



BIOGERAÇÃO DE HIDROCARBONETOS POR MICROALGAS EM EFLUENTES

Nicolli Reck - nicolli.reck@gmail.com

Universidade Federal de Santa Maria, Depto. De Engenharia Sanitária e Ambiental.
Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria, Rio Grande do Sul.

Pricila Nass Pinheiro - pricila.nass@gmail.com

Universidade Federal de Santa Maria, Depto. de Tecnologia e Ciência dos Alimentos,

Karem Vieira - merakvieira@gmail.com

Universidade Federal de Santa Maria, Depto. de Tecnologia e Ciência dos Alimentos.

Eduardo Jacob Lopes - jacoblopes@pq.cnpq.br.

Universidade Federal de Santa Maria, Depto. de Tecnologia e Ciência dos Alimentos.

Leila Queiroz Zepka - lqz@pq.cnpq.br

Universidade Federal de Santa Maria, Depto. de Tecnologia e Ciência dos Alimentos.

Resumo: A necessidade de atender a demanda por energia e reduzir os impactos ambientais causados pelos resíduos são os principais desafios da atualidade. Diante deste cenário, as microalgas são uma biotecnologia aplicável para tratar efluentes industriais por um processo limpo e ainda gerar subprodutos como hidrocarbonetos para a produção de bioenergia. Com isso o trabalho teve como objetivo estudar o perfil dos compostos orgânicos voláteis hidrocarbonetos durante o cultivo heterotrófico microalgal. Os experimentos foram conduzidos em um biorreator de coluna de bolhas com relação/diâmetro (L/D) igual a 1,28, com volume de trabalho de 2L oriundas do abate e processamento de aves e suínos. As condições experimentais utilizadas foram: razão carbono/nitrogênio de 30, concentração inicial de inoculo de 100 mg/L, pH 7,6, temperatura de 25°C, constante de IVVM (volume de ar por volume de meio por minuto) e ausência de luminosidade. Os compostos orgânicos voláteis foram isolados por microextração em fase sólida no headspace, analisados por cromatografia gasosa acoplada a um detector de massas (SPME-GC-MS). A amostragem foi realizada a cada 24 horas no período de 144 horas correspondendo as fases de crescimento. Os resultados demonstram que nas 24 horas, 72 horas e 144 horas os compostos orgânicos voláteis hidrocarbonetos foram formados.

Palavras-chave: Hidrocarbonetos, Microalga, Efluente.



BIOGENERATION HYDROCARBONS WITH MICROALGAE IN WASTEWATER

Abstract: *The need to meet the demand for energy and reduce the environmental impacts of waste are the main challenges of today. In this scenario, the microalgae is a biotechnology applicable to treat for a clean process industrial effluent and still generate by-products and hydrocarbons for the production of bioenergy. With this work was to study the profile of volatile hydrocarbon compounds during the microalgal heterotrophic cultivation. The experiments were conducted in hum bioreactor bubbles column with relations/diameter (L/D) equal to 1,28 , the volume of work arising 2L slaughter and poultry and pork processing. Were used as experimental conditions: Reason carbon / nitrogen 30, the initial inoculum concentration of 100 mg/L, pH 7,6, temperature 25°C , constant 1 VVM (volume air per volume medium per minute) and absence of light. The volatiles were isolated by headspace solid-phase micro-extraction in different residence times, separated by gas chromatography, and identified by mass spectrometry (SPME-GC/MS). Sampling was done every 24 hours in 144 hours corresponding growth stages. The results demonstrate that the 24 hours, 72 hours and 144 hours the volatile organic hydrocarbon compounds are formed.*

Keywords: *Hydrocarbons, Microalgae, Wastewater.*

1. INTRODUÇÃO

A crescente demanda por produtos alimentícios tem elevado drasticamente a atividade industrial, gerando cada vez mais resíduos e elevando a utilização dos recursos naturais. Com esse cenário busca-se aliar desenvolvimento econômico com proteção ambiental, desenvolvendo novas alternativas de processos eficientes na remediação da poluição, tornando assim, a atividade industrial menos impactante ao meio ambiente.

