Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Centro de Ciências de Exatas e Tecnologia – CCET
Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Ambientais – PGTA

Mayara Leite Serejo

Cultivo de microalgas com vinhaça digerida anaerobiamente

Campo Grande – MS
Fevereiro de 2012

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Centro de Ciências de Exatas e Tecnologia – CCET
Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Ambientais – PGTA

Mayara Leite Serejo

Cultivo de microalgas com vinhaça digerida anaerobiamente

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Ambientais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, na área de concentração em Saneamento Ambiental e Recursos Hídricos.

Orientador: Prof. Dr. Marc Árpád Boncz
Co-orientador: Prof. Dr. Kennedy Roche

Banca Examinadora

Prof. Dr. Marc Árpád Boncz
Orientador - UFMS

Prof. Dr. Emerson Andrade Sales
UFBA

Prof. Dr. William Marcos da Silva
UFMS

Campo Grande – MS
Fevereiro de 2012

Dedicatória

Aos meus pais Claudia e Ronaldo!

Agradecimentos

A Deus, pois sem ele, eu não teria forças pra seguir em frente.

Aos meus pais e a minha família pelo amor, apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Marc Árpád Boncz por ser o melhor orientador que alguém poderia ter. Nunca vou esquecer-me de tudo o que ele fez para a conclusão dessa pesquisa. Não esquecerei também de algumas frases que ele sempre diz: “ah, isso é muito fácil!!!”, “isso é um saquíssimo!!!”.

À Prof.ª Dr.ª Paula Loureiro Paulo que é uma mãe pra mim, desde a graduação. Amiga que eu amo muito.

Ao Prof.ª Dr. Kennedy Roche, meu co-orientador querido, pelas dicas e incentivo.

Ao Prof. Dr. Carlos Nobuyoshi Ide, pois sem ele eu não teria realizado a pesquisa.

Aos maravilhosos Marcelo e Cris, pois sem eles eu não saberia realizar nenhuma análise laboratorial. Além disso, foram muito importantes pra mim nesses 5 anos de Laqua pela amizade e companheirismo.

Aos amigos do meu coração Simone, Heltton, Didia, Thaix, Thainá e Ana Cláudia.

Aos estagiários mais queridos de todos: Glauber, Felipe, Grazi, Rafão, Laynara, Fernanda, Vanessa, Tchú e Turco.

À Capes pela bolsa concedida.

Sumário

Dedicatória II

Agradecimentos III

Sumário IV

Lista de Figuras VII

Lista de Siglas e Abreviaturas VIII

Lista de Símbolos IX

Resumo 1

Abstract 2

1 Introdução Geral 3

1.1 A matriz energética e os biocombustíveis 3

1.2 O cultivo de microalgas 4

1.3 Cultivo de microalgas com águas residuais 8

1.4 A vinhaça 9

1.5 Escopo e Estrutura da Dissertação 10

1.6 Referências Bibliográficas 11

2 Identificação e cultivo de microalgas adaptadas à vinhaça digerida sob diferentes condições 15

Resumo 15

2.1 Introdução 16

2.2 Material e Métodos 18

2.2.1 Coleta, identificação e cultivo de microalgas 18

2.2.2 Experimentos com microalgas 19

2.2.3 Análise dos dados 22
2.3 Resultados e Discussão 23
2.3.1 Identificação de microalgas 23
2.3.2 Testes com microalgas 23
2.4 Conclusão 31
2.5 Referências Bibliográficas 31
3 Cultivo de microalgas em fotobiorreator, testes iniciais 35
Resumo 35
3.1 Introdução 36
3.2 Material e Métodos 38
3.2.1 Construção do fotobiorreator 38
3.2.2 As microalgas 39
3.2.3 Testes com películas de controle solar 39
3.2.4 Partida do FBR 40
3.2.5 FBR operado em batelada e contínuo 40
3.3 Resultados e Discussão 40
3.3.1 Testes com películas de controle solar 40
3.3.2 Partida do FBR 41
3.3.3 FBR operado em batelada e contínuo 42
3.4 Conclusão 44
3.5 Referências Bibliográficas 45
4 Conclusões gerais e recomendações 47
4.1 Testes sem vinhaça 47
4.2 Testes com vinhaça 47

4.3 Sugestões para trabalhos futuros 48

Anexo 1 49

Lista de Figuras

Figura 2.1: A- Foto do experimento para verificar a interferência da aeração. B- Foto do experimento para verificar o nutriente limitante. 20

Figura 2.2: Correlação entre turbidez e SST. 24

Figura 2.3: A- Taxa máxima de crescimento ($\mu_{máx}$) em diferentes pH. B-pH durante o teste. 25

Figura 2.4: A- Taxa máxima de crescimento ($\mu_{máx}$) em diferentes temperaturas. B- Representação logarítmica do crescimento das microalgas em diferentes temperaturas. 25

Figura 2.5: A- Representação do crescimento exponencial em diferentes diluições de vinhaça digerida; Vinhaça digerida (V). B- Taxa específica de crescimento ao longo do tempo. 26

Figura 2.6: A-Taxa crescimento exponencial (μ_{exp}) em diferentes concentrações de vinhaça digerida. B- Taxa crescimento por Gompertz (μ_{gomp}) em diferentes concentrações de vinhaça digerida. 27

Figura 2.7: A- pH durante o teste; Vinhaça digerida (V). B- Taxa de crescimento em diferentes concentrações de vinhaça para verificar a influência da esterilização; Taxa de crescimento exponencial (μ_{exp}); Taxa de crescimento por Gompertz (μ_{gomp}); Esterilizado (E) e Não Esterilizado (NE). 28

Figura 2.8: A- Taxa de crescimento em diferentes concentrações de vinhaça; Taxa de crescimento exponencial (μ_{exp}); Taxa de crescimento Gompertz (μ_{gomp}); Aerado (A); Não Aerado (NA). B- Representação do crescimento exponencial em diferentes tipos de reagentes adicionados: A ($CO(NH_2)_2$), B (KH_2PO_4+K_2HPO_4) e C ($NaHCO_3$)..... 30

Figura 3.1: Representação esquemática do reator e equipamentos usados 39

Figura 3.2: Representação do crescimento exponencial utilizando diferentes películas de controle solar 41

Figura 3.3: Resultados do monitoramento *on-line* de temperatura e turbidez..... 42

Figura 3.4: Resultados monitoramento *on-line* de turbidez e temperatura ambiente e do líquido e *off-line* de turbidez. 43

Figura 5.1: A- Foto da lagoa de armazenamento de vinhaça onde a amostra foi coletada. B, C, D, E e F – Fotos do FBR. 49

Lista de Siglas e Abreviaturas

A	Aerado
BBM	*Bold´s Basal Medium*
COV	Carga Orgânica Volumétrica
DA	Digestão Anaeróbia
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
E	Esterilizado
FBR	Fotobiorreator
FP	*Flat panel*
LED	*Light-emitting diode*
NA	Não Aerado
NE	Não Esterilizado
ORP	*Oxidation Reduction Potential*
RPM	Rotação por Minuto
TDH	Tempo de Detenção Hidráulica
UASB	*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*
v/v	volume/volume
SST	Sólidos Suspensos Totais

