

P 184

## AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO EM RAÇÕES DA BIOMASSA ALGAL CRESCIDA EM EFLUENTE DE UMA INDÚSTRIA CERVEJEIRA

Raposo, M. F. J.<sup>1</sup>; Oliveira, S.<sup>1</sup>; Castro, P. M. L.<sup>1</sup>; Bandarra, N. M.<sup>2</sup>,  
Monteiro, M.<sup>2</sup>; Afonso, C.<sup>2</sup> e Morais, R. M.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Escola Superior de Biotecnologia - Universidade Católica Portuguesa,

Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto

<sup>2</sup>INIAP-IPIMAR, Av. Brasília, 1400 Lisboa

\*E-mail: rmarais@esb.ucp.pt

### RESUMO

Neste trabalho foi estudado o crescimento de microalgas em efluente de uma indústria cervejeira, quer em efluente puro quer diluído. Avaliaram-se a remoção e a incorporação do azoto, tanto amoniacal como de nitrato, e do fósforo pelas microalgas, bem como o desaparecimento dos maus odores. Na biomassa de *Chlorella vulgaris* cultivada usando o efluente, observou-se um aumento muito significativo na quantidade de aminoácidos essenciais e totais, e de alguns ácidos gordos, nomeadamente 14:0isobr, 16:1 e 17:1, e ainda 18:4 $\omega$ 3 e ácido eicosapentaenóico. As concentrações dos metais pesquisados na biomassa obtida situaram-se abaixo dos valores máximos estabelecidos para alimento animal.

### 1. INTRODUÇÃO

O tratamento dos efluentes e águas residuais provenientes das Indústrias Agro-Alimentares reveste-se de uma importância relevante, tanto na Europa como em Portugal, quer a nível industrial ou económico, quer do ponto de vista ambiental. Um dos métodos biológicos para tratamento de efluentes que se poderá apresentar

mais rentável, consiste na utilização de microalgas, já que estes microrganismos são capazes de remover e incorporar o carbono, o azoto e o fósforo (Hammouda *et al.*, 1995), ou mesmo metais pesados como o chumbo (Aksu e Kustal, 1991), o cádmio, o níquel e o mercúrio (Chen *et al.*, 1998), dissolvidos nas águas residuais, e também metais como o ferro e o manganésio, que podem conferir às águas um cheiro e um sabor pouco agradáveis. Além disso, após o tratamento, a biomassa algal poderá ser valorizada, na alimentação humana (Jassby, 1988) ou animal, como fonte proteica, ou pela utilização de alguns dos seus constituintes como pigmentos, enzimas (Becker, 1994). Poderão ainda ser utilizadas como fertilizante pois, além de melhorar a qualidade dos solos, a aplicação de algas permite melhorar a qualidade dos produtos (cereais) cultivados (Mesquita, 1997).

Neste trabalho, para além de se avaliar a utilização de um efluente de uma indústria cervejeira no crescimento de microalgas, pretendeu-se mostrar que a biomassa obtida pode ser utilizada na alimentação animal, após análises ao conteúdo proteico e de ácidos gordos e à concentração de alguns metais pesados, eventualmente incorporados pelas microalgas.

## 2. MATERIAL E METODOLOGIAS

Material biológico: as microalgas utilizadas neste estudo foram a *Chlorella vulgaris* e um consórcio algal obtido a partir da flora autóctone do efluente da cervejeira.

Isolamento e cultura das microalgas: a *Chlorella vulgaris* cresceu em meio OHM (otimizado para clorófitas); o consórcio de microalgas foi isolado do efluente, após filtração com filtros de vidro GF/C Whatman e crescimento em meios OHM e BG (meio de cultura para cianobactérias), com e sem nitratos. Duas espécies foram identificadas, a *Chlorella vulgaris* e a *Coenochloris*.

Avaliação do crescimento da biomassa: foram efectuadas contagens directas ao microscópio óptico, em câmara de Neubauer (*C. vulgaris*), e foi feita a determinação das clorofilas (flora autóctone), por extracção com acetona a 80% e determinação pelo método de Jeffrey e Humphrey (1975).

Análise das características do efluente: as análises de CBO<sub>5</sub> (Carência

Bioquímica de Oxigénio) e de CQO (Carência Química de Oxigénio) foram efectuadas segundo o método descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (1998). A quantificação da amónia foi efectuada de acordo com o Método Fenato (Weatherburn, 1967). Os nitratos foram quantificados utilizando o Kit Nitrate Test Spectroquant, da Merck. A determinação dos fosfatos foi realizada segundo o Método Colorimétrico do Ácido Vanadomolibdofosfórico descrito no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (1998).