Tem se observado uma tendência emergente no sentido do conhecimento de produção de compostos de baixo peso molecular a partir de fontes renováveis (WINTERS *et al.*, 1969; SCHIRMER *et al.*, 2010; CHOI; LEE, 2013).

As microalgas também podem ser utilizadas como indicadores ambientais e para o tratamento de águas residuais (ABDEL-RAOUF, *et al.*, 2012; JACOB-LOPES *et al.*, 2008), suas características metabólicas fazem desse microrganismos presente potencial no emprego de tecnologias no tratamento de efluente baseado na bioconversão de material orgânico e nutrientes em compostos orgânicos voláteis, podendo ser cultivadas em sistemas heterotróficos sendo que as fontes de carbono são provenientes de resíduos agroindustriais reduzindo os custos de sua produção.

Estes resíduos agroindustriais possuem uma alta concentração de matéria orgânica e é um ambiente adequado que favorece microalgas cultivo heterotróficos, onde o nitrogênio (N) e fósforo (P) são normalmente encontrados em uma razão favorável carbono/nitrogênio (C/N) e nitrogênio/ fósforo (N/P) que suportam o crescimento de microalgas (MARONEZE *et al.*, 2014).

Phormidium autumnale é apontada como uma espécie em potencial no emprego de tecnologias de tratamento de efluentes a partir de sistemas que empregam microalgas devido a sua tolerância a determinadas condições como temperaturas extremas e concentrações elevadas de nutrientes. Em geral, deve-se considerar a eficiência de remoção de nutrientes e o potencial de geração de produtos na escolha do microrganismo a ser empregado no tratamento de efluentes (SU *et al.*, 2012).

Os processos biológicos tornaram-se uma alternativa interessante no combate à poluição e na geração de novos produtos, uma vez que esses processos utilizam-se do metabolismo microbiano para degradar e remover poluentes (GADD, 2008), gerando assim novos produtos.



O subproduto deste processo de tratamento é um alto rendimento de biomassa de algas rico em proteínas que poderiam ser ainda utilizado para fertilizantes agrícolas, biocombustíveis e produção biogás (SU *et al.*, 2012; LOGAN E RONALD, 2011; RAWAT *et al.*, 2011.).

Compostos orgânicos voláteis (COV's) são metabolitos secundários obtidos a partir de microalgas e cianobactérias que poderia ser utilizado como uma importante fonte alternativa de produtos farmacêuticos, aromas e fragrâncias a um baixo custo (SANTOS, 2015; HAVEL & WEUSTER-BOTZ, 2006), com isso as microalgas são consideradas algumas das matérias-primas mais promissoras para o provimento sustentável de alimentos e de indústrias não alimentares (SANTOS 2015; DRAAISMA *et al.*, 2013; BOROWITZKA, 2013).

Vários compostos orgânicos podem ser metabolizados por microalgas. O metabolismo que controla estas reações é através da via oxidativa das pentoses fosfato. A respiração no escuro serve como a fonte exclusiva de energia para a manutenção e a biossíntese, além de proporcionar o carbono que é necessário como blocos de construção para a biossíntese (SANTOS *et al.*, 2015).

A biossíntese destes compostos depende da disponibilidade de carbono, nitrogênio, e enxofre, bem como a energia fornecida pelo metabolismo primário. Por tanto, a disponibilidade destes “blocos de construção” tem um grande impacto na concentração de um metabólito secundário, incluindo compostos voláteis, demonstrando elevado grau de conectividade entre o metabolismo primário e secundário. Com base na sua origem biossintética, são classificados em COV's diversas classes, incluindo terpenóides derivados, ácidos gordos, e 2-ceto produtos via do ácido (SANTOS, 2015; DUDAREVA *et al.*, 2013).

Em contraste com organismos superiores, formas microbianas podem ser cultivadas em reatores que permitem a produção industrial de hidrocarbonetos. Nos últimos anos, a síntese microbiana de hidrocarbonetos voláteis, alifáticos, extracelular e não metano tem atraído um interesse considerável em vista ao desenvolvimento de métodos eficazes e ambientalmente seguros para a produção de biocombustíveis (LADYGINA, 2006; BAGAEVA, 1995; FUKUDA, 1987).

O Departamento de Energia dos Estados Unidos (2002) define como processos bioquímicos a conversão de material orgânico em combustíveis com o uso de organismos vivos ou seus produtos (CANTRELL, 2008).

