algal growth was reached, measured every day by the variable chlorophyll-*a* (according to APHA, 2005 and NEN 6520, 1981).

The HRAP had the following characteristics: width = 1.28 m, length = 2.86 m, total depth = 0.5 m, culture depth = 0.3 m, surface area = 3.3 m², culture volume = 1 m³. The disinfection system was designed to achieve a final concentration of 10³ MPN (100 mL)⁻¹ of *Escherichia coli*, with an adopted effective dose of 21 mJ/cm² and absorbance of 42%. The disinfection phase had the objective of removal microalgae predator's organisms and competitors for nutrients, helping the algae biomass growth.

Biomass characterization

After production, the biomass was separated and concentrated by sedimentation for posterior energy analysis. A proportion of the biomass was subjected to the processes of lipid extraction and anaerobic digestion, whereas another part of the biomass was submitted to anaerobic digestion only. The biomass obtained after lipid extraction and submitted to anaerobic tests was named residual biomass (RB). Similarly, the biomass sent directly for anaerobic digestion was named entire biomass (EB).

Both biomasses, EB and RB, were characterized in terms of chemical oxygen demand (COD), total solids (TS), total volatile solids (TVS), humidity, pH, total kjeldhal nitrogen (TKN) and total phosphorus (TP), according to APHA (2005). The phytoplankton community was also assessed at the end of each batch operation. For qualitative analysis, the samples were preserved with formaldehyde (4%). The identification and cell counting was performed with an inverted optical microscope (Olympus CK2). The morphologic and morphometric characteristics of the vegetative and reproductive cycles of significant

taxonomic value for the species were analyzed according to specialized literature (Bourrely, 1970; Parra *et al.*, 1982). The cells were counted by using 2 mL sedimentation chambers.

Lipids

The lipid content was assessed by solvent extraction, as described by Assemany *et al.* (2015). The biomass was oven dried at 50°C for 12 h and the cells disrupted with hydrochloric acid 3M. After disruption, petroleum ether and methanol were added to the dry biomass for lipid extraction, totalizing three cycles of extraction. The lipid content (% of lipids in the dry biomass) was determined gravimetrically after the evaporation of the solvent for two hours at 105°C.

Biogas

The biogas production potential (BPP) tests followed the procedures described by Jawed and Tare (1999), with modifications described by Viana *et al.* (2012). Tests were carried out using 250 mL erlenmeyers (200 mL of useful volume), filled with anaerobic sludge from an UASB reactor, substrate (EB and RB), buffer solution and distilled water, with a food to microorganism (F/M) ratio of eight to one (v/v). The best F/M was previously chosen after vary specific methanogenic activity (SMA) tests, during which others ratio were tested (four and six) and eight achieved the best performance. Micro- and macronutrients were added to prevent deficiency during the tests. The test was also performed on the control without the addition of substrate to measure the endogenous respiration of the microorganisms. After closure of the bottles, N₂ was injected for four minutes to purge the oxygen. The tests were performed at 35±2°C under continuous agitation (120 rpm) in an incubator (TECNAL, TE-420). The volume of biogas was monitored daily in a Mariotte bottle filled with 25g NaCl/L (pH=2) solution for biogas measurement. The calculation of the BPP was based on the cumulative production of biogas after 30 days of incubation, and on the mass of substrate used in the tests. Anaerobic biodegradability was also assessed, converting the biogas production to organic load, considering that at 35°C, 0.395 liters of methane correspond to 1 g of COD.

Energy analysis

The energy performance of the production system was evaluated in terms of specific productivity of biomass, P_B/E_C (mg/kJ), defined as the productivity of biomass (P_B, mg/L.d) per input energy (E_C, kJ/L.d) (Pegallapati *et al.*, 2014) and the net energy ratio (NER), which relates the total energy produced and that consumed by the system. Equation 1 presents NER calculation:

$$NER = \frac{\sum \text{Energy produced}}{\sum \text{Energy consumed}} \quad (1)$$

The produced energy can be measured in terms of the total energy content of the biomass or only with respect to its lipid and/or biogas production potential. The energy consumption for the agitation of the culture medium was considered, i.e., the energy consumed by the paddlewheels and also for the UV lamps in the disinfection unit.

Quantification of the energy consumption

The energy consumption of each operation (COP, kWh/day) was determined with Equation 2:

$$C_{OP} = \frac{24 \times P_{ot}}{1000} \quad (2)$$

where Pot is the power in W. The annual energy consumption (C_T , kJ/year) can be determined by Equation 3:

$$C_T = C_{OP} \times \text{days of operation in the year} \times 3600 \quad (3)$$

Considering the continuous operation of the HRAP during the year, Equation 3 can be substituted by Equation 4:

$$C_T = C_{OP} \times 1,314,000 \quad (4)$$

Quantification of the energy produced from lipids and biogas production

The annual energy production from the anaerobic digestion of the biomass (E_G , kJ/year) and lipids (E_L , kJ/year) was determined from the annual lipid and biogas productions, considering that: (1) the energy content of 1 L of lipids is equivalent to 35,133.33 kJ (Jorquera *et al.*, 2010), (2) the total lipid density is approximately 0.9 kg/L (Jorquera *et al.*, 2010), (3) 1 m³ of biogas equals 23,400 kJ (mean value of the interval reported by Chisti, 2007), and (4) hydraulic retention time of the HRAP was considered to be 4 days, according to Equations 5 and 6:

$$E_L = \frac{P_{L,annual}}{0.9} \times 35,133.33 \quad (5)$$

where $P_{L,annual}$ is the annual lipid production (kg/year) and

$$E_G = P_{G,annual} \times 23400 \quad (6)$$

where $P_{G,annual}$ is the annual biogas production (m³/year).

RESULTS AND DISCUSSION

Biomass characterization

The phytoplanktonic community was dominated by Chlorophyceae during all the batch operations. The algae *Chlorella vulgaris* was the dominant specie, with an average of 9.4×10^5 individuals/mL, followed by the gender *Scenedesmus sp.* with 6.5×10^5 individuals/mL. Table 1 presents the physical and chemical characterization of the biomass used in the energetic tests.

Table 1. Characterization of the biomasses used as substrate for energetic tests.

Variable	Unit	EB (n=3)		RB (n=1)	
		Average	SD	Average	SD
pH		7.5	1	< 2	---
Humidity	%	98	1	99	---
TS	mg/L	21E10 ³	7E10 ³	7E10 ³	---
TVS	mg/L	12E10 ³	2E10 ³	4E10 ³	---
TKN	mg/L	3E10 ³	3E10 ³	1E10 ²	6 E10 ¹
Organic nitrogen	mg/L	3E10 ³	3E10 ³	---	---
TP	mg/L	6.5 E10 ²	100E10 ²	3E10 ²	1E10 ²
COD	mg/L	53E10 ³	27E10 ³	100E10 ³	25E10 ³

SD=standard deviation; --- = non-realized; n = number of samples.

The pH of EB presented a value close to neutrality; on the other hand, RB had an acid pH. The average value below 2, can be explained by the addition of hydrochloric acid for cell wall disruption during lipid extraction. COD concentration of RB was 2 times higher than EB. This may be related to the use of solvents, such as methanol and petroleum ether, in the extraction procedure, with the possibility of incorporation of the carbon of such reagents into the biomass. The low nitrogen (TKN) concentration in RB, indicated that together with lipids, proteins were also extracted. The high COD concentration and the low nitrogen concentration, leded RB to present a carbon/nitrogen ratio, C:N, of 26.1:1, and for EB this ratio was 16:1. For phosphorus, we highlighted the lower concentration in RB compared to EB, caused by the extraction of phosphorous elements, such as complex lipids and phospholipids, during lipid extraction.

Energetic Output

The energetic output of the biomass, in terms of lipids and biogas, is presented in Table 2.

Table 2. Energetic output.

	Lipids (%)	Lipid Productivity (mg/L.day)	Anaerobic biodegradability (%)	BPP (m ³ biogas/kg TVS)
EB	7.4	4.6	20.5	0.22
RB			16.7	2.55

The biomass presented a lipid content of 7.4%, reaching a lipid productivity of 4.6 mg/L.day. The cultivation in effluents under less appropriate conditions, and in competition with other microorganisms, may have been the cause of the low lipid accumulation. Another probable reason is the composition of the biomass, since it contains a mixture of algae and bacteria, and lipid content of bacteria is usually very low.