Análise à biomassa: Foram realizadas análises à biomassa algal crescida quer em meio de cultura usual (controlo) quer em efluente. O teor em aminoácidos foi determinado segundo o procedimento descrito no AOAC (1998). A determinação do perfil em ácidos gordos foi efectuado conforme o protocolo de Lepage e Roy (1986), modificado por Cohen *et al.* (1988). O doseamento do chumbo, do cádmio e do níquel foi baseado na metodologia proposta pelo AOAC (1990), com ligeiras modificações. O teor de mercúrio foi determinado pelo método espectrofotométrico de absorção atómica em fase de frio, baseado na Norma Portuguesa NP 2928 (1988).

Tabela 1 - Características do efluente de uma indústria cervejeira: gama de valores para os parâmetros indicados.

Características do efluente	Gama de valores
CBO <sub>5</sub>	560-4778 mg O <sub>2</sub> /L
CQO	565-7837 mg O <sub>2</sub> /L
Amónia	0,17-5,90 mM
Nitrato	0,030-0,18 mM
Fosfato	0,60-3,43 mM

O efluente foi utilizado em bruto e diluído a 1:2 e 1:1, com água destilada, e os teores em azoto e fósforo corrigidos para 9,5 mM (em nitrato) e 0,124 mM, respectivamente, para os trabalhos realizados com a flora autóctone. Estes valores são equivalentes ao meio BG, que serviu de controlo.

Todas as experiências foram realizadas em triplicado, excepto quando as culturas cresceram em mangas de plástico. Nesta altura, apenas se efectuaram duplicados.

Todas as análises foram determinadas em triplicado.

O tratamento estatístico dos resultados foi realizado pelo programa STATISTICA 4.50, com análise ANOVA, quer paramétrica quer não paramétrica (de Kruskal-Wallis), para grupos múltiplos, e com o teste *t-student* e Mann-Whitney (não paramétrico) para grupos de dois.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As microalgas utilizadas neste estudo, tanto a *C. vulgaris* como a flora autóctone da água residual, apresentaram um crescimento mais acentuado no efluente utilizado do que no controlo (Figura 1). Estes resultados são apoiados por trabalhos anteriores (Picot *et al.*, 1991), em que também se verificaram taxas de remoção de N e P elevadas, e um crescimento mais acentuado das microalgas no efluente. Também se constatou que, em geral, a taxa de remoção de N foi mais eficiente do que a de P (Tabela 2), tal como foi anteriormente observado por Li *et al.* (1991) em microalgas isoladas de lagoas.

Tabela 2. Capacidade efectiva de tratamento de efluente de uma indústria cervejeira pela microalga *Chlorella vulgaris* e pelo consórcio de microalgas obtido a partir da flora autóctone do mesmo efluente.

Parâmetros avaliados	Valores iniciais	Porcentagem de remoção	Consórcio de microalgas	
			Valores iniciais	Porcentagem de remoção
	<i>Chlorella vulgaris</i>			
CBO,	2730-560	—	2354-1340	18,3-27,1
CQO	3900-800	—	3846-2172	12,6-14,6
Azoto (mM)	Controlo 0,4-0,6	30,9-59,5	Controlo 3,6-8,3	39,2-62,8
	Efluente 5,3-10,3	84,7-98,0	Efluente 7,9-10,5	31,3-98,0
Fosfato (mM)	Controlo 0,1-0,4	66,4	Controlo 0,1-0,2	37,8-85,2
	Efluente 0,6-3,4	11,8-53,9	Efluente 0,1-1,0	10,1-93,0

Na biomassa cultivada no efluente, verificou-se um aumento significativo do conteúdo dos aminoácidos ácido aspártico, ácido glutâmico e tirosina, resultados suportados pelo trabalho de Hammouda *et al.* (1995). Além disso, da análise de proteína à biomassa de *C. vulgaris*, verificou-se que a concentração em aminoácidos é sempre superior nas algas que cresceram no efluente, sendo a diferença estatisticamente significativa tanto ao nível dos aminoácidos essenciais

como dos aminoácidos totais. Os valores mais elevados foram registados na biomassa obtida do efluente a 1:1 (Figura 1). Contudo, a relação aminoácidos essenciais/aminoácidos totais mantém-se sensivelmente semelhante (dados não apresentados).

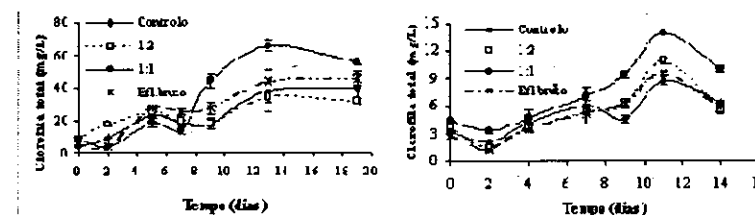


Figura 1. Curvas de crescimento das culturas de *Chlorella vulgaris* (à esquerda) e da flora autóctone (à direita), em efluente bruto (Efl.bruto) e diluído, e no controlo.