O objetivo deste estudo foi investigar os CVO'S hidrocarbonetos produzidos por *Phormidium autumnale* a partir de cultivo heterotrófico em água residuária com a microalga.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo, meio de cultura, manutenção e propagação do inoculo.

A cianobactéria utilizada foi a *Phormidium autumnale*, isolada do Deserto Cuatro Siengas no México (26°59' N 102°03 W). As culturas reservas foram mantidas e propagadas em agar-agar solidificado (20g.L-1) com meio sintético BG11 (Rippka *et al.*, 1979) que possui a composição: K₂HPO₄ (0.03g.L-1), MgSO₄ (0.075g.L-1), CaCl₂.2H₂O (0.036g.L-1), citrato de amônio e ferro (0.0006g.L-1), Na₂EDTA (0.001g.L-1), Na Cl (0.00072g.L-1), NaNO₃ (0.015g.L-1), ácido cítrico (0.0006g.L-1), Na₂CO₃ (1.5g.L-1), metais traços [H₃BO₃ (0.0028g.L-1), MnCl₂.4H₂O (0.0018g.L-1), ZnSO₄.7 H₂O (0.00022g.L-1), Na₂MoO₄.2H₂O (0.00039g.L-1), CoSO₄.6H₂O (0.00004g.L-1)]. As condições de manutenção usadas foram 25°C e intensidade luminosa constante de 1klux.

2.2 Cultivo Heterotrófico Microalgal

Os experimentos foram realizados em um reator de coluna de bolhas. O sistema foi construído de vidro de borossilicato com diâmetro externo de 12,5 centímetros e altura de 16 centímetros, com razão altura/diâmetro proporção igual a 1,28 e um volume nominal de 2,0L. O sistema de dispersão do reator consistiu em um difusor de ar com 2,5 centímetros de diâmetro localizado no interior do biorreator. O fluxo de ar controlado pelo medidor de fluxo (KI-Key Instruments®, Treveose, PA, EUA) e a entrada de ar e a saída de gases serão filtrados com unidades



filtrantes constituídas de membrana de polipropileno, com um diâmetro de poro de 0.22 μ m e o diâmetro total de 50mm (Millex FG®, Billerica, MA, EUA).

O biorreator, incluindo unidades filtrantes foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 20 minutos. Os experimentos foram realizados em biorreatores em regime de batelada, alimentado com 2,0L de água residuária proveniente do abate e processamento de aves e suínos. As condições experimentais foram as seguintes: concentração inicial do inoculo de 100mg/L, a temperatura de 25°C, o pH ajustado para 7.6, aeração de 0.1VVM (volume de ar por volume de cultura por minuto) em ausência de luz com um tempo de residência de 144 horas.

2.3 Determinação de Compostos Orgânicos Voláteis

Os compostos voláteis formados no bioprocessamento foram isolados pela técnica de microextração em fase sólida aplicada em headspace (HS-SPME). A amostragem realizada no tempo zero e a cada 24h durante o crescimento celular. A fibra de SPME de revestimento misto empregada foi a DVB/Car/PDMS (divinilbenzeno/Carboxen/polidimetilsiloxano; 50/30 μ m \times 20 mm, Supelco Bellefonte, PA, USA), pré-condicionada conforme as recomendações fornecidas pelo fabricante. A temperatura de extração de 40°C, com um tempo de equilíbrio de 5 minutos, após exposição da fibra por 45 minutos. A análise dos compostos voláteis foi realizada em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC/MS Shimadzu QP-2010 Plus). As separações cromatográficas em coluna Chrompack WAX 52-CB (60 m \times 0,25 mm d.i. \times 0,25 μ m de diâmetro de fase estacionária). O gás de arraste utilizado foi o hélio com vazão constante de 1,6 mL min⁻¹. A temperatura inicial da coluna de 35°C, permanecendo por 5 minutos, após elevada até 220°C com gradiente de temperatura de 5°C/min, mantendo-se isotermicamente por 5 minutos. A interface GC/MS e da fonte de ionização foram mantidos a 250°C. O detector de massas foi operado no modo de ionização por elétrons, com feixe de elétrons a +70 eV. O analisador de massas do tipo quadrupolos foi utilizado no modo de varredura na faixa de 35 a 350 m/z. Os compostos foram identificados primeiramente por comparação dos seus espectros de massa com os do banco de dados espectral da própria biblioteca do GC-MS (NIST MS Search 2.0). A identificação foi confirmada por comparação dos Índices de Retenção Linear calculados.

2. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os compostos orgânicos voláteis identificados no experimento pertencem as mais diversas classes de compostos, tais como álcool, ésteres, cetonas, terpenos, ácidos carboxílicos e compostos sulfurados, porém o composto majoritário gerado foi os hidrocarbonetos. A tabela 1 mostra os compostos hidrocarbonetos voláteis identificados no biorreator heterotrófico em estudo, com seus índices de retenção e sua concentração.

Tabela 1: Compostos Hidrocarbonetos Voláteis detectados por GC/MS, índices de retenção linear (LRI) e concentração.

Picos	LRI DB-wax	Compostos	Concentração (μ g/mg _{biomassa})
12	924	Benzeno	1,43
14	1164	2-Metil nonano	0,66
17	1211	6-Etil-2-metil-octano	0,65
18	1793	2,4-Dimetil-heptano	0,82
19	1279	4,6-Dimetil-Dodecano	4,62
22	1311	2-Fenil-propeno	1,6
26	1458	2,3,3-Trimetil-octano	0,42
28	1524	3-Hexil-ciclo-penteno	0,95
54	1930	3-Propil-ciclo-penteno	3,88
58	1934	Pentadecano	0,68

Majoritariamente a classe de composto que apresenta maior concentração foram os hidrocarbonetos sendo os principais 4,6-Dimetil-Dodecano (4,62 $\mu\text{g/L}$), 3-Propil-ciclo-penteno (3,88 $\mu\text{g/L}$), 2-fenilpropeno (1,6 $\mu\text{g/L}$).

Ao contrário das bactérias que necessitam de alterações genéticas para sintetizar alcanos, as cianobactérias possuem na sua via de biossíntese essa obtenção, sem precisar ser engenhasdas, Schirmer et al (2010) identificou em cianobactérias alcanos como heptadecano, pentadecano e metil-heptadecano no estudo em questão identificou-se também o Pentadecano (0,68 $\mu\text{g/L}$) e outros alcanos como 2-Metil nonano (0,66 $\mu\text{g/L}$), 2,4-Dimetil-heptano (0,82 $\mu\text{g/L}$), 2,3,3-Trimetil-octano (0,42 $\mu\text{g/L}$).

A figura 1 mostra o cromatograma do tempo de 24 horas onde foi visualizado o maior número de identificações de diferentes compostos hidrocarbonetos, como o Benzeno (pico 12), 6-Etil-2-metil-octano (pico 17), 2,4-Dimetil-heptano (pico 18) 4,6-Dimetil-Dodecano (pico19). Nesse tempo também podemos observar a formação dos alcenos de cadeia cíclica 3-Hexil-ciclopenteno (pico 28), 2-fenil-propeno (pico 22) sendo esse um dos compostos majoritários do experimento com uma concentração final de 1,6 $\mu\text{g/L}$.

A figura 2 demonstra que há formação de diferentes compostos hidrocarbonetos no o tempo de 72 horas como 2-Metil nonano (pico 14) e o 2,3,3-Trimetil-octano (pico 26).

Na figura 3 podemos observar que o 2-Metil nonano (pico 14) se mostra constante durante o tempo de residência, já hidrocarboneto 2,4-Dimetil-heptano (pico 18) apresentou um acréscimo durante o experimento atingindo a concentração final 0,82 $\mu\text{g/L}$.

O composto majoritário 4,6-Dimetil-Dodecano (pico 19) esse demonstrou frequência observada em todos os tempos de cultivo sendo que no tempo de 144 horas obteve maior concentração celular 4,62 $\mu\text{g/L}$.

Figura 1. Cromatograma dos compostos orgânicos voláteis. A letra corresponde a A = 24 horas.