A low anaerobic biodegradability of the EB was presented, with an average value of 20.5%. For the biomass after lipid extraction, this value was even lower, 16.7%. Cell wall is considered as the main characteristic of the difficult digestibility of algal biomass (Zamalloa *et al.*, 2012). The difficult degradability was reflected in BPP, with an average value of biogas production of 0.22 m³biogas/kg TVS. Passos *et al.* (2013) using raw algal biomass produced in domestic sewage for anaerobic digestion achieved a biogas production of 0.172 m³/kg TVS. For RB, the BPP reached 2.55 m³/kg TVS, 10 times higher than the EB results. Lipids extraction by solvents addition probably increased the biological availability of the microalgae intracellular content, facilitating the digestion by the anaerobic microorganisms (Alzate *et al.*, 2014). Moreover, the best performance of digestion using the RB was due to the shortening of the hydrolysis step, i.e. the acidogenesis phase was largely completed in the lipid extraction step, leaving the little bacteria hydrolytic to do, since they have received almost or completely hydrolyzed substrate.

Energetic analysis

For the large-scale production of microalgal biofuel, the energy consumption of the cultivation must be minimized in order to maximize the net energy production. In order to sustain the production of energy in a system, the NER must be > 1, and as high as possible. Figure 1 shows NER data and the specific productivities of biomass for all the energetic routes.

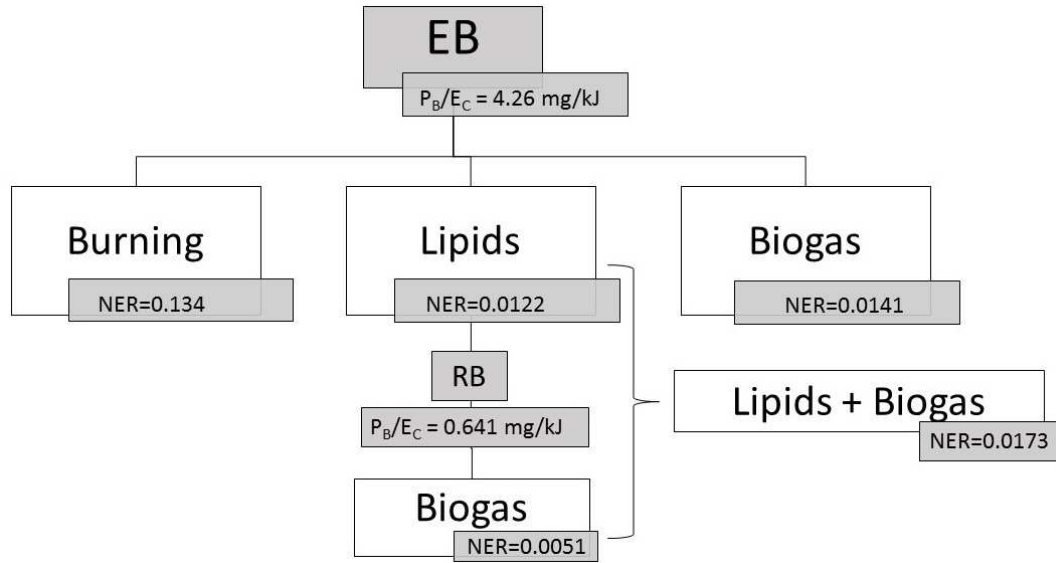


Figure 1. NER and specific biomass productivity for different energetic routes.

For all the studied energetic routes, NER values were below 1. The higher value was 0.134 for EB burning route. Lipids and biogas routes for EB presented similar NER values, varying from 0.0122 to 0.0141, for lipids and biogas, respectively. For RB, biogas route presented the lowest NER value; therefore, its contribution for the integrated route – lipids and biogas – was reduced. The integrated route presented a NER value slightly higher than the separate routes; however, it was not high enough to compensate the energetic input. System efficiency in terms of biomass productivity per energy input (P_B/E_C) was also assessed. Results showed that for EB, the biomass production have compensated the energy input, presenting a specific productivity (P_B/E_C) value of 4.26 mg/kJ. RB presented a very low P_B/E_C value, indicating that the energetic input for its production was too high. This fact is related with the required concentration and dewatering of the biomass for lipids extraction.

Comparing NER value from the integrated route with NER value of the EB biogas route is possible to observe the low energetic gain of the integrated route. In this study, this may be due to the following factors: (i) low NER of the RB biogas route, because of the low biomass productivity after dewatering for lipids extraction, and (ii) low lipid content of the EB. As in NER calculation was not considered the energy input for the biomass separation stage, neither its drying process for lipid extraction; we can state that lipid extraction is not an energetic feasible process for the studied biomass. Therefore, biogas production of the EB could be considered as the most favorable energy route. According to Sialve *et al.* (2009), lipid extraction of biomass containing less than 40% of lipids combined with anaerobic digestion of the residual biomass is not effective in terms of energy nor in terms of costs. For the authors, the anaerobic digestion of the whole biomass appeared to be the optimal strategy on an energy balance basis.

The scarcity of energy analyses on cultivation using effluent makes comparison difficult; however, these results show the necessity of intervention in the productive system in order to improve its energy performance. The increase of the productive unit with greater capacity of biomass production and lower energy use through low-energy equipment would be options to increase the NER and P_B/E_C values. Another possible cause of the low energy performance is the use of effluent for cultivation, which makes algal

production less efficient because of competition with other organisms for space and nutrients, leading to low lipid accumulation.

CONCLUSIONS

For all the studied energetic routes, the energy input was higher than the output. The integrated route (lipids + biogas) presented a NER value slightly higher than the separate routes; however, it was not high enough to compensate the energetic input. The low energetic gain of the integrated route compared with biogas route of the raw biomass, besides the low lipid content of the biomass and the energetic input associated with biomass dewatering, turned lipid extraction as an energetic unfeasible process for the studied HRAP biomass. Biogas production of the raw biomass could be considered as the most favorable energetic route.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by the National Council for Scientific and Technological Development, CNPq, and the Research Support Foundation of Minas Gerais, FAPEMIG.

REFERENCES

- Alzate, M.E., Muñoz, R., Rogalla, F., Fdz-Polanco, F. and Pérez-Elvira, S.I. (2014) Biochemical methane potential of microalgae biomass after lipid extraction. *Chemical Engineering Journal*, **243**, 405-410.
- APHA. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (2005). 20th edn, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA.
- Appels, L., Laumwers, J., Degréve, J., Helsen, L., Lievens, B. and Willems, K. (2011). Anaerobic digestion in global bio-energy production: potential and research challenges. *Renewable Sustainable Energy Reviews*, **15**(9), 4295-4301.
- Assemany, P.P., Calijuri, M.L., Couto, E.A., Santiago, A.F. and Reis, A.J.D. (2015). Biodiesel from wastewater: lipid production in high rate algal pond receiving disinfected effluent. *Wat. Sci. Tech.*, **71**(8), 1229-1234.
- Bourrelly, P. (1970). Les algues d'eau douce. Initiation à la systématique. III Les algues bleues et rouges. Les Eugléniens, Peridiniens et Cryptomonadines. Nouvelle Boubée & Cie, Paris [in French].
- Chen, W.T., Zhang, Y., Zhang, J., Yu, G., Shideman, L.C., Zhang, P. and Minarick, M. (2014). Hydrothermal liquefaction of mixed-culture biomass from wastewater treatment system into bio-crude oil. *Bioresource Technology*, **152**, 130-139.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, **26**(3), 126-131.
- Jawed, M. and Tare, V. (1999). Microbial composition assessment of anaerobic biomass through methanogenic activity tests. *Water SA*, **25**, 345-350.
- Jorquera, O., Kiperstok, A., Sales, E.A., Embiruçu, M. and Ghirardi, M.L. (2010). Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors. *Bioresource Technology*, **101**(4), 1406-1413.
- Nederlands Norm, NEN 6520. (1982). Water: Spectrophotometric Determination of Chlorophyll-a Content. Nederlands Normalisatie-instituut, Delft, the Netherlands.
- Parra, O.O., González, M. and Dellarosa, V. (1983). Manual Taxonômico del Fitoplancton de água continentales. V- Chlorophyceae. Concepcion, Chile. [in Spanish].
- Passos, F., Solé, M., García, J. and Ferrer, I. (2013). Biogas production from microalgae grown in wastewater: Effect of microwave pretreatment. *Applied Energy*, **108**, 168-175.
- Pegallapati, A. K., Arudchelvam, Y. and Nirmalakhandan, N. (2014). Energetic Performance of Photobioreactors for algal cultivation. Brief Review. *Environmental Science Technology Lett.*, **1**(1), 2-7.
- Poldy, F. (2008). Net energy and strategic decision-making. *Biofuels, Bioproducts and Biorrefining*, **2**, 389-92.
- Sialve, B., Bernet, N. and Bernard, O. (2009). Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable. *Biotechnology Advances*, **27**, 409 - 416.