Lista de Símbolos

$\mu_{máx}$	Taxa de Crescimento Específico Máximo
CH_4	Metano
$CO(NH_2)_2$	Uréia
CO_2	Dióxido de Carbono
d	Dia
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
g	Grama
$gCO(NH_2)_2$	Grama de Uréia
gDQO	Grama de DQO
$gHCO_3^-$	Grama de Íon Bicarbonato
$gNaHCO_3$	Grama de Bicarbonato de Sódio
gSST	Grama de Sólidos Suspensos Totais
h (s)	Hora (s)
H_2O	Água
HCO_3^-	Íon Bicarbonato
kg	Kilograma
L	Litro
mg	Miligrama
mgDQO	Miligrama de DQO
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
$NaHCO_3$	Bicarbonato de Sódio
NT	Nitrogênio Total
ºC	Graus Celsius
pH	Potencial Hidrogeniônico
$pH_{unidade}$	Unidade de pH
t	Tonelada
W	Watt

Resumo

A busca por energias alternativas como os bicombustíveis cresce a cada ano e tem atraído atenção de muitas grupos de pesquisa, ganhando destaque a produção de microalgas para obtenção de biodiesel ou biogás. A utilização de resíduos para o cultivo de microalgas pode ser uma alternativa vantajosa, visto que alguns efluentes contêm quantidades de nutrientes necessários ao crescimento das microalgas. Nesta pesquisa foram estudadas as condições ideais de cultivo de microalgas utilizando a vinhaça anaerobiamente digerida como meio de cultivo para servir de base para a operação de um fotobiorreator (FBR) de 40 litros. Para isso foram realizados tanto testes em laboratório como testes com o FBR disposto ao ar livre Nos testes em laboratório, em FBRs de 250 mL, em condições controladas (4000 lux; 16/8 horas claro/escuro e meio de cultivo BBM), foi obtida taxa de crescimento máximo de 1,93 d^{-1} utilizando vinhaça digerida com concentração de 48 % (v/v), admitindo-se crescimento exponencial. Os resultados demonstraram também que o pH, nas faixas analisadas (6,0 a 7,5), não influenciou no cultivo desse consórcio microalgal, ao contrário da temperatura, onde a ideal é em torno de 30 °C. Já no FBR, em meio BBM puro, a taxa máxima de crescimento microalgal (μ_{max}) obtida foi de 0,30 d^{-1} para fluxo em batelada com trocador de calor e película de controle solar, e 0,19 d^{-1} para fluxo contínuo com vazão de 5 $L.d^{-1}$, sem trocador de calor mas com película solar, sendo que esses dispositivos foram colocados para controlar a temperatura do FBR. O consórcio microalgal era composto de *Chlorella sp*. (97%), *Desmodesmus* sp. (2%) e *Scenedesmus* sp. (1%). Assim, a utilização da vinhaça digerida anaerobiamente como meio de cultivo mostra-se como uma forma eficiente de produzir grandes quantidades de microalgas.

Abstract

The interest for alternative energy sources, like biofuels, grows every year and has become the subject of many current research projects, highlighting the production of microalgae to produce biodiesel or biogas. The use of residues for the cultivation of microalgae can be an attractive alternative because some effluents contain appreciable quantities of nutrients required for the growth of microalgae. In this research project we studied the optimal conditions for cultivation of microalgae using anaerobically digested vinasse as culture medium to serve as a base for the operation of a photobiorreator (PBR) of 40 liters, by means of both laboratory tests and tests with a FBR mounted outdoors. In laboratory tests, in PBRs of 250 mL under controlled conditions (4000 lux, 16/8 hours light/dark and BBM culture medium) a maximum growth rate of 1.93 d^{-1} was obtained, assuming exponential growth, using digested vinasse with a concentration of 48% (v/v). The results also demonstrated that the pH in the range examined (6.0 to 7.5), does not influence the cultivation of microalgal consortium, unlike the temperature, which should ideally be around 30 °C. In the PBR, in pure BBM medium, the maximum rate of microalgal growth (μ_{max}) obtained was 0.30 d^{-1}, with the reactor operating in batch, and equipped with a heat exchanger and solar control film, whilst a growth rate of 0.19 d^{-1} was obtained for continuous flow of 5 $L.d^{-1}$, without a heat exchanger but with solar film; devices used for controlling the temperature of the PBR. The consortium of microalgae was composed of *Chlorella* sp. (97%), *Desmodesmus* sp. (2%) and *Scenedesmus* sp. (1%). Thus, the use of anaerobically digested vinasse as culture medium is shown as an efficient way to produce large quantities of microalgae.

1 Introdução Geral

1.1 A matriz energética e os biocombustíveis

O progresso da sociedade moderna tem sido possível, desde a revolução industrial, principalmente devido ao desenvolvimento de processos que utilizam alguma fonte de energia externa. Inicialmente, a fonte de energia mais usada foi a biomassa (lenha), mas desde o século 19, os recursos energéticos mais utilizados no planeta são os combustíveis fósseis, tais como carvão mineral, petróleo e gás natural (Wilkinson *et al*., 2007). Em conseqüência, o petróleo é hoje a *commodity* mais importante do mundo, utilizado não somente como fonte de energia, mas também, como matéria-prima para uma ampla gama de produtos como plásticos, medicamentos e fertilizantes.

Atualmente, o consumo de petróleo no planeta encontra-se em torno de 85 milhões de barris por dia, onde 50% destes são usados no transporte (Plouchart, 2005). No entanto, este uso contribui cada vez mais com o aumento da concentração dos gases do efeito estufa (GEE) na atmosfera, o que, segundo alguns cientistas (Seiferlein & Boyer, 2007), contribuem para o aquecimento do planeta. Assim, a promoção e utilização de fontes renováveis para a produção de energia surge cada vez mais como uma necessidade de garantir um desenvolvimento sustentável para a sociedade atual e futura (Sarkar, 2010). Em razão deste desenvolvimento, a abordagem de biorefinaria ganha cada vez mais espaço no mercado, pois, além da produção de biocombustíveis, outros compostos de valor agregado podem ser obtidos.

Destacam-se, assim, as microalgas, pois podem produzir uma série de biocombustíveis, como o biometano, bioetanol, biohidrogênio, biobutanol, entre outros (Chinnasamy *et al*., 2010; Parmar *et al*., 2011), além de produtos como o ácido docosahexaenóico e carotenóides (Rawat *et al*., 2011). Entretanto, os custos de produção em larga-escala ainda são elevados (Johnson & Wen, 2010), mas a expectativa é que com tempo e inovações tecnológicas o uso das microalgas se torne cada vez mais vantajosa para a produção de combustíveis alternativos a preços competitivos.

1.2 O cultivo de microalgas

Segundo Vidotti & Rollemberg (2004), as algas abrangem tanto os organismos do Reino Protista (Filo *Euglenophyta,* Filo *Pyrrophyta* e Filo *Chrysophyta*) como do Reino Plantae (Filo *Chlorophyta*, Filo *Rhodophyta* e Filo *Phaeophyta*) e o termo microalgas se refere normalmente às algas que não podem ser vistas sem um microscópio, sendo que, neste grupo incluem-se as microalgas eucarióticas e as cianobactérias procarióticas (Larsdotter, 2006; Whittaker, 1969).