Em relação ao perfil de ácidos gordos (em percentagem sobre o total de ácidos), as maiores diferenças foram registadas na fracção polinsaturada, apresentando a biomassa controlo níveis superiores de 18:2 $\omega$ 6 e de 18:3 $\omega$ 3 e percentagens inferiores de monoinsaturados, em especial, 16:1 e 17:1. Embora, o teor em ácidos gordos apresente uma diminuição geral com o aumento da percentagem de efluente, também se regista um aumento do nível de ácidos gordos de cadeia ramificada, e um aumento muito significativo de 14:0isobr, 18:4 $\omega$ 3, e de ácido eicosapentaenoico.

Dos metais pesados doseados nas amostras de biomassa (mercúrio, chumbo, cádmio, e níquel), verificou-se que os níveis de mercúrio se situam entre 0,04 e 0,21ppm na biomassa controlo e em efluente bruto, dentro dos limites máximos estabelecidos pela Comunidade Europeia, em alimentos para animais (Directiva 1999/29/EC). Inferiores a esses limites são também os teores em cádmio (0,1ppm para o efluente a 100%) e em chumbo (1-2ppm). Os valores para o níquel situaram-se entre 0,34 e 11,0ppm, para a biomassa controlo e em 100% de efluente, o que parece mostrar que o efluente apresenta níveis elevados deste metal. O níquel é o único dos metais doseados cujos valores máximos admissíveis ainda não se encontram legislados; apresenta, contudo, uma toxicidade menor que

os outros metais pesados.

## 5. REFERÊNCIAS

- AKSU, Z. e KUSTAL, T., 1991. A Bioseparation Process for removing lead ions from wastewater by using *Chlorella vulgaris*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 52: 109-118.
- AOAC, 1990. *Official Methods of Analysis*, 15th ed. Vol. 1. Association of Official Analytical Chemistry, AOAC International, Arlington.
- AOAC, 1998. *Official Methods of Analysis*, 16th ed., 4th revision, Vol. I e II. Association of Official Analytical Chemistry, AOAC International, Gaithersburg MD.
- BECKER, E. W., 1994. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- CHEN, B.; HUANG, Q.; LIN, X.; SHI, Q. e WU, S., 1998. Accumulation of Ag, Cd, Co, Cu, Hg, Ni and Pb in *Pavlova viridis* Tseng (Haptophyceae). *Journal of Applied Phycology*, 10: 371-376.
- COHEN, Z.; VONSHAK, A. e RICHMOND, A., 1988. Effect of environmental conditions on fatty acid composition of the red alga *Porphyridium cruentum*: correlation to growth rate. *J. of Phycol.*, 24: 328-332.
- DROSTE, R. L., 1997. *Theory and Practice of Water and Wastewater Treatment*. John Wiley and Sons, Inc; NY (Eds).
- HAMMOUDA, O.; GABER, A.; e ABDEL-RAOUF, N., 1995. Microalgae and Wastewater Treatment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 31: 205-210.
- JASSBY, A. 1988. Some public health aspects of microalgal products. In *Algae and Human Affairs* (C A Lembi and J R Waaland, Eds), Cambridge Univ. Press, Cambridge, p. 181-202.
- JEFFREY, S. W. e HUMPHREY, G. F., 1975. New Spectrophotometric Equations for Determining Chlorophylls a, b, c<sub>1</sub> and c<sub>2</sub> in Higher Plants, Algae and Natural Phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen (BPP)*, Bd 167, p. 191-194.
- LEPAGE, G. e ROY C. C., 1986. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J. Lipid Res.*, 27: 114-119.
- LI, H.; WANG, J. e ZHANG, J. L., 1991. Removal of nutrient salts in relation with algae in ponds. *Water Sci. Technol.*, 24: 75-83.
- MESQUITA, R., 1997. Eficiência das Cianobactérias na Nutrição Azotada do *Lolium multiflorum*. Tese de Licenciatura, Univ. Trás-os-Montes, Vila Real, p. 53.
- MOUCHET, P., 1992. From conventional to Biological Removal of iron and manganese in France. *Journal of the American Water Works Association*, 84 (4): 158-167.
- NP 2928, 1988. Determinação do Teor de Mercúrio. Método espectrofotométrico de absorção atômica. Instituto Português da Qualidade, Lisboa, p. 5.
- PICOT, B.; EL-HALOUANI, H.; CASELLAS, C.; MOERSIDIK, S. e BONTOUX, J., 1991. Nutrient removal by high rate pond system in a Mediterranean climate (France). *Water Sci. Technol.*, 23: 1535-1541.
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 1998. Clescers, L S, Eaton, A D, Greenberg, A E (Ed.), 20th edition. APHA, AWWA, WEF.

WEATHERBURN, M. W. (1967). Phenolhypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.*, 39: 971.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à UNICER-União Cervejeira S. A. a cedência do efluente e à FC&T pelo financiamento do trabalho, projecto POCTI/43626/BIO/2000.