- Viana, M.B., Freitas, A.V., Leitão, R.C. and Santaella, S.T. (2012). Biodegradability and methane production potential of glycerol generated by biodiesel industry. *Wat. Sci. Tech.*, **66**(10), 2217-2222.
- Zamalloa, C., Boon, N. and Verstraete, W. (2012). Anaerobic digestibility of *Scenedesmus obliquus* and *Phaeodactylum tricornutum* under mesophilic and thermophilic conditions. *Applied Energy*, **92**, 733-738.

Anexo 2

ASSEMANY, P.P., CALIJURI, M.L., TANGO, M.D., COUTO, E.A. Energy potential of algal biomass cultivated in a photobioreactor using effluent from a meat processing plant. *Algal Research*, 17, pp 53 – 60. 2016.



Energy potential of algal biomass cultivated in a photobioreactor using effluent from a meat processing plant



Paula Peixoto Assemany*, Maria Lúcia Calijuri, Mariana Daniel Tango, Eduardo Aguiar Couto

Universidade Federal de Viçosa, Department of Civil Engineering, Núcleo de Pesquisas Ambientais Avançadas – nPA, Viçosa, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 9 January 2016
Received in revised form 22 March 2016
Accepted 20 April 2016
Available online xxxxx

Keywords:
Microalgae
Bubble column photobioreactor
Lipids
Biogas
Biorefinery

ABSTRACT

The objective of this study was to assess the energy potential, in terms of lipids and biogas, of the algal biomass cultivated in a photobioreactor using effluent from a meat processing plant (primary effluent – after the flotation unit and secondary effluent – after the activated sludge unit) as culture medium. Among the tested routes, the objective was to define the best one for energy use of the biomass and, in order to incorporate the concept of biorefinery, the biogas production was assessed with and without the previous lipid extraction. After 6 days of operation, the biomass cultivated in both effluents presented similar lipid content (7.0 and 6.1%), accounting for mean lipid productivities of 10.0 mg/L·d for the primary effluent and 3.4 mg/L·d for the secondary effluent. The methane production potential (MPP) of the post-flotation biomass was 0.44 m³ biogas/kg of total volatile solids (TVS) and of the post-activated sludge 0.28 m³ biogas/kg TVS. For the biomass after lipid extraction, the MPP was 2.38 m³ biogas/kg TVS for cultivation in the post-flotation effluent and 2.26 m³ biogas/kg TVS in the post-activated sludge effluent. None of the energy routes presented a net energy ratio (NER) higher than one. The energy gain with production of biogas after the lipid extraction was small, although higher NER values were obtained for this pathway. The biogas production from raw biomass, regardless of the culture medium, was the most favorable energy route.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Microalgae are currently considered promising feedstock for the production of biofuels. Different types of renewable fuel can be obtained from microalgae biomass, such as methane produced through anaerobic digestion, biodiesel derived from oil extraction and photobiological hydrogen production. In addition to versatility, the algal substrate presents other advantages such as rapid and continuous growth of the biomass throughout the year, exceeding the yield of the most productive oil cultures [1].

However, despite the undeniable advantages, there are still challenges to the development of technologies for the production of bioenergy from microalgae. We have not yet reached a scenario of economic viability. Energy consumption and environmental impacts are the main weakness. Also, the still immature technologies for algal biomass dewatering, the high installation and operation costs of photobioreactors (PBRs) and the low productivity of high-rate ponds should be overcome.

Efforts have focused on the search for alternatives for a sustainable process, both environmentally and economically. Among these alternatives are the cultivation in effluent, in consortium with other microorganisms, and the maximum exploitation of the biorefinery concept.

Biodiesel is one of the most studied options of bioenergy production, due to the high lipid accumulation capacity of microalgae. Biogas production through anaerobic digestion is another interesting route that saves energy in the biomass dewatering process. However, when cultivating microalgae in wastewater, low lipid content is expected due to the stressful environment and to the production of a heterogeneous biomass, which contains not only algae but also bacteria with lower lipid content. Moreover, energy consumption of the biomass dewatering process required for lipid extraction accounts for significant costs. Regarding biogas production of algal biomass, the main challenge is the improvement of pre-treatment methods, which is essential to a better efficiency of algal biomass anaerobic digestion due to high resistance of the algal cell wall. Some studies reported that the viability and sustainability of the process would only be achieved if the biogas production was combined with a prior biodiesel recuperation [2,3]. However, the integration of the biodiesel production systems with the methane production from microalgae has scarcely been reported in the literature [3].

With respect to wastewater, most systems for microalgae cultivation are open ponds where biomass concentration is usually below 1 kg/m³, with mean values of 0.2 and 0.6 kg/m³ [4,5]. Although PBRs are usually

* Corresponding author at: Av. P.H. Rolfs, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Campus da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG 36570-900, Brazil.
E-mail addresses: paula_assemany@hotmail.com (P.P. Assemany), lucia.calijuri@gmail.com (M.L. Calijuri), tango.mariana@gmail.com (M.D. Tango), eduardoacouto@hotmail.com (E.A. Couto).

considered as having higher installation and operation costs than high-rate ponds, they are more stable and capable of producing greater photosynthetic efficiency, biomass density, CO₂ use efficiency and volumetric productivity [6]. For the viable large-scale production of biofuels, the energy used for the process, regardless of the system, must be minimized in order to maximize the energy yield.

There are still uncertainties about how to determine the energy balance in microalgae biofuel production [7]. The net energy analysis, which uses concepts of the lifecycle analysis, is one of the most widely accepted methods for assessing the energy potential of a system in general [8]. Another coefficient for assessing the efficiency of the cultivation system is biomass specific productivity, defined as the ratio between biomass productivity and the energy input, as proposed by Pegallapati et al. [9]. In addition, several other coefficients are extensively used in the literature to measure the energy efficiency of the production system and the use of the biomass produced (see [7,10]).

The aim of the study was to apply energy analysis in an integrated context of biorefinery, with the main objective of defining, among the tested routes, the best use of biomass, in addition to determining the energy efficiency of the production system. Therefore, we assessed the energy potential, in terms of lipids and biogas, of the biomass cultivated in a photobioreactor (PBR) using effluent from the meat processing industry as culture medium.

2. Material and methods

2.1. Cultivation

2.1.1. Experimental setup

The experimental plot consisted of a bubble column PBR. The experiment was carried out in the area outside the Laboratory of Environmental and Sanitation Engineering at the Federal University of Viçosa, Minas Gerais (20°45'14"S, 42°52'54"W), and altitude 686 m from the sea level. The predominant climate in the municipality is characterized with rainy and hot summers and cold and dry winters. It has an annual average precipitation of 1221 mm and an average annual temperature between 19 and 20 °C.

The PBR consisted of three independent acrylic tubes with an external diameter of 15 cm, internal diameter of 14.4 cm, 3 mm of wall thickness and a useful volume of 15 L each. The mixing of the cultivation medium was performed continuously through the bubbling of air (10 L/min) enriched with CO₂ (6.5% v/v). The air for mixture was given by a diaphragmatic air compressor (Schulz, 0.25 kW of power) and conducted for each tube by a pneumatic hose followed by a PVC tube connected to a disperser made from a cylindrical oxygenating porous stone (22 mm of length and 12 mm of diameter). Flowmeters of 0–15 L/min were installed. The CO₂ supply was automatically controlled by the variation of pH. Values of pH were kept between 6 and 8, through pH online measurements (HACH, sc200 controller) connected to a solenoid valve (Jefferson, 2016BV221). Measurements were made in one tube of the PBR, considering that the other two units have the same behavior as they were in the same operational conditions. The main components of the systems are presented in Fig. 1A, and the dimensions of the acrylic tubes are shown in Fig. 1B.