Como as algas são de estrutura simples, sendo unicelular, filamentosa ou colonial, toda energia é direcionada para o crescimento e reprodução, conseguindo taxas de crescimento bem maiores do que as plantas terrestres (multicelulares), onde a energia também é direcionada para o transporte de nutrientes e metabolitos (Walker *et al*., 2005). Além disso, a duplicação da biomassa ocorre em um curto período de tempo e há possibilidade de manipular as condições de cultivo, de modo a aumentar a produção de um componente específico, como por exemplo, os ácidos graxos (Costa *et al*., 2006).

Espécies do gênero *Dunaliella, Haematococcus, Chlorella* e *Euglena* produzem pigmentos muito utilizados em produtos alimentares, cosméticos e suplementos de vitamina A (Lorenz & Cysewski , 2000; Walker *et al*., 2005). No entanto, nas últimas décadas a importância das microalgas vem sendo reconhecida não somente na área alimentícia e farmacêutica, como também na aqüicultura, agricultura e meio ambiente. Segundo Kim & Wijesekara (2011), compostos contidos em microalgas marinhas possuem um efeito anticoagulante e Mulbry *et al*. (2005) apontam que microalgas também podem ser utilizadas como biofertilizantes. Além disso, espécies como *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Spirulina*, entre outras, são muito utilizadas no tratamento de efluentes domésticos e industriais (Aziz & Ng, 1992; Chinnasamy *et al*., 2010; Kebede-Westhead *et al*., 2006; Tarlan *et al*., 2002; Travieso *et al*., 2008; Wang *et al*., 2009; Yang *et al*., 2008).

A cultura de microalgas iniciou-se em 1919, com a introdução de *Chlorella* sp., verificando que certas algas podiam duplicar-se com muita velocidade e que sua matéria seca podia conter até 50% de proteína crua (Borzani *et al*., 2001). Nos anos 80, cerca de 46 fábricas de microalgas na Ásia produziram mais de 1000 kg de microalgas por mês e em 1996 cerca de

2000 toneladas de *Chlorella* sp. foram produzidas comercialmente somente no Japão (Borowitzka, 1999).

A grande parte das microalgas é autotrófica: assimilam carbono inorgânico através da fotossíntese (Equação 1.1), processo que utiliza luz solar para sintetizar moléculas quimicamente (Carvalho *et al*., 2011). Para seu crescimento e reprodução, as microalgas necessitam principalmente de luz solar, CO_2, água e nutrientes, onde o CO_2 pode advir tanto do ambiente atmosférico (0,033% de CO_2 no ar atmosférico) como de fontes suplementares de CO_2 (Chinnasamy *et al*., 2010; Keffer & Kleinheinz, 2002; Larsdotter, 2006; Zhao *et al*. 2011).

$$6CO_2 + 6H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \qquad \text{(Equação 1.1)}$$

Basicamente, a fórmula estequiométrica aproximada dos elementos presentes nas células das microalgas é $C_{106}H_{181}O_{45}N_{16}P$ (Christenson & Sims, 2011; Larsdotter, 2006), podendo variar entre os diferentes táxons existentes, onde razões de nitrogênio/fósforo acima de 30/1 sugerem limitação por fósforo e razões abaixo de 5/1 indicam limitações por nitrogênio (Larsdotter, 2006).

Determinadas microalgas também podem ser cultivadas heterotroficamente em fermentadores heterotróficos, no escuro, exigindo somente uma fonte de carbono orgânico, como por exemplo, açúcares, ácidos orgânicos, acetato, entre outros (Larsdotter, 2006; Walker *et al*., 2005). Outras podem ser cultivadas mixotroficamente, onde elas utilizam, simultaneamente, o carbono inorgânico e o orgânico (Bhatnagar *et al*., 2011).

Em sistemas naturais, abertos ou alimentados com materiais não estéreis, dificilmente haverá uma cultura pura de microalgas, onde pode estabelecer, após certo tempo, uma colonização de cultura mista. Cheirsilp *et al*. (2011) compararam o desempenho da cultura mista de *Rhodotorula glutinis* e *Chlorella vulgaris* com a cultura pura de *Chlorella vulgaris* durante sete dias, em diferentes condições, utilizando efluente de processamento de frutos do mar, que apresentava pH de 6,0, DQO de 34680 $mgDQO.L^{-1}$ e nitrato de 32 $mgNO_3^-.L^{-1}$. Os testes foram realizados em fotobiorreatores de 50 mL, com inóculo de 10% de microalgas. Eles concluíram que a produção de biomassa e lipídios são maiores quando se utiliza cultura mista e que a melhor condição de cultivo encontrada foi de pH inicial de 5,0, intensidade de 5000

lux, fotoperíodo de 16/8 luz/escuro e razão de espécies de 1:1, com produção de biomassa e lipídios de 4,63±0,15 $g.L^{-1}$ e 2,88±0,16 $g.L^{-1}$, respectivamente.

Alguns fatores podem influenciar no crescimento das culturas microalgais, como o pH, temperatura, salinidade, luminosidade, presença de contaminantes, tipo de biorreator, e concentrações de O_2, CO_2 e nutrientes, entre outros (Larsdotte, 2006; Kang *et al*., 2011; Kunjapur & Eldridge, 2010). Cada microalga possui diferentes condições ótimas de cultivo, ou seja, o pH e a temperatura ideal, por exemplo, são diferentes para cada tipo de microalga. Yang *et al*. (2008) apontam que a microalga *Chlorella pyrenoidosa* pode crescer com pH inicial entre 5,0 e 7,5, porém, o pH ótimo é em torno de 6,0. Ainda segundo os autores, a mesma microalga pode crescer em ambientes cuja temperatura varia de 21 a 33 °C, sendo que 27 °C é a temperatura ótima. Já Guedes *et al*. (2011) apontam que a espécie *Scenedesmus obliquus* apresenta melhores condições de cultivo em pH em torno de 6,0 e temperatura de 30 °C.

Yeh *et al*. (2010) estudaram o efeito da intensidade da luz no cultivo de *Chlorella vulgaris* em cinco diferentes intensidades de luz provenientes de lâmpadas fluorescentes, sendo 5, 9, 18, 30 e 42 W/m^2. Eles concluíram que o crescimento microalgal foi inibido em 18 W/m^2. Entretanto, Lee & Palsson (1994) reportaram que a mesma microalga pode ser cultivada em até 400 W/m^2 se a iluminação for realizada por LED (*Light-emitting diode*).

O cultivo de microalgas pode ocorrer em diferentes tipos de reatores como: reatores abertos, como os *raceways*; reatores fechados como os fotobiorreatores (FBRs); reatores de biofilmes; híbridos; de fermentação heterotrófica; entre outros, sendo que, atualmente, os dois primeiros são os mais utilizados (Christenson & Sims, 2011; Chisti, 2007). As *raceways* possuem uma operação mais barata, porém, não conseguem quantidades de biomassa microalgal superiores a dos FBR, além de poder ocorrer alta evaporação e possível contaminação (Chisti, 2007). Assim, a utilização dos FBRs torna-se mais viável economicamente.