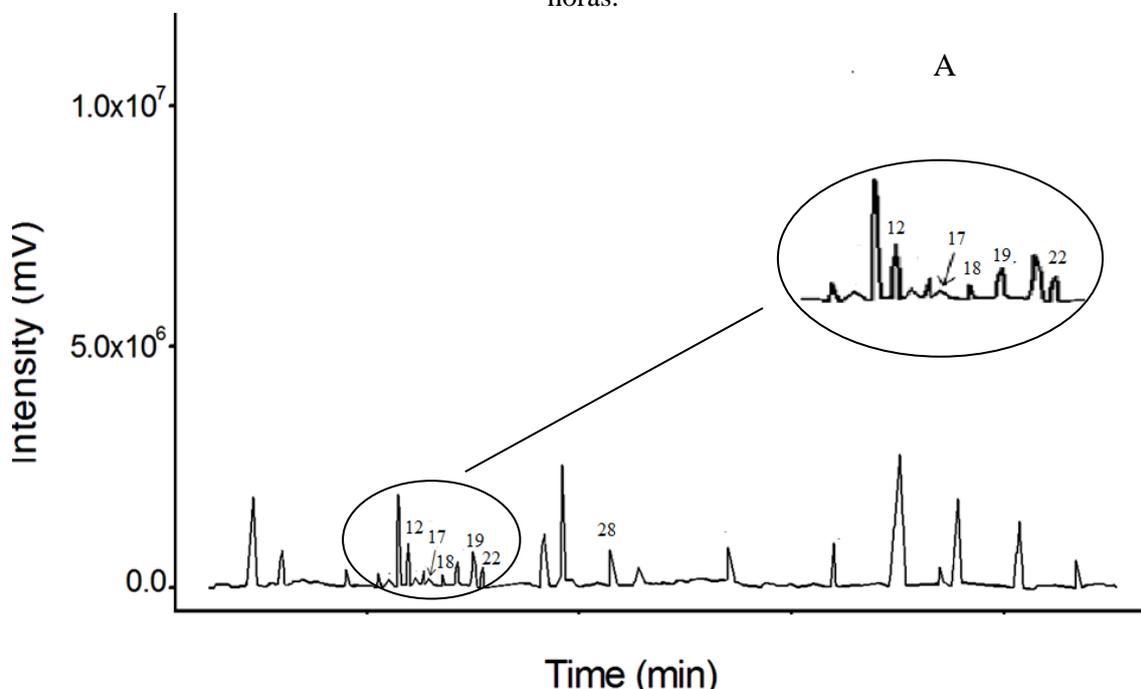


Figura 2. Cromatograma dos compostos orgânicos voláteis. A letra corresponde à B = 72 horas.