The PBR was characterized in terms of its hydrodynamic characteristics. For the same conditions used in batch operations (airflow = 10 L/min and liquid volume = 15 L) the following characteristics were observed: i) mixing time ($t_{m,95\%}$) of 180 ± 54 s, corresponding to the time necessary to reach $\pm 5\%$ of H⁺ concentration in the total mixing state; and ii) volumetric oxygen mass transfer coefficient ($k_L a$) of 0.00257 s⁻¹.

2.1.2. Operation

The PBR was operated with primary and secondary effluents from a meat processing industry located in Viçosa, Minas Gerais, Brazil. The primary effluent was collected at the exit of the flotation unit, and the secondary at the exit of the activated sludge unit, both at the wastewater treatment plant of the industry. Each culture medium was assessed during two outdoor batch operations of the PBR (during September 2014 for the primary effluent operation and October 2014 for the secondary effluent operation), until it reached the algal decay growth phase, monitored daily by the variable chlorophyll-*a*. For each operation was added an inoculum of 10% of the PBR volume. The inoculum was collected from high-rate ponds applied to domestic sewage treatment after the anaerobic reactor process.

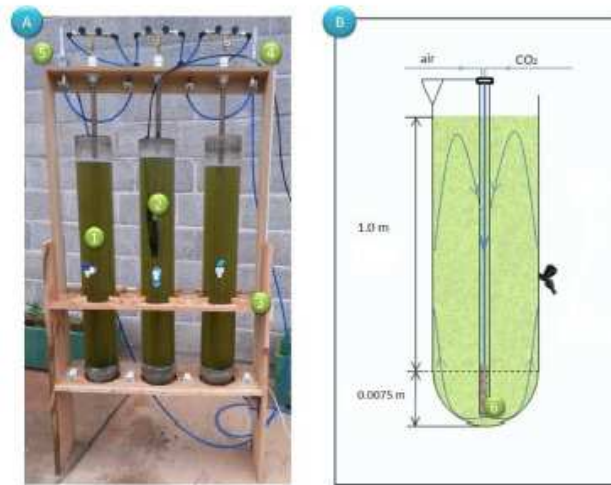


Fig. 1. (A) Bubble column PBR. The numbers indicate its parts: (1) acrylic tube; (2) pH sensor; (3) wooden supporting structure; (4 and 5) flowmeters; (6) disperser and dimensions of each tube.

2.1.3. Monitoring

The incident photosynthetic active radiation (PAR) and the dissolved oxygen (DO) were measured at the site three times a day: 06:30 am, 12 pm and 05:30 pm. PAR was measured with an LI-COR LI-193 Underwater Spherical Quantum Sensor and DO with a Hach HQ40d portable meter (Luminescent Dissolved Oxygen). Temperature and pH were monitored in real time with a Hach sc200 Controller.

During the PBR operation, samples of the culture medium of each tube were collected daily at 05:30 pm. The physical and chemical analyses were carried out according to the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater [11]: total chemical oxygen demand (COD_T) (5220-COD D), and soluble chemical oxygen demand (COD_S) (5220-COD f, samples filtered with 0.45 μm membrane), volatile suspended solids (VSS) (2540-VSS E), nitrate (N-NO₃⁻) (4500-NO3 E), ammoniacal nitrogen (N-NH₄⁺) (4500-NH3 C), total Kjeldahl nitrogen (TKN) (4500-Norg C) and total dissolved phosphorus (Ps) (4500-P D, samples filtered with 0.45 μm membrane). The dissolved organic carbon (DOC) was determined with a Shimadzu TOC 5000 analyzer. The chlorophyll-*a* levels were determined by spectrophotometry according to APHA [11], and the calculations were performed using equations described in the Nederlands Norm NEN 6520 [12].

Phytoplankton community analysis of the effluent of the PBR at the end of each operation was performed. For qualitative analysis, the samples were preserved with formaldehyde (4%). The identification and counting was performed with an inverted optical microscope (Olympus CK2), by Uthermöhls method [13]. The morphologic and morphometric characteristics of the vegetative and reproductive cycles of significant taxonomic value for the species were analyzed according to the specialized literature [14,15,16]. For the quantitative analysis, because of the high density of organisms, quantification was performed after a 1:50 dilution of the samples.

The feedstock for energy tests was the biomass mixed from the three tubes, as they were considered as one PBR. The biomass of each operation was concentrated by sedimentation for posterior energy analysis. A proportion of the biomass was subjected to the processes of lipid extraction and anaerobic digestion, whereas the remaining biomass was submitted to anaerobic digestion only. The biomass obtained after lipid extraction (AE) and submitted to anaerobic tests was named primary_AE when cultivated in post-flotation effluent and secondary_AE when cultivated in post-activated sludge effluent. Similarly, the biomass sent directly for anaerobic digestion was named primary_PBR and secondary_PBR.

2.2. Lipids

The lipid content was assessed at each operation by solvent extraction, as described by Assemany et al. [17]. After harvest, the biomass was concentrated in a high rate refrigerated centrifuge (15 °C, 10,000 rpm for 5 min) and oven dried at 50 °C for 12 h. Cells were disrupted with the addition of hydrochloric acid 3M at 45 °C. After disruption, petroleum ether and methanol were added to the dry biomass for lipid extraction, consisting in three extractions at environmental temperature. The extracted oil was washed with lead acetate 4% to remove impurities and pigments. The lipid content (% of lipids in the dry biomass) was determined gravimetrically after the evaporation of the solvent for 2 h at 105 °C.

2.3. Biogas

2.3.1. Specific methanogenic activity (SMA)

The specific methanogenic activity tests followed the procedures described by Jawed and Tare [18], with modifications described by Viana et al. [19]. The tests were carried out using 250 mL erlenmeyers (200 mL of useful volume), filled with anaerobic sludge from the Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) reactor located at the Viçosa Wastewater Treatment Plant, in Viçosa, Minas Gerais, substrate (glucose),

buffer solution and distilled water, with a food to microorganism (F/M) ratio of four to one (v/v). Micro- and macronutrients were added, according to [19], to prevent deficiency during the tests. The test was also performed on the control without the addition of substrate to measure the endogenous respiration of the microorganisms. After closure of the bottles, a gas consisting of 100% N₂ was injected for 4 min to purge the oxygen. Tests were performed at 35 ± 2 °C under continuous agitation (120 rpm) in an incubator (Tecna, TE-420). The volume of biogas was monitored daily in a Mariotte bottle filled with 5% NaOH solution for the specific measurement of methane. The SMA was calculated by the maximum slope of the cumulative methane production curve, using the statistical software R, version 3.0.2 [20], to fit the non-linear regression model and the logistic regression model. For each model the coefficient of determination was calculated to assess the fitting of the models.

2.3.2. Methane production potential (MPP)

The MPP tests were carried out under the same conditions as the SMA tests, with the modification of the substrate (algal biomass prior to and after lipid extraction, instead of glucose). The calculation of MPP was based on the cumulative production of methane after 30 days of incubation, and on the mass of substrate used in the tests. The MPP was obtained from Eq. (1):

$$MPP = \frac{V_{30} - V_{control\ 30}}{m_{biomass}} \quad (1)$$

where: V_{30} represents the volume of methane produced in the bottle containing residual biomass after 30 days (liters); $V_{control\ 30}$ is the volume of methane produced by the control bottle (no addition of substrate) after 30 days (liters); and $m_{biomass}$ is the initial mass (grams) of residual biomass in the bottle.

2.3.3. Anaerobic biodegradability

The anaerobic biodegradability tests of algal biomass were carried out under the same conditions as the SMA tests, with the modification of the substrate (algal biomass prior to and after lipid extraction, instead of glucose). Eq. (2) was used to calculate the biodegradability:

$$BIO = \frac{COD_{30} - COD_{30\ control}}{COD_{biomass}} \times 100 \quad (2)$$

where: BIO is the biodegradability of the sample (%); COD₃₀ is the total volume of methane produced in the bottle containing biomass after 30 days, in terms of COD (g) (at 35 °C, 0.395 L of methane correspond to 1 g of COD); COD_{30 control} is the total volume of methane produced in the control bottle without addition of substrate, in terms of COD (g) and COD_{biomass} is the initial mass of biomass (grams of COD), added to each reactor.