Os FBRs mais comuns são os tubulares e os *flat panels* (FPs). O primeiro, único utilizado em larga escala, pode alcançar maiores quantidades de biomassa que o segundo, entretanto, apresentam maior consumo de energia e maiores quantidades de oxigênio dissolvido (OD), além de poder ocorrer a fotoinibição (Kunjapur & Eldridge, 2010). Os FPs possuem uma relação superfície/volume alta, o que leva à melhor eficiência fotossintética (Akkerman *et al*.,

2002). Além disso, são flexíveis operacionalmente, pois podem ser operados tanto em batelada como em fluxo contínuo (Tamburic *et al*., 2011). Normalmente, são inclinados em um ângulo que permite melhor exposição à irradiação solar (Carvalho *et al*., 2006) e colocados no sentido Norte-Sul para receber iluminação constantemente. Um problema nos FPs, no entanto, pode ser a maior chance de superaquecimento.

Em uma pesquisa desenvolvida por Jorquera *et al*. (2010), os autores analisaram o ciclo de vida energético da produção de biomassa microalgal de *Nannochloropsis* sp. em reatores *raceways* e fotobiorreatores tubular e *flat panel*. Os autores concluíram que o FBR tubular não é viável economicamente, pois apresentou uma razão líquida de energia (quociente da energia produzida pela energia requerida para a produção de biomassa) inferior a 1,0, enquanto que, nos demais reatores, esta razão foi superior a 1,0.

A energia solar disponível para as células das microalgas no FBR diminui ao se distanciar da zona fótica, região adjacente à superfície iluminada. Assim, é preciso minimizar os gradientes de luz e controlar os ciclos claro/escuro por meio de um sistema de agitação eficiente que pode ser feito, por exemplo, por meio da aeração ou injeção de CO_2 (Janssen *et al*., 2003). Boas taxas de transmissão de O_2 através do FBR também são necessárias para atingir o crescimento ótimo da biomassa microalgal (Tamburic *et al*., 2011). Existem alguns obstáculos em FPs que devem ser solucionados como, a dificuldade em controlar a temperatura da cultura, a possibilidade de agrupamento de células de algas na parede do reator e a incompatibilidade com certas cepas de algas (Tamburic *et al*., 2011).

Feng *et al*. (2011) cultivaram *Chlorella zofingiensis* em fotobiorreator *flat panel* de 60 L, exposto ao ar livre, em meio de cultura BG-11, com a finalidade de produzir biodiesel. A maior taxa de crescimento e produtividade da biomassa obtida foi de 0,994 d^{-1} e 58,4 $mg.L^{-1}.d^{-1}$, respectivamente.

Atualmente, o cultivo de microalgas se torna cada vez mais vantajoso, pois, além de não necessitar terra arável, não competindo com a produção alimentos, não precisa necessariamente de água potável, pois podem ser cultivadas em águas salinas e resíduos domésticos e industriais (Johnson & Wen, 2010; Walker *et al*., 2005; Wang *et al*., 2009; Wiley *et al*., 2011). Com isso, muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas com o intuito de

aproveitar a fonte de nutrientes dos resíduos para o cultivo de microalgas, diminuindo gastos e dando uma destinação útil a esses efluentes.

1.3 Cultivo de microalgas com águas residuais

Microalgas como *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Phormidium*, *Botryococcus*, *Chlamydomonas*. e *Spirulina* estão sendo muito utilizadas no tratamento de águas residuais domésticas e industriais e a eficiência deste método se torna cada vez mais promissora (Chinnasamy *et al*., 2010; Wang *et al*., 2009). Dentre as águas residuais que podem ser utilizadas como fonte de nutrientes para o cultivo de microalgas encontram-se os esgotos domésticos (Wang, 2009), efluentes de suinocultura (Kebede-Westhead *et al*., 2006), de destilarias (Travieso *et al*., 2008), entre outras.

Aziz & Ng (1992) investigaram a viabilidade do uso de um reator de algas para tratar esgoto doméstico acrescido de efluente industrial de uma fazenda de suínos e uma fábrica de óleo de palma, utilizando uma cultura mista de algas, onde a espécie predominante era *Chlorella pyrenoidosa*, sob diversas condições ambientais de temperatura, pH e luz/escuro e período de detenção de 15 dias. Os autores constataram que o reator de algas foi capaz de remover 80-88% de DBO, 70-82% de DQO, 60-70% de nitrogênio total e 50-60% de fósforo.

Tarlan *et al*. (2002) estudaram a capacidade das algas em tratar polpa à base de madeira e águas residuais de uma indústria de papel, realizando testes em reatores em batelada com uma cultura mista de algas, com *Chlorella* sp. e diatomáceas dominantes, a 20±2 °C, 12/12 horas de luz/escuro, em lâmpadas fluorescentes de 18 W. Eles concluíram que as algas conseguem remover até 58% de DQO, 84% da cor e 80% de AOX (xenobióticos orgânicos absorvíveis).

Analisando não só pelo aspecto do tratamento de efluentes, mas também pela produção de microalgas, visto que, ao tratar um efluente, as microalgas se multiplicam, produzindo biomassa microalgal, um resíduo que pode fornecer água e nutrientes ao cultivo é a vinhaça, gerada em destilarias na produção do etanol. Christenson & Sims (2011) apontam que, dentre os resíduos industriais mais utilizados para este fim, os de destilarias produzem maiores quantidades de biomassa microalgal, teoricamente. Estima-se que, no Brasil, na safra de 2011/2012 serão produzidos 22.858 bilhões de litros de etanol (Conab, 2011), sendo que, para a produção de 1 litro de etanol, se produz cerca de 12 a 15 litros de vinhaça (van Handeel, 2005).

1.4 A vinhaça

A vinhaça ou vinhoto é um resíduo de destilarias de etanol rico em nutrientes e minerais, de coloração marrom-escura, que apresenta pH baixo (3,5 a 5,0), temperatura alta (em torno de 70 e 80 ºC), elevados teores de matéria orgânica e pode conter metais pesados como cobre, cromo, níquel e zinco (Satyawali & Balakrishanan, 2008, van Haandel, 2005; Wilkie *et al*., 2000). A mesma é muito utilizada em práticas de fertirrigação do solo, devolvendo os nutrientes essenciais requerido por ele. Entretanto, um cuidado especial com esta prática deve ser tomado, pois a sua aplicação em excesso pode afetar tanto as águas subterrâneas como as características do solo, salinizando-o (Piacente, 2005; Szmrecsányi; 1994).

Tanto em praticas de fertirrigação como em cultivos de microalgas, seria interessante que o potencial poluidor da vinhaça fosse minimizado. Para reduzi-lo, processos biológicos e físico-químicos são comumente utilizados. Entretanto, a aplicação deste último é inviável pelos elevados gastos com coagulantes devido à alta quantidade de sólidos presentes (Gonçalves & Silva, 2000). Dentre os processos biológicos encontram-se os aeróbios e os anaeróbios. Este último apresenta melhores vantagens sob o primeiro, pois, além de degradar grande parte da matéria orgânica e permitir a produção de energia, ele mantém os nutrientes (Chernicharo, 2007), sendo mais interessante ainda para o cultivo de microalgas.