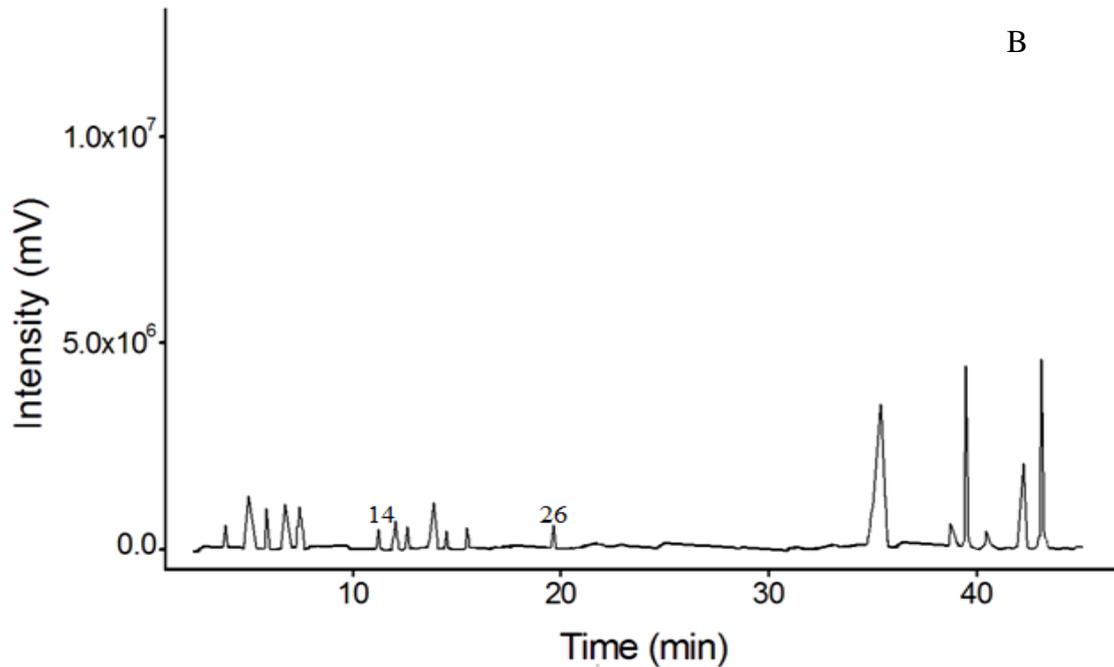
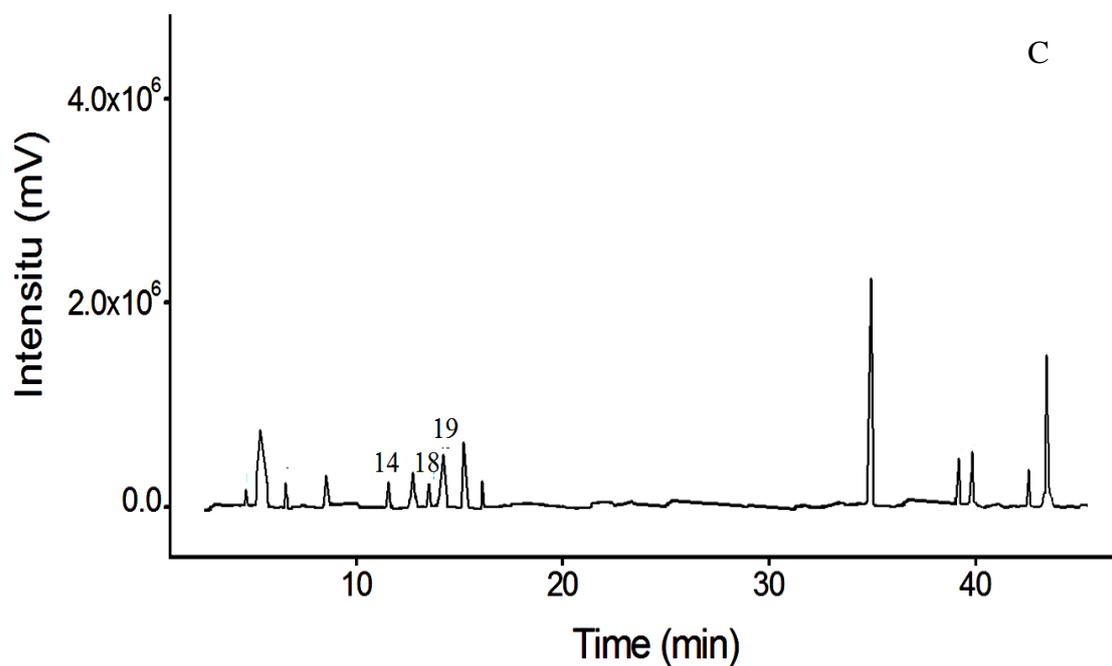


Figura 3. Cromatograma dos compostos orgânicos voláteis. A letra corresponde à C = 144 horas.



No experimento do total de composto hidrocarbonetos voláteis gerados 60% dos identificados foram alcanos alifáticos como 2,4-Dimetil-heptano ($0,82 \mu\text{g/L}$), 2-Metil nonano ($0,66 \mu\text{g/L}$), 2, 3,3-Trimetil-octano ($0,42 \mu\text{g/L}$) e alcenos representando 40% sendo de cadeia cíclica 2-fenil-propeno ($1,6 \mu\text{g/L}$), 3-hexil-ciclopenteno ($0,95 \mu\text{g/L}$), 3-Propil-ciclo-penteno ($3,88 \mu\text{g/L}$), Benzeno ($1,43 \mu\text{g/L}$).



Hidrocarbonetos, como alcanos e alcenos, são de particular interesse devido seu alto potencial para ser usado para a produção de bioenergia, por terem 30% de energia a mais que o etanol (CHOI; LEE, 2013).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A microalga apresentou a capacidade de produzir compostos orgânicos voláteis como hidrocarbonetos, quando cultivada heterotroficamente em efluente agroindustrial, demonstrando que parte das fontes orgânicas de carbono são bioconvertidas em COV's.