2.4. Energy analysis

The energy performance of the production system was evaluated in terms of specific productivity of biomass, PB/EC (mg/kJ), defined as the productivity of biomass (PB, mg/L-d) per input energy (EC, kJ/L-d) [9] and the net energy ratio (NER), which relates the total energy produced and that consumed by the system, according to Eq. (3):

$$NER = \frac{\sum \text{Energy produced}}{\sum \text{Energy consumed}} \quad (3)$$

The produced energy was measured in terms of the total energy content of the biomass or only with respect to its lipid and/or biogas production potential. Since the batch operation of the system was performed outdoors, only the energy consumption for the agitation of the culture medium was considered, i.e., the energy consumed by the

diaphragmatic compressor used for the injection of air in the mixture. Energy consumption for biomass processing, such as drying the biomass prior to lipid extraction, was not accounted in the energy analysis. The production system was the only step used for energy consumption calculation, as the other phases were performed in laboratory scale, and significantly differ from real scale conditions.

2.4.1. Quantification of the energy consumption

The energy consumption in each operation (C_{OP} , kWh/day) was determined with Eq. (4):

$$C_{OP} = \frac{24 \times Pot}{1000} \quad (4)$$

where Pot is the power in W. Considering the performance of three operations per month, the annual energy consumption (C_T , kJ/year) can be determined by Eq. (5):

$$C_T = C_{OP} \times \text{days of operation in the year} \times 3600. \quad (5)$$

2.4.2. Quantification of the energy produced from lipids and biogas production

The annual energy production from the anaerobic digestion of the biomass (E_C , kJ/year) and lipids (E_L , kJ/year) was determined from the annual lipid and biogas productions, considering that: (i) the energy content of 1 L of lipids is equivalent to 35,133.33 kJ [21]; (ii) the total lipid density is approximately 0.9 kg/L [21]; and (iii) 1 m³ of biogas equals 23,400 kJ (mean value of the interval reported by Chisti [22]), according to Eqs. (6) and (7):

$$E_L = \frac{P_{L, \text{annual}}}{0.9} \times 35,133.33 \quad (6)$$

where $P_{L, \text{annual}}$ is the annual lipid production (kg/year) and

$$E_C = P_{G, \text{annual}} \times 23,400 \quad (7)$$

where $P_{G, \text{annual}}$ is the annual biogas production (m³/year).

2.5. Data manipulation and experimental replication

Both cultivation operations and energy assays (lipid extraction and anaerobic digestion) were performed in duplicate for each effluent used as culture medium. Thus for each effluent, two batch operations were carried out and they were considered as replicates. Therefore, data were presented as mean and standard deviation, in order to provide a measure of variability based on experimental replication and statistical measurements. For energy analysis results, a t-test was performed at the 5% significance level, in order to statistically differentiate mean values of NEP obtained for the studied energetic pathways, namely i) lipids, ii) biogas prior to lipid extraction, iii) biogas after lipid extraction and iv) biogas + lipids.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of the environmental conditions and culture medium

The amount of time required for the complete growth of biomass varied between the types of effluent. Duration of batch operations was six days for both effluents. Fig. 2 presents the behavior of pH and temperature in the PBR and PAR during the operations.

The maximum values of PAR were always recorded on 12 pm. Generally, PAR presented higher values during the operation period of the primary effluent. Maximum values were 2362 (on the 3rd day of operation) and 2475 $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$ (on the 1st day of operation), for primary and secondary effluents respectively. Temperature in culture medium

reached high values in both operations, close to 40 °C. These may indicate the need for a cooling system, despite representing an energy input, in order to avoid such high values of temperature, which are not favorable for algal growth. According to Ras et al. [23], for growth temperatures exceeding the optimal temperature (between 10 and 30 °C but with optimal conditions between 20 and 25 °C [24]), microalgae growth rate sharply decreases due to the imbalance between energy demand and ATP production, and to a higher extent due to the inactivation or denaturation of the proteins involved. Staehr and Birkeland [25] revealed that towards elevated temperature acclimation, strains of *Microcystis aeruginosa* and *Scenedesmus acutus* presented higher photosynthesis rates and lower respiration rates as well as cell size reduction. The maximum and minimum values for the primary effluent were 40.7 and 16.8 °C, respectively, and 43 and 18.2 °C for the secondary. The pH behavior indicated the pH control by the addition of CO₂, with values during the entire operation of both effluents always between 6 and 8. In the beginning of the operation of the primary effluent, it was possible to notice a period of adaptation of the algae, with the first CO₂ addition after the second day of operation. Moreover, the cycles of CO₂ addition in the secondary effluent were more frequent, when compared to the primary effluent operation. This may be related to the easiest algal adaptation in the secondary effluent, that had less initial concentration of organic matter and consequently less competition with bacteria and other organisms and more amount of available nitrogen (ammonia nitrogen) to be assimilated.

Table 1 presents the characteristics of the two effluents used as culture medium.

For both effluents, the variable DO presented significant growth because of the photosynthetic activity of the algae and addition of compressed air for mixing. As expected, the primary influent presented higher concentrations of organic matter but on the other hand, a lower availability of nutrients preferably assimilable by algae. The N/P ratio of this effluent was 4.2, compared with 58.7 of the secondary effluent, considering ammonia nitrogen, nitrate and soluble phosphorus as nutrients. As regards the performance of these effluents, the PBR presented removal efficiencies of 43.8%, 100%, and 47.2% for CODs, N-NH₄ and Ps in the primary effluent, and 100% and 100% for N-NH₄ and Ps in the secondary effluent, reflecting the total polishing of this effluent in terms of nutrient removal. In both effluents, the N-NO₃ concentration increased at the end of operations, which represents the main form of transformation of the nitrogen influent to the PBR. Ammonia nitrification is a common process in environments with high DO levels, as those observed in the present study. For organic matter in the secondary effluent, an increment was observed instead of removal; this may be related to the recalcitrance of the organic matter remaining in this effluent, and also to the release of organic compounds by microalgae.

3.2. Characterization of the biomass

The biomass produced in each batch operation is characterized in Table 2.

The dominance of the genus *Scenedesmus* sp. was observed for both effluents. This genus presents great adaptability to different culture media, showing significantly high growth rates in domestic sewage compared with synthetic culture media. In addition, it shows tolerance of a wide range of temperatures and pH, representing a versatile genus for purification of wastewater [26].

The density of individuals and the concentration of chlorophyll-*a* varied little between the effluents, indicating that the growth and adaptation of microalgae were independent of the initial characteristics of the culture medium. Algal biomass productivity was greater for the primary effluent, 13.7 mg/m²·d, against 8.6 mg/m²·d for the secondary effluent. The total biomass productivity was 4.2 g/m²·d and 1.6 g/m²·d for the primary and secondary effluents, respectively. The total biomass concentration, represented by the variable VSS, was higher in the primary effluent, which indicates a greater presence of non-algal biomass

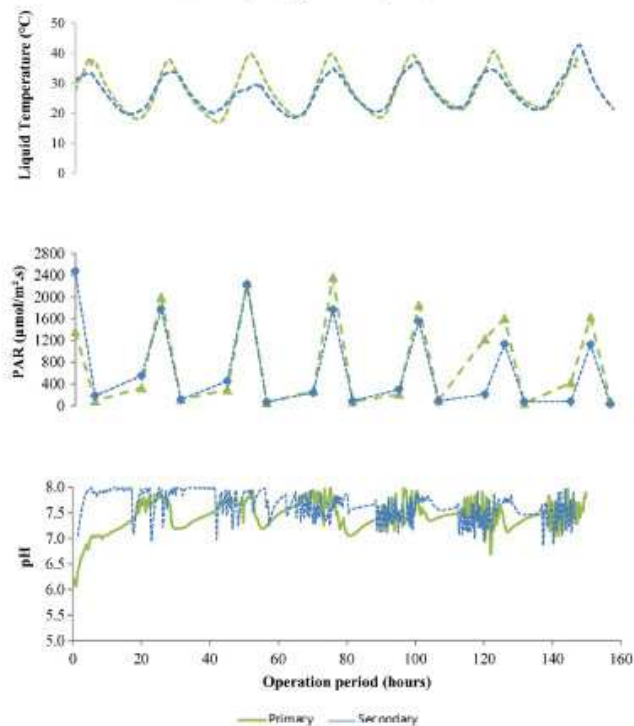


Fig. 2. Temperature and pH in the PBR and PAR (mean values of both operations for each effluent) during the operations of the primary and secondary effluents.

such as fungus, bacteria and protozoa, associated with its more organic nature, compared with the secondary effluent. The lower biomass productivity achieved with the secondary effluent is due in major part to a lack of dissolved phosphorus in this effluent, which is a fundamental nutrient for microorganisms' development. Neveux et al. [27] evaluated the growth of macroalga *Oedogonium* sp. in three municipal wastewater sources. The authors concluded that the primary treated effluent reached the best results regarding both growth rate and wastewater treatment efficiency, when compared to the secondary effluent, due to its higher concentration of nutrients. Fig. 3 presents the relation between chlorophyll-*a* and VSS for both effluents during operation.