Na digestão anaeróbia, os compostos orgânicos complexos do efluente são convertidos em biogás (CH_4 e CO_2) ao passar pela camada de lodo biológico (Chernicharo, 2007). Esta conversão pode ser realizada em diferentes tipos de reatores, sendo que um dos mais utilizados é o reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo (UASB). O princípio de funcionamento de um reator UASB é baseado no fluxo ascensional, onde grande parte da matéria orgânica do afluente é convertida em biogás, ao passar por uma camada de lodo biológico (Chernicharo, 2007). No topo do reator encontra-se um separador trifásico, com formato de cone invertido, que separa a fase sólida, liquida e gasosa, promovendo o regresso do lodo ao compartimento de digestão e o recolhimento do gás na parte superior (von Sperling, 2005).

Formagini (2011) avaliou a eficiência no tratamento da vinhaça através da digestão anaeróbia, utilizando dois reatores UASB, sendo um reator de 40 L operando em bateladas, com 0,6 $gNaHCO_3.gDQO^{-1}$ de tampão e COV de 2,75 ± 0,8 $g.L^{-1}.d^{-1}$, e outro reator de 0,92 L operando em fluxo contínuo com 0,2 $gCO(NH_2)_2.L^{-1}$ como tampão e COV de 4 $g.L^{-1}.d^{-1}$,

operando em fluxo contínuo. Segundo o autor, o primeiro reator apresentou eficiência média de 89% e o segundo de 96% de remoção de matéria orgânica (DQO).

Basicamente, as concentrações médias de cálcio, fosfato total, nitrogênio total e potássio da vinhaça digerida anaerobiamente são, respectivamente, 0,95-3,26 g $Ca.L^{-1}$, 0,06-0,13 $gPO_4^{-3}.L^{-1}$; 0,48-0,71 g $N.L^{-1}$ e 1,39-1,91 g $K.L^{-1}$ (Cortez *et al*., 1996). Santos (2010) encontrou para os mesmos parâmetros concentrações de 149 ± 58,5 $mgCa.L^{-1}$, 21 ± 4,9 $mgPO_4^{-3}.L^{-1}$, 122,7 ± 89,8 $mgN.L^{-1}$; e 426 ± 89,3 $mgK.L^{-1}$, respectivamente. Considerando a composição da vinhaça digerida e a fórmula da biomassa microalgal $C_{106}H_{181}O_{45}N_{16}P$, conclui-se, então, que não há nitrogênio suficiente à demanda das microalgas, tornando-se o fator limitante. Como existe um relativo excesso de CO_2 e fósforo, pode-se recircular os resíduos das algas no FBR após a sua separação, para tornar o CO_2 o fator limitante do processo. Outra opção é aumentar o teor de nitrogênio da vinhaça, através da adição de uréia antes da digestão anaeróbia que pode, ainda, ajudar a estabilizar o pH do mesmo, em vez do tradicional bicarbonato de sódio.

1.5 Escopo e Estrutura da Dissertação

Com base no valor nutricional da vinhaça digerida anaerobiamente e nas vantagens de se cultivar microalgas, este trabalho tem como objetivo principal, o cultivo de microalgas com vinhaça digerida anaerobiamente, para se obter, posteriormente, produtos como o biodiesel ou biogás.

No Capítulo 2 são apresentados os resultados da identificação das microalgas encontradas em uma lagoa de armazenamento de vinhaça e os testes realizados a fim de encontrar as condições ideais de cultivo dessas microalgas, utilizando a vinhaça digerida anaerobiamente.

O Capítulo 3 se refere ao cultivo de microalgas em um fotobiorreator de 40 litros, operado primeiramente em bateladas e depois em fluxo contínuo.

As conclusões gerais e recomendações da dissertação são apresentadas no Capítulo 4.

No Anexo 1 encontram-se as fotos da lagoa onde foi coletada a vinhaça e do fotobiorreator.

1.6 Referências Bibliográficas

Akkerman, I., Janssen, M., Rocha, J., Wijffels, R.H. (2002). Photobiological hydrogen production: Photochemical efficiency and bioreactor design. *International Journal of Hydrogen Energy*, **27** (11-12), pp. 1195-1208.

Aziz M. A. & Ng W. J. (1992). Feasibility of wastewater treatment using the activated-algae process. *Bioresource Technology*, **40**, pp. 205–208.

Bhatnagar, A., Chinnasamy, S., Singh, M., Das, K.C. (2011). Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy*, **8** (10), pp. 3425-3431.

Borowitzka, M.A. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, **70** (1-3), pp. 313-321.

Borzani, W., Schmidell, W., Lima, U. A., Aquarone E (2001). *Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo: Editora Edgar Blücher Ltda, 1ª edição, vol. III.

Carvalho, A.P., Meireles, L.A., Malcata, F.X. (2006). Microalgal reactors: A review of enclosed system designs and performances. *Biotechnology Progress*, **22** (6), pp. 1490-1506.

Carvalho, A.P., Silva, S.O., Baptista, J.M., Malcata, F.X. (2011). Light requirements in microalgal photobioreactors: An overview of biophotonic aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **89** (5), pp. 1275-1288.

Cheirsilp B., Suwannarat W. e Niyomdecha R. (2011). Mixed culture of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for lipid production from industrial wastes and its use as biodiesel feedstock. *New Biotechnology*, **28**, pp. 362-368.

Chernicharo C. A. (2007). *Reatores anaeróbios. Princípios do tratamento biológico de águas residuárias*. v.5, Departamento de Engenharia Sanitária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, Brasil.

Chinnasamy S, Bhatnagar A, Hunt RW, Das KC. (2010). Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource Technol*, **101**, pp. 3097–105.

Chisti Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv*; **25**, pp. 294–306.

Chisti Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol*, **26** (3), pp. 126-31.

Christenson, L., Sims, R. (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*, **29** (6), pp. 686-702.

Conab (2011). Acompanhamento de safra brasileira : cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2011 - Companhia Nacional de Abastecimento. Brasília: Conab 2011. http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_12_08_11_00_54_08.pdf

Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P., Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of Nannochloropsis oculata and Chlorella vulgaris for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, **48** (6), pp. 1146-1151.

Cortez L. A. B., Freire W. J., Rosillo-Calle F. (1996). Biodigestion of vinasse in Brazil. *International Sugar Journal*, **100** (1196), pp. 403-413.

Costa J. A., Radmann E. M., Cerqueira V. S., Santos G. C., Calheiros M.N. (2006). Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. *Alim. Nutr., Araraquara*. **17** (4), pp.429-436.

Feng, P., Deng, Z., Hu, Z., Fan, L. (2011). Lipid accumulation and growth of *Chlorella zofingiensis* in flat plate photobioreactors outdoors. *Bioresource Technology*, **102** (22), pp. 10577-10584.

Formagini, E. L. (2011). *Estabilização do pH na digestão anaeróbia da vinhaça utilizando bicarbonato de sódio e uréia.* (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande - MS, Brasil. 78 p.

Gonçalves, C. A. S. e Silva, E. L. (2000). Tratamento físico-químico da vinhaça. In: XXVII congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental. Porto Alegre – RS, Brasil.

Guedes, A.C., Amaro, H.M., Pereira, R.D., Malcata, F.X. (2011). Effects of temperature and pH on growth and antioxidant content of the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Biotechnology Progress*, **27** (5), pp. 1218-1224.