Os principais hidrocarbonetos formados foram os compostos orgânicos voláteis 4,6-Dimetil-Dodecano (4,62 µg/L), 3-Propil-ciclo-penteno (3,88 µg/L).

Finalmente, a exploração tecnológica destas biomoléculas voláteis deve ser considerada como possível fonte de bioenergia.

4. REFERÊNCIAS

ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMAIDAN, A.A.; IBRAHEEM, I.B.M., Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Science*, 19, 257-275, 2012.

BAGAEVA, T.V.; Sulfate-reducing bacteria, hydrocarbon producers. Tese de doutorado Biologia. Kazan State University; 1998 Russia.

BOROWITZKA, M.; High-value products from microalgae - their development and commercialisation. *J. Appl Phycol* 25:743-756, 2013.

CANTRELL, K.B., DUCEY, T., RO, K.S., HUNT, P.G., 2008. Livestock waste-to-bioenergy generation opportunities. *Bioresour. Technol.* 99, 7941-7953.

CHOI, J. Y.; LEE, S. Y. Microbial production as short-chain alkane. *Nature*, 2013.

DRAAISMA, R.B.; WIJFFELS, R.H.; SLEGGERS, P.M.; BRENTNER, L.B.; ROY, A.; BARBOSA, M.J.; Food commodities from microalgae. *Curr Opin Biotech* 24:169-177, 2013.

DUDAREVA, N.; KLEMPIEN, A.; MUHLEMANN, J.K.; KAPLAN, I. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytology*, 198, 16-32, 2013.

FUKUDA, H., OGAWA, T., FUJII, T., Method for producing hydrocarbon mixtures. US Patent 4,698,304 (1987).

GADD, G.M. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 84, p. 13- 28, 2009.

HAVEL, J.; WEUSTER-BOTZ, D.; Comparative study of cyanobacteria as biocatalysts for the asymmetric synthesis of chiral building blocks. *Eng Life Sci*, 6:175-179, 2006.

JACOB-LOPES, E.; SILVA, L.M.C.F.L.; FRANCO, T.T. Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica* Nagéli in a bubble column photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 40, 27-34, 2008.

LADYGINA, N.; DEDYUKHINA, E. G.; VAINSHTEIN, M.B.; A review on microbial synthesis of hydrocarbons. *Process Biochemistry* 41: 1001-1014, 2006.



LOGAN, C., RONALD, S. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. **Biotechnol. Adv.** 29, 686–702, 2011.

MARONEZE, M. M. ; MENEZES, C. R. ; BARIN, J. S. ; QUEIROZ, M. I. ; ZEPKA, L. Q. ; JACOB-LOPES, E. . Treatment of cattle-slaughterhouse wastewater and the reuse of sludge for biodiesel production by microalgal heterotrophic bioreactors. **Scientia Agricola** (USP. Impresso), v. 71, p. 521-524, 2014.

RAWAT, I., KUMAR, R.R., MUTANDA, T., BUX, F. Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. **Appl. Energy** 88, 3411–3424, 2011.

SANTOS, A.B.; FERNANDES, A.S.; WAGNER, R.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L.Q. Biogenesis of volatile organic compounds produced by *Phormidium autumnale* in heterotrophic bioreactor. **Journal of Applied Phycology**, 60, 32-42, 2015.

SCHIRMER, A.; RUDE, M. A.; LI, X.; POPOVA, E.; CARDAYRE, S. B. Microbial Biosynthesis of Alkanes. **Science**, v. 329, p. 559-562, 2010.

SU, Y.; MENNERICH, A.; URBAN, B. Comparison of nutrient removal capacity and biomass settleability of four high-potential microalgal species. **Bioresour. Technol.** 124, 157-162, 2012.

USDOE, 2002. Roadmap for Biomass Technologies in the United States. US Department of Energy, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy.

WINTERS, K.; PARKER, P. L.; BAALLEN, C. V. Hydrocarbons of Blue-Green Algae: Geochemical Significance. **Science**, v. 163, p. 467-468, 1969.