Table 1
Characterization of the primary and secondary effluents (mean and standard deviation values of the influent and effluent in the PBR).

Variable	Unit	Primary		Secondary	
		Influent	Effluent	Influent	Effluent
pH		6.0 (0.6)	—	7.6 (0)	—
DO	mg/L	2.5 (0.4)	11.2 (0.4)	3.9 (1.1)	7.1 (0.6)
CO ₂ D	mg/L	308.4 (478)	173.3 (23.7)	56.0 (10.0)	65.0 (29.7)
CO ₂ L	mg/L	349.0 (2.7)	239.5 (115.3)	99.4 (0.1)	70.9 (22.7)
DOC	mg/L	147.9 (31.3)	63.0 (4.8)	23.1 (7.1)	25.2 (11.6)
TKN	mg/L	72.7 (13.7)	52.0 (28.0)	45.4 (33.3)	38.0 (15.9)
N-NH ₄ ⁺	mg/L	13.4 (13.7)	0 (0.0)	40.4 (31.3)	0 (0.0)
N-NO ₃ ⁻	mg/L	1.8 (0.9)	1.9 (0.1)	0.7 (0.7)	1.4 (1.3)
Ps	mg/L	3.6 (2.8)	1.9 (2.6)	0.7 (0.1)	0

According to Veloso et al. [28], the value of the [(Chl-*a*)/VSS] ratio was found to be a simple and characteristic indicator of culture state. From Fig. 3 can be observed the proportion of algal biomass presented in the total biomass during operations. The secondary effluent presented a richer algal biomass, as demonstrated by Chl-*a*/VSS ratios higher or equal to 1% in two moments during cultivation, the third and fourth days of operation. For the primary effluent, the maximum proportion of algae biomass in the total biomass was 0.77%. Values <1% mean impending algal population crash [28], showing greater contribution in the culture of the heterotrophic organisms, rather than the autotrophic ones. Below this value is due to algal heterotrophic contribution and non-algal biomass (e.g. bacteria, protozoa). At the end of the cultivation, when harvesting was done, relations were respectively 0.24 and 0.52% for primary and secondary effluents.

3.3. Lipids

As there was little difference in the algal concentration of the effluents, the lipid content presented little variation. However, the lipid productivity of the primary effluent was higher, more than twice that of the secondary effluent. Table 3 presents the lipid characterization data.

Compared with several other species, *Scenedesmus* sp. is considered to have great capacity for lipid accumulation and high lipid productivity [29]. The biomass cultivated in the primary and secondary effluents presented similar lipid contents of 7.0% and 6.1%, respectively. The cultivation in effluents under less appropriate conditions, and in competition with other microorganisms, may have been the cause of the low lipid

Table 2

Characterization of the biomass cultivated in the primary and secondary effluents (mean and standard deviation values).

Variable	Unit	Primary	Secondary
Chlorophyll- <i>a</i>	mg/L	2.8 (1.9)	1.75 (0.5)
VSS	mg/L	8575 (399.5)	3355 (7.8)
Density of organisms	Individuals/mL	2.1E06 ^a	2.3E06 ^a
Dominant genera/species	–	<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Scenedesmus staurastrum</i> (free cell colonies)

^a Values for one operation of each effluent. Due to the high density of bacteria and fungi, counting was made difficult in some operations.

accumulation. According to Mehrabadi et al. [30], the main reason for the low lipid content of biomass grown in high rate algal ponds with wastewater is the composition of the biomass, since biomass contains a mixture of algae and bacteria. As the lipid content of bacteria is typically below 10% [31], this reduces the overall lipid content and hence the energy content of the biomass. Studies with the cultivation of the genus *Scenedesmus* sp. in effluents and PBR observed lipid contents of 14.2 to 49.1% [32] and 11.2 to 14.7% [33]. The greater lipid productivity of 10.0 mg/L·d, verified in the primary effluent, is attributed to its greater biomass productivity compared with the secondary effluent, which achieved 3.4 mg/L·d. This result may be related to the characteristics of the primary effluent (Ps availability and high concentration of organic compounds) which directly affect the composition and quantity of biomass, not only algal but bacterial as well.

Results such as these reaffirm the importance of the total biomass productivity for the analysis of lipid production. The lipid productivity compensated the low lipid content presented by the biomass, with values similar to or even higher than those reported in the literature for algal biomass cultivation in PBR using wastewater as culture medium [34,35].

3.4. Biogas production

The mean SMA of the UASB sludge used as inoculum for the anaerobic tests was 0.10 gCOD/gTVS·d (mean value of 5 tests, with standard deviation of 0.03). This value is coherent with sludge from the domestic sewage treatment as inoculum for the anaerobic digestion, indicating good conditions for the production of biogas.

Fig. 4 shows the behavior of the methane generated by the studied types of biomass throughout the incubation time.

The biogas production of both effluents can be described by a second-degree polynomial model. A 10-day adaptation period was observed, after which a significant increase in biogas production for both types of effluent was observed. For the efficient digestion of the algal biomass, this period is of great relevance given the difficult biodegradability of the biomass because of the composition (carbohydrates such as hemicellulose and cellulose) of the cell wall. On the other hand, this

period can increase the hydraulic retention time of the anaerobic reactor, representing costs of installation and operation in a larger scale.

Higher production was obtained after lipid extraction for both effluents. The primary biomass AE produced 905.0 mL of methane and the secondary biomass AE produced 852.1 mL. There was also no record of stabilization in methane production until the 30th day of incubation for the primary biomass AE, whereas for secondary biomass AE this tendency was observed. The raw biomass from the secondary effluent reached an accumulated volume of methane of 699.5 mL, and a total volume of methane of 682.5 was reached for the raw biomass from the primary effluent.

Table 4 presents the anaerobic biodegradability data and methane production potential for the biomass from both effluents, prior to and after the lipid extraction.

Anaerobic degradability of biomasses from both effluents were similar, except for the raw biomass from secondary effluent. Higher values of anaerobic biodegradability for the biomass after the activated sludge can be related to its low complexity, with carbohydrate and protein contents partially oxidized by the aerobic treatment system, compared with the biomass after flotation. On the other hand, once the more complex biomass is degraded, its energy potential increases.

This is the first study to present biogas production of algal biomass cultivated in wastewater from a meat processing industry, which makes comparison difficult. However, for other types of effluents, the results are coherent with what has been described in the literature. Caporgno et al. [36] cultivated *Chlorella vulgaris* and *Chlorella kessleri* in raw domestic sewage and used as a production system six bubble column PBRs with a volume of 3×10^{-3} m³ each. After the total consumption of nitrogen, they reported productions of 346 ± 3 mL CH₄/g VS and 415 ± 2 mL CH₄/g VS, for *C. kessleri* and *C. vulgaris* respectively. Ras et al. [37] studied the biomass of *C. vulgaris* cultivated in PBR with synthetic medium and obtained 0.24 m³/kg VS of methane.