Janssen M., Tramper J., Mur L.R. e Wijffels R.H. (2003). Enclosed outdoor photobioreactors: light regime, photosynthetic efficiency, scale-up and future prospects. *Biotechnol Bioeng*, **81**, pp. 193–210.

Johnson M. B. & Wen Z. (2010). Development of an attached microalgal growth system for biofuel production. *Appl Microbiol Biotechnol*, **85**, pp. 525–534.

Kang, K.-H., Ryu, B., Kim, S.-K., Qian, Z.-J., Kim, S.-K. (2011). Characterization of growth and protein contents from microalgae Navicula incerta with the investigation of antioxidant activity of enzymatic hydrolysates. *Food Science and Biotechnology*, **20** (1), pp. 183-191.

Kebede-Westhead E., Pizarro C. e Mulbry W. W. (2006). Treatment of swine manure effluent using freshwater algae: Production, nutrient recovery, and elemental composition of algal biomass at four effluent loading rates. *Journal of Applied Phycology*, **18**, pp. 41-46.

Keffer, J.E., Kleinheinz, G.T. (2002). Use of *Chlorella vulgaris* for CO2 mitigation in a photobioreactor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **29** (5) , pp. 275-280.

Kim, S.K., Wijesekara, I. (2011). Anticoagulant effect of marine algae. *Advances in Food and Nutrition Research*, **64** , pp. 235-244.

Kunjapur, A.M., Eldridge, R.B. (2010). Photobioreactor design for commercial biofuel production from microalgae. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, **49** (8), pp. 3516-3526.

Larsdotte, K. (2006). Wastewater treatment with microalgae – a literature review. *Vatten*, **62**, pp. 31–38.

Lee C. G., Palsson B. O. (1994). High-density algal photobioreactors using light-emitting-diodes, Biotechnol. Bioeng., **44**, pp. 1161–1167.

Lorenz, R.T., Cysewski, G.R. (2000). Commercial potential for Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*, **18** (4), pp. 160-167.

Mulbry, W.; Westhead, E. K.e; Pizarro, C.; Sikora, L. (2005). Recycling of manure nutrients: use of algal biomass from dairy manure treatment as a slow release fertilizer. *Bioresource Technology*, **96**, pp. 451–458.

Parmar, A., Singh, N.K., Pandey, A., Gnansounou, E., Madamwar, D. (2011). Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. *Bioresource Technology*, **102** (22), pp. 10163-10172.

Piacente F. J. (2005). *Agroindústria canavieira e o sistema de gestão ambiental: o caso das usinas localizadas nas bacias hidrográficas dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiaí*. Dissertação (Mestrado). Instituto de Economia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

Plouchart, G. (2008). *Panorama 2005: Energy Consumption in the Transport Sector*. http://www.ifp.com/content/download/57516/1274819/file/IFP-Panorama05_09-ConsommationVA.pdf, último acesso: 22 de agosto 22 de 2008.

Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T.,Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, **88** (10) , pp. 3411-3424.

Santos, L. S. (2010). *Digestão anaeróbia da vinhaça e determinação de parâmetros para gerenciamento do processo em tempo real*. (Dissertação de Mestrado). Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande - MS, Brasil. 73 p.

Sarkar, A. (2010). Global climate change and sustainable energy development: Focus on emerging issues and strategies for the Asia-Pacific region. *Strategic Planning for Energy and the Environment*, **30** (1), pp. 18-79.

Satyawali Y. e Balakrishanan M. (2008). Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: A review. *Journal of Environmental Management*, **86**, pp. 481-497.

Seiferlein, K. E. E Boyer, R. (2007). *Annual Energy Review 2007*. U.S. Department of Energy, Office of Energy Markets and End Use, Energy Information Administration. Washington - DC, USA: June 2008, p.439. (DOE/EIA-0384(2007)).

Szmrecsányi, T.(1994). *Tecnologia e degradação ambiental: o caso da agroindústria canavieira no Estado de São Paulo*. Revista Informações Econômicas, São Paulo, **24**, pp.10.

Tamburic, B., Zemichael, F.W., Crudge, P., Maitland, G.C., Hellgardt, K. (2011). Design of a novel flat-plate photobioreactor system for green algal hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, **36** (11), pp. 6578-6591.

Tarlan E., Dilek, F. B., & Yetis, U. (2002). Effectiveness of algae in the treatment of a wood-based pulp and paper industry wastewater. *Bioresource Technology*, **84**, pp. 1–5.

Travieso L., F. Benítez, E. Sánchez, R. Borja, M. León, F. Raposo and B. Rincóna (2008). Performance of a Laboratory-scale Microalgae Pond for Secondary. Treatment of Distillery Wastewaters. *Chem. Biochem. Eng*., **22** (4), pp. 467–473.

van Haandel A. C. (2005). Integrated energy production and reduction of environmental impact at alcohol distillery plants. *Water Science and Technology*, **52** (1-2), pp. 49-57.

Vidotti, E. C. & Rollemberg M. do C. E. (2004). Algae: from aquatic environment economy to bioremediation and analytical chemistry. *Química Nova*, **27** (1).

von Sperling M. (2005). *Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgoto. Princípios de tratamento biológico de águas residuárias*. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte - MG, Brasil.

Walker, T.L., Purton, S., Becker, D.K., Collet, C. (2005). Microalgae as bioreactors. *Plant Cell Reports*, **24** (11), pp. 629-641.

Wang L, Min M, Li Y, Chen P, Chen Y, Liu Y, et al. (2009). Cultivation of green algae Chlorella sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Appl Biochem Biotechnol*; **162** (4), pp. 1174-1186.

Whittaker, Robert H. (1969). New Concepts of Kingdoms of Organisms: Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science*, **163** (863), pp. 150-60.

Wiley, P.E., Campbell, J.E., McKuin, B. (2011). Production of biodiesel and biogas from algae: A review of process train options. *Water Environment Research*, **83** (4), pp. 326-338

Wilkie, A.C., Riedesel, K.J., Owens, J.M. (2000). Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. *Biomass and Bioenergy*, **19** (2), pp. 63-102.

Wilkinson, P., Smith, K.R., Joffe, M., Haines, A. (2007). A Global Perspective on Energy: Health Effects and Injustices. *The Lancet*, **370** (9591), 5-18.

Yang, C.F., Ding, Z.Y., Zhang, K.C. (2008). Growth of Chlorella pyrenoidosa in wastewater from cassava ethanol fermentation. *World J Microbiol Biotechnol*, **24** (12), pp. 2919-2925.

Yeh, K.-L., Chang, J.-S., Chen, W.-M. (2010). Effect of light supply and carbon source on cell growth and cellular composition of a newly isolated microalga Chlorella vulgaris ESP-31. *Engineering in Life Sciences*, **10** (3), pp. 201-208.

Zhao, B., Zhang, Y., Xiong, K., Zhang, Z., Hao, X., Liu, T. (2011). Effect of cultivation mode on microalgal growth and CO_2 fixation. *Chemical Engineering Research and Design*, **89** (9) , pp. 1758-1762.