The high values of MPP for the biomass after lipid extraction, regardless of the culture medium, reinforce the use of lipid extraction as pre-treatment of the algal biomass, differently from the toxic effect of the solvents reported by Ehimen et al. [38] and Yun et al. [39]. The MPP values presented in this study were higher than those reported by other researchers [36,37] who used residual biomass after lipid

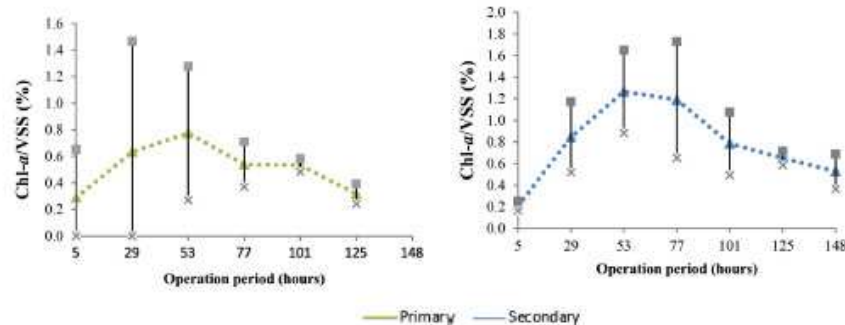


Fig. 3. Relation (%) between chlorophyll-*a* and VSS for both effluents during operations (mean and standard deviation values of both operations for each effluent).

Table 3

Total lipids and lipid productivity for both culture media (mean and standard deviation values).

	Unit	Primary	Secondary
Lipids	%	7.0 (0.2)	6.1 (0.8)
Lipid productivity ^a	g/m ³ -d	0.3	0.1
	mg/L-d	10.0	3.4

^a Lipid productivity was calculated considering total biomass (VS).

extraction, but cultivated it in synthetic axenic medium for anaerobic digestion.

3.5. Energy viability

For the large-scale production of microalgal biofuel, the energy consumption of the cultivation must be minimized in order to maximize the net energy production. In order to sustain the production of energy in a system, the NER must be >1, and as high as possible. In this study, the main objective was to compare different culture media and energy routes for the production of algal biomass in PBRs. Table 5 shows NER data and the specific productivities of biomass for all three energy use routes.

Table 5 shows that in this study, any NER was higher than one. The values were similar, regardless of the type of effluent. The lipid NER ranged between 0.000815 and 0.00029 for the biomass from the primary and secondary effluent, respectively. Jorquera et al. [21] presented lipid NER values of 0.07 for a tubular PBR.

For the biogas production, the net ratio presented a minimum value of 0.000335 for the biomass after extraction, cultivated in effluent after the activated sludge (PBR_AE secondary) and a maximum value of 0.00802 for the raw biomass cultivated in primary effluent. The lipid + biogas NER values were equal to lipid NER values for both effluents ($p < 0.05$), indicating that the energy gain with production of biogas after the lipid extraction was small, although higher NER values were obtained. Moreover, the accumulated energy gain of the lipid extraction was slight, and thus it is possible to state that the non-viability, in terms of energy, of the biomass produced in this study for lipid utilization was mostly owed to its low lipid content. The biogas generation of the raw biomass, regardless of the culture medium, was the most favorable energy route ($p < 0.05$). According to Sialve et al. [2], lipid extraction of biomass containing <40% of lipids combined with anaerobic digestion of the residual biomass is not effective in terms of energy nor in terms of costs. For the authors, the anaerobic digestion of the whole biomass also appeared to be the right strategy on an energy balance basis.

Table 4

Anaerobic biodegradability and MPP of the biomass from both effluents, prior to and after the lipid extraction (mean and standard deviation values).

	Primary		Secondary	
	PBR	AE	PBR	AE
Anaerobic biodegradability (%)	25.1 (9.4)	2.27 (15.7)	43.1 (29.1)	21.6 (8.9)
MPP (m ³ CH ₄ /kg TVS)	0.44 (0.2)	2.38 (1.7)	0.28 (0.11)	2.26 (0.9)

Stum and Lamer [40] found that the direct combustion of algal biomass was a more viable energy source than biofuel production, especially when the lipid content of dry biomass was 10%, i.e., lower than the high values reported in lab-scale reactors. Bruhn et al. [41] assessed the energy potential of the green macroalgae *Ulva lactuca* and concluded that anaerobic digestion of the wet biomass seemed more promising than its combustion due to high contents of moisture, ash and alkali in the biomass.

Additionally, the performance of the systems regarding the biomass productivity per energy input (PB/EC) was also assessed. The highest value obtained was 0.298 mg/KJ for the raw biomass from the primary effluent and the lowest was 0.0478 mg/KJ for the biomass after lipid extraction cultivated in the secondary effluent. With respect to bubble column PBRs, according to Fuentes-Günewald et al. [42], the best results for PB/EC were obtained with optimum levels of light and agitation. Low indices of specific productivity in bubble column PBRs such as those obtained in this study are related solely and exclusively to productivity optimization, and the energy use for such production is ignored [9].

The PBR production system in this study presented low energy performance both for lipid and biogas production, regardless of the culture medium evaluated. Table 5 shows the necessity of intervention in the productive system in order to improve its energy performance. Bubbling air into the culture consumes a lot of energy. This may be considered the main cause of the low values found for NER, which were very distant from the optimum value, close to one. The lower energy use through low-energy equipment (diaphragmatic air compressor) would be an option to increase the NER and PB/EC values of the system. Another possible cause of the low energy performance is the use of effluent for cultivation, which makes algal production less efficient because of competition with other organisms for space and nutrients, leading to low lipid accumulation.

4. Conclusions

The primary effluent, after flotation, presented greater productivities of biomass, lipids and methane, compared with the secondary effluent

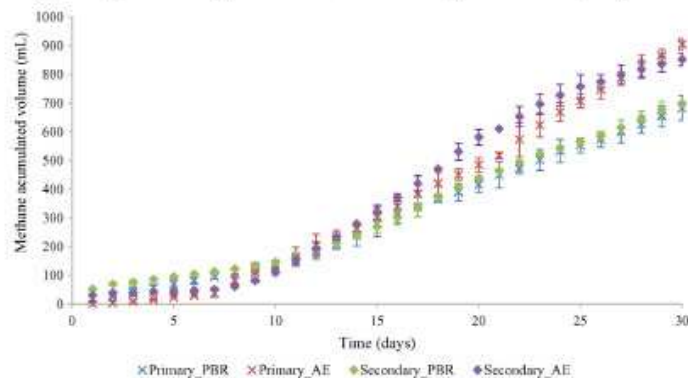


Fig. 4. Methane generation throughout the incubation time for biomasses prior and after lipid extraction of both effluents (mean and standard deviation values).

Table 5

NER and specific biomass productivity for the studied energy routes (mean and standard deviation on values of both operations for each effluent).

	Primary		Secondary	
	PBR	AE	PBR	AE
NER lipids	8.15E-04 a ² (4E-04)		2.90E-04 c ² (3E-05)	
NER biogas	8.02E-03 b ² (3E-03)	1.23E-03 a ² (3E-4)	1.64E-03 d ² (6E-04)	3.25E-04 c ² (1E-04)
NER lipids + biogas		2.04E-03 a ² (7E-05)		6.26E-04 c ² (1.65E-04)
PB/EC (mg/kJ)	2.98E-01 (1E-01)	2.34E-01 (0)	1.22E-01 (6E-03)	4.78E-02 (0)

^a The t-test was performed at the 5% significance level; means followed by the same letter do not statistically differ.

after activated sludge treatment. Thus, it was considered more suitable for microalgae development mainly due to phosphorus limitation observed in the secondary effluent. The high levels of methane production potential for the biomass after lipid extraction, compared with raw biomass, reinforce the use of lipid extraction as pre-treatment of algal biomass to increase the efficiency of anaerobic digestion.

There was a gain in energy with the biogas production after lipid extraction; however, none of the energy routes presented NER higher than one. The energy analysis showed that there was little accumulated energy gain in the lipid extraction stage, and thus it is possible to confirm the non-viability, in terms of energy, of the biomass produced in this study for lipid use. The biogas generation from the raw biomass, regardless of the culture medium, was the most favorable energy route.

Acknowledgments

This work was financially supported by the National Council for Scientific and Technological Development, CNPq (grant number 479944/2013-0), the State of Minas Gerais Research Support Foundation, and FAPEMIG (grant number APQ-01286-13).