2 Identificação e cultivo de microalgas adaptadas à vinhaça digerida sob diferentes condições

Resumo

As microalgas estão sendo amplamente utilizadas atualmente, tanto no ramo alimentício e farmacêutico como no tratamento de efluentes e na geração de energia. A utilização de resíduos para o cultivo de microalgas pode ser uma alternativa vantajosa, visto que alguns efluentes contêm quantidades de nutrientes necessários ao crescimento das microalgas. Neste trabalho foi estudado o cultivo de microalgas utilizando a vinhaça anaerobiamente digerida como meio de cultivo. Experimentos em fotobiorreatores de 250 mL, com luminosidade de aproximadamente 4000 lux, fotoperíodo de 16/8 hs claro/escuro, temperatura de 23 °C e meio de cultivo BBM, foram realizados para verificar as condições ideais de cultivo de microalgas com esse resíduo, como pH, temperatura, concentração da vinhaça, entre outros. As microalgas utilizadas foram coletadas em uma lagoa de armazenamento de vinhaça, onde foram encontradas espécies de *Chlorella sp*. (97%), *Desmodesmus* sp. (2%) e *Scenedesmus* sp. (1%). Os resultados demonstraram que o pH, nas faixas analisadas (6,0 a 7,5), não influencia no cultivo desse consórcio microalgal, ao contrário da temperatura, onde a ideal é em torno de 30 °C. A taxa de crescimento máximo (1,93 d^{-1}), admitindo-se crescimento exponencial, foi obtida utilizando a vinhaça digerida com concentração de 48% (v/v). Entretanto, mesmo com 80% de concentração apresentou um bom desempenho (1,73 d^{-1}), superior ao meio de cultivo padrão, o BBM (0,42 d^{-1}). Com isso, essa combinação de digestão anaeróbia seguida de cultivo de microalgas com vinhaça digerida pode ser uma eficiente maneira de produzir grandes quantidades de microalgas utilizando este resíduo, que por sua vez, pode ser utilizada para a produção de energia como o biodiesel ou biogás.

Parte deste capítulo encontra-se em: Serejo, M. L.; Marques, F. R.; Formagini, E. L.; Paulo, P. L.; Boncz, M. A. (2011). *Algae cultivation for biodiesel and biogas production using anaerobically digested vinasse*. In: X latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion, 2011, Ouro Preto. Proceedings of the X latin American Workshop and Symposium on Anaerobic Digestion. Ouro Preto: UFOP, 2011. v. 1. p. 1-4.

Este capítulo foi redigido de acordo com as instruções do *Journal* "*Bioresource Technology*", onde uma versão modificada será submetida, após tradução para o idioma inglês.

2.1 Introdução

Há alguns anos existe um forte interesse em microalgas no mundo científico, principalmente na área da produção de biocombustíveis. Antigamente, eram consideradas como um problema na engenharia ambiental, associadas à eutrofização de corpos de águas por resíduos de atividades antrópicas. Entretanto, nas últimas décadas, a utilidade das algas vem sido reconhecida, devido à maior eficiência fotossintética, maior produção de biomassa e crescimento mais rápido em comparação com outras culturas energéticas, tornando a utilização das mesmas cada vez mais promissora.

Cultivadas comercialmente para a produção de ingredientes para as indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentícias, o uso das microalgas também tem atraído muita atenção no tratamento de efluentes domésticos e industriais, na mitigação dos efeitos do gás carbônico (Rai *et al.*, 2000), na produção de biodiesel após a extração e processamento do óleo contido nelas (Briggs, 2004; Chisti, 2007; Sheehan *et al.*, 1998; Wijffels e Barbosa, 2010) e, recentemente, na produção de biogás a partir da digestão anaeróbia das mesmas (Bruhn *et al.*, 2011; Collet *et al.*, 2011; Verstraete *et al.*, 2010; Zamalloa *et al.*, 2011).

Essencialmente, as microalgas fotoautotróficas necessitam de luz, água, gás carbônico (CO_2) e nutrientes (macro e micronutrientes) para sua reprodução, sendo que estes últimos podem ser fornecidos por diferentes tipos de efluentes, tais como: esgotos domésticos (Wang, 2009), efluentes de suinocultura (Kebede-Westhead *et al*. 2006), de laticínios (Mulbry *et al.*, 2008), de destilarias (Travieso *et al*., 2008), da indústria de papel (Tarlan *et al.* 2002) e de processamento da mandioca (Yang *et al*., 2008), entre outros. As microalgas mais utilizadas para este fim são *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. e *Spirulina* sp. (Yang *et al*., 2008; Chinnasamy *et al*., 2010; Wang *et al*., 2009), além da cultura mista de microalgas com e sem bactérias também ser utilizada (Aziz & Ng, 1992; Tarlan *et al*., 2002; González *et al*., 2008; Travieso *et al*., 2008; Barrocal *et al*., 2010).

Uma pesquisa realizada por Chinnasamy *et al*. (2010) demonstrou que um consórcio de 15 algas nativas, dentre elas *Chlorella* sp., *Spirulina* sp., *Botryococcus braunii*, etc., removeram acima de 96% de nutrientes em águas residuais tratadas, compostas de 85-90% de água residual industrial (usinas de carpete e tapete) e 10-15% de esgoto sanitário, em 72 horas a

15 °C. Ainda segundo os autores, estimam-se que o potencial de produção de biomassa desse consórcio chega a 9,2-17,8 $ton.ha^{-1}.ano^{-1}$. Já Travieso *et al*. (2008) avaliaram o desempenho de uma lagoa de microalgas com *Chlorella vulgaris* em escala laboratorial tratando o efluente de uma destilaria, digerido por um reator anaeróbio de leito fixo. As lagoas foram operadas com uma reciclagem de efluentes de 10:1 em relação ao afluente, TDH de 11 dias e com cargas de 418 $kgDQO.ha^{-1}.d^{-1}$ e 92 $kgDBO.ha^{-1}.d^{-1}$. As eficiências de remoção de nitrogênio orgânico, amônia e fósforo total apresentadas nesta pesquisa foram de 90,2, 84,1 e 85,5 %, respectivamente.

Para o cultivo de microalgas, alguns fatores que influenciam em seu crescimento devem ser levados em conta, como: temperatura, pH, luminosidade, nutrientes, entre outros. Segundo Fox (1996), a temperatura ideal para o cultivo de algas encontra-se entre 35ºC e 37ºC. Entretanto, para Sakai *et al*. (1995), algumas algas, como a *Chlorella* sp., podem suportar uma temperatura de até 42ºC. O pH ideal deve encontrar-se em torno da neutralidade, entre 6,0 e 8,0 (Fox, 1996). De acordo com Carioca e Arora (1984), a faixa de aproveitamento da radiação luminosa pelos organismos fotossintéticos situa-se entre 400 e 700 nm, correspondendo a 50% do espectro da radiação solar. Além disso, elas apresentam alta tolerância à concentração de CO_2, mantendo seu crescimento até uma concentração de 40% de CO_2 (Sakai *et al*., 1995).