References

- P. Schenk, S. Thomas-Hall, E. Stephens, U. Marx, J. Mussogug, C. Posten, O. Kruse, B. Hankamer, Second generation biofuels: high efficiency microalgae for biodiesel production, *Bioenerg. Res.* 1 (2008) 20–43.
- B. Stålvé, N. Bernet, O. Bernard, Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biofuels sustainable, *Biochem. Adv.* 27 (2009) 409–416.
- R. Harun, M. Davidson, M. Doyle, R. Gopiraj, M. Danquah, C. Forde, Techno-economic analysis of an integrated microalgae photobioreactor, biodiesel and biogas production facility, *Biomass Bioenergy* 35 (2011) 741–747.
- N.J. Cronar, H.J. Falkowfield, Effect of nutrient loading and retention time on performance of high rate algal ponds, *J. Appl. Phycol.* 9 (1997) 301–309.
- M.R. Tredici, Mass production of microalgae: photobioreactors, in: A. Richmond (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Blackwell Science, Iowa 2007, pp. 178–214.
- E. Ugoala, G. Ndakwe, K.B. Mustafa, R.I. Ayo, Constraints to large scale algae biomass production and utilization, *J. Algal Biomass Util.* 3 (2012) 14–32.
- L.F. Razon, R.R. Yan, Net energy analysis of the production of biodiesel and biogas from the microalgae: *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis*, *Appl. Energy* 88 (2011) 3507–3514.
- E. Polid, Net energy and strategic decision-making, *Biofuels Bioprod. Biorefin.* 2 (2008) 389–392.
- A.K. Pegalapati, V. Arudchelvam, N. Nirmalakhandan, Energetic performance of photobioreactors for algal cultivation, brief review, *Environ. Sci. Technol. Lett.* 1 (2014) 2–7.
- B. Ketheesan, N. Nirmalakhandan, Feasibility of microalgal cultivation in a pilot-scale airlift-driven raceway reactor, *Bioresour. Technol.* 108 (2012) 196–202.
- American Public Health Association (APHA), *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*, American Water Works Association, Water Environmental Federation, Washington, 2005 1–1200.
- Nederlands Norm, NEN 6520, Water: Spectrophotometric Determination of Chlorophyll *a* Content, Nederlands Normalisatie Instituut, Delft, 1981 1–8 (in Dutch).
- H. Utherrn, Zur vervollkommnung der quantitativen phytoplankton-methode mit, *Verhandlungen Des Internationalen Verein Limnologie*, 9 1958, pp. 1–38 (in Dutch).
- P. Bourrelly, Les algues d'eau douce, Initiation à la systématique, III Les algues bleues et rouges, Les Eugléniens, Peridiniens et Cryptomonadines, Nouvelle Boubée & Cie, Paris 1970, pp. 1–512 (in French).
- O.O. Parra, M. González, V. Delarosa, Manual taxonomic del fitoplancton de agua continentales, V. Chlorophyceae, Editorial Universidad de Concepción, Concepción, 1983 1–268 (in Spanish).
- C.F.M. Bicudo, M. Memores, Cámaras de algas de águas continentais do Brasil (chave para identificação e descrição), *BiMa, São Carlos*, 2006 1–498 (in Portuguese).
- P.P. Assenany, M.L. Calijuri, A.F. Santiago, E.A. do Couto, M.O. Leite, J.B. Sierra, Effect of solar radiation on the lipid characterization of biomass cultivated in high rate algal ponds using domestic sewage, *Environ. Technol.* 35 (2014) 2296–2305.

- M. Jawed, V. Tare, Microbial composition assessment of anaerobic biomass through methanogenic activity tests, *Water SA* 25 (1999) 345–350.
- M.B. Viana, A.V. Freitas, R.C. Leitão, S.T. Sant'anna, Biodegradability and methane production potential of glycerol generated by biodiesel industry, *Water Sci. Technol.* 66 (2012) 2217–2222.
- R. A Language and Environment for Statistical Computing, Development Core Team R Foundation of Statistical Computing, Vienna, 2013.
- O. Jorquera, A. Kiperstok, E.A. Sales, M. Embiruçu, M.L. Chirardi, Comparative energy life-cycle analyses of microalgal biomass production in open ponds and photobioreactors, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 1406–1413.
- Y. Chisti, Biodiesel from microalgae beats biodiesel, *Trends Biotechnol.* 26 (2007) 126–131.
- M. Ras, J.P. Steyer, O. Bernard, Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 12 (2013) 153–164.
- W.K.W. Li, Temperature adaptation in phytoplankton: cellular and photosynthetic characteristics, in: P.G. Falkowski (Ed.), *Primary Productivity in the Sea*, Plenum Press, New York 1980, pp. 259–279.
- P. Staehr, M.J. Birkeland, Temperature acclimation of growth, photosynthesis and respiration in two mesophilic phytoplankton species, *Phycologia* 45 (2006) 648–656.
- E. Kessler, *Scenedesmus*: problems of a highly variable genus of green algae, *Bot. Acta* 104 (1991) 169–171.
- N. Neveux, M. Magnusson, L. Mata, A. Whelan, R. de Nys, N.A. Paul, The treatment of municipal wastewater by the macroalga *Oedogonium* sp. and its potential for the production of bio-crude, *Algal Res.* 13 (2016) 284–292.
- V. Velloso, A. Reis, I. Gouveia, H.L. Fernandes, J.A. Empis, J.M. Novais, Lipid production by *Phaeodactylum tricornutum*, *Bioresour. Technol.* 38 (1991) 113–119.
- M.J. Griffiths, S.T.L. Harrison, Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production, *J. Appl. Phycol.* 21 (2009) 493–507.
- A. Mehrabadi, R. Craggs, M.M. Farid, Wastewater treatment high rate algal ponds (WWF-HRAP) for low-cost biofuel production, *Bioresour. Technol.* 184 (2015) 202–214.
- M.R. Brown, S.M. Barret, J.K. Vollman, S.P. Nearhos, J.A. Neil, G.L. Allan, Biochemical composition of new yeast and bacteria evaluated as food for bivalve aquaculture, *Aquaculture* 143 (1996) 341–360.
- G. Hodaifi, S. Sánchez, M.E. Martínez, R. Ortez, Biomass production of *Scenedesmus obliquus* from mixtures of urban and olive oil mill wastewaters used as culture medium, *Appl. Energy* 104 (2013) 345–352.
- Q.-H. Shen, J.-W. Jiang, L.-P. Chen, L.-H. Cheng, X.-H. Xu, H.-L. Chen, Effect of carbon source on biomass growth and nutrients removal of *Scenedesmus obliquus* for wastewater advanced treatment and lipid production, *Bioresour. Technol.* 190 (2015) 257–263.
- M.K. Kim, J.W. Park, C.S. Park, S.J. Kim, K.H. Jeum, M.J. Chang, J. Acreman, Enhanced production of *Scenedesmus* spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater, *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 2220–2228.
- L. Wang, M. Min, Y. Li, P. Chen, Y. Chen, Y. Liu, Y. Wang, R. Ruan, Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162 (2010) 1174–1186.
- M.P. Caporagno, A. Taleh, M. Okiewicz, J. Provoost, J. Izgrud, C. Berghs, Microalgae cultivation in urban wastewater: nutrient removal and biomass production for biodiesel and methane, *Algal Res.* 10 (2015) 232–239.
- M. Ras, L. Lardon, S. Bruno, N. Bernet, J.P. Steyer, Experimental study on a coupled process of production and anaerobic digestion of *Chlorella vulgaris*, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 200–206.
- E.A. Ehimen, S. Connaughton, Z. Sun, C.G. Carrington, Energy recovery from lipid extracted transesterified and glycerol co-digested microalgae biomass, *COB Bioenergy* 1 (2009) 371–381.
- Y.M. Yun, S.K. Cho, K.W. Jung, M.S. Kim, H.S. Shin, D.H. Kim, Inhibitory effect of chloroform on fermentative hydrogen and methane production from lipid-extracted microalgae, *Int. J. Hydrog. Energy* 39 (2014) 19256–19261.
- B.S.M. Sturm, S.L. Lamer, An energy evaluation of coupling nutrient removal from wastewater with algal biomass production, *Appl. Energy* 88 (2011) 3499–3506.
- A. Buhm, J. Dahl, H.B. Nielsen, L. Nikolaisen, M.B. Rasmussen, S. Marklager, B. Olesen, C. Arias, P.D. Jensen, Biomass potential of *Ulva lactuca*: biomass yield, methane production and combustion, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 2595–2604.
- C. Fuentes-Grünevald, E. García, E. Alacid, S. Rossi, J. Camp, Biomass and lipid production of dinoflagellates and raphidophytes in indoor and outdoor photobioreactors, *Mar. Biotechnol.* 15 (2013) 37–47.