Este estudo é parte de um projeto de pesquisa onde o objetivo é produzir biodiesel a partir de algas cultivadas em vinhaça digerida por reator anaeróbio. A vinhaça é um resíduo produzido a partir da destilação do etanol, muito utilizada na fertirrigação do solo, pois apresenta grandes quantidades de nutrientes, como nitrogênio, fósforo e potássio. Entretanto, a mesma possui altas concentrações de matéria orgânica e baixo pH, que podem ser prejudiciais ao solo e águas subterrâneas com seu uso indisciplinado (van Haandel, 2005). A digestão anaeróbia pode remover parte dessa matéria orgânica e elevar o pH da vinhaça, enquanto mantém os nutrientes no efluente basicamente inalterados (van Haandel e Lettinga, 1994; Döll & Foresti, 2010). Assim, a vinhaça digerida anaerobiamente pode ser utilizada como uma fonte barata de macro e micronutrientes para o cultivo de microalgas em larga-escala. Estas microalgas, por sua vez, podem servir como fonte de energia após a obtenção do biodiesel. Em uma revisão feita por Christenson & Sims (2011), eles constataram que a maior produção de biomassa,

teoricamente, pode ser realizada a partir da utilização de resíduos de destilarias, baseado na fórmula da biomassa algal $C_{106}H_{181}O_{45}N_{16}P$.

Com isso, o objetivo deste trabalho foi investigar as condições específicas de cultivo e produção de microalgas, aproveitando a vinhaça de cana-de-açúcar digerida anaerobiamente como meio de cultivo e fonte de nutrientes, utilizando microalgas pré-adaptadas à vinhaça, para servir de referência para inoculação e partida de um fotobiorreator (FBR) piloto de 40 litros projetado para o cultivo de microalgas com esse resíduo.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Coleta, identificação e cultivo de microalgas

Com a intenção de encontrar espécies microalgais adaptadas à composição da vinhaça de cana-de-açúcar, foram coletadas amostras na lagoa de armazenamento de vinhaça (Figura 5.1-A; Capítulo 5- Anexos) de uma usina de açúcar e álcool (a mesma não apresentava sistema de tratamento), situada perto da cidade de Sidrolândia-MS. Foram coletadas amostras diretamente na superfície da lagoa, próxima à margem, em frascos de polietileno, seguindo a metodologia de Bicudo & Menezes (2005).

Parte das amostras foi encaminhada para identificação (preservada com lugol ácido a 5%) e parte para o cultivo. Para a identificação utilizou-se um microscópio óptico e encontraram-se pouquíssimas microalgas visíveis. Com isso, decidiu-se realizar a identificação após a incubação direta da amostra coletada, sem nutrientes e diluição, a 23 °C, em condições de iluminação controlada de cerca de 4000 lux (luxímetro SOLARA 2000), provenientes de lâmpadas fluorescentes de 40 w, com fotoperíodo de 14 horas luz/10 horas escuro.

Após algumas semanas, as microalgas se multiplicaram e, assim, amostras foram retiradas para identificação novamente. A chave de identificação utilizada foi de acordo com Bicudo & Menezes (2005). Os táxons foram identificados em nível de gênero. Utilizou-se, também, uma câmara de Neubauer para quantificar a proporção aproximada de cada gênero de microalga presente na amostra.

Identificadas as algas, escolheu-se o meio de cultivo adequado, no caso, o meio Bold´s Basal Medium (BBM), um dos mais utilizados para o cultivo de *Chlorella* sp. (Oncel *et al*., 2011; Lim *et al*., 2010; Bertoldi *et al*., 2009) , predominante no consórcio de microalgas presentes,

de modo a obter um estoque de microalgas. As condições ambientes foram as mesmas do cultivo anterior. Além disso, realizou-se a aeração por meio de um compressor de aquário e uma pedra de difusão.

A composição química do meio BBM (em $mg.L^{-1}$) era de: $NaNO_3$, 250; KH_2PO_4, 175; $CaCl_2.2H_2O$, 25; $MgSO_4.7H_2O$, 75; K_2HPO_4, 75; NaCl, 25; EDTA, 50; $FeSO_4.7H_2O$, 4,98; H_3BO_3, 11,42; $ZnSO_4.7H_2O$, 8,82; $NaMoO_4.2H_2O$, 0,72; $CoCl.6H_2O$, 0,38; $MnCl_2.4H_2O$, 1,44; $CuSO_4.5H_2O$, 1,57 (Nichols, 1973). Foi utilizada água Milli-Q.

2.2.2 Experimentos com microalgas

Após a obtenção de um estoque de microalgas, cultivadas e armazenadas em uma geladeira, foram realizados os experimentos para identificação de condições adequadas para o cultivo dessas algas, tais como pH, temperatura, aeração, diluição da vinhaça, nutriente limitante e esterilização. Em cada teste foram utilizadas as mesmas espécies de microalgas que estavam armazenadas na geladeira (para evitar que a cultura fosse modificada).

Os experimentos foram realizados em triplicata, em FBRs de 250 mL (Erlenmeyers), com volume útil de 100 mL, tampados com gaze e algodão para proporcionar a troca gasosa com o ambiente externo e impedir a contaminação microbiana. Os testes procederam-se em uma câmara de incubação termostatizada (Tecnal, Piracicaba-SP, BR), a uma temperatura de 23 °C (exceto pra o teste de temperatura), com lâmpadas de 40 W, 4000 lux e fotoperíodo de 16/8 (luz/escuro). Foi feita uma triplicata "controle" em todos os experimentos, onde cerca de 20 mL de estoque de algas foram acrescidas em 80 mL de meio de cultivo BBM.

Primeiro, um experimento foi realizado com o objetivo de verificar se há diferença significativa no crescimento algal entre o meio de cultivo esterilizado e não esterilizado. Para isso, uma triplicata foi autoclavada e a taxa de crescimento monitorada dentro de uma câmara de fluxo laminar, em condições axênicas. As demais foram realizadas em condições não-axênicas.

Para o experimento de pH, foram incubadas cinco triplicatas, sendo uma de controle e quatro de soluções com tampão de fosfato de modo que o pH se mantivesse em torno de 6,0, 6,5, 7,0 e 7,5. Para os testes com tampão, a composição do meio era de cerca de 20 mL de algas, 60 mL de meio BBM e 20 mL de tampão.

Outra condição testada foi a de temperatura, onde foram avaliados os crescimentos microalgais nas seguintes temperaturas: 23, 30, 35, 40, 45 e 50 °C.

No teste seguinte, utilizou-se a vinhaça digerida por reator anaeróbio como meio de cultivo, nas proporções de 0, 4, 8, 16, 32, 48, 64 e 80% (v/v), para verificar a taxa de crescimento máximo das microalgas em meio contendo vinhaça digerida. A vinhaça digerida era diluída em meio BBM e cerca de 20 mL (20% v/v) de solução de microalgas foram utilizadas. O reator UASB possui uma capacidade de aproximadamente 60 litros, com TDH de 48 horas, operado com 0,6 $gNaHCO_3.gDQO^{-1}$ para fornecimento de alcalinidade.

Outra condição testada teve o intuito de verificar se os microrganismos ainda presentes na vinhaça interferem no crescimento algal, visto que o reator UASB é um reator biológico, possuindo grandes quantidades de bactérias em seu efluente. Para isso, oito triplicatas foram incubadas nas seguintes proporções de vinhaça 0, 8, 16 e 32% (v/v), com e sem esterilização por autoclavagem.

Para verificar se a aeração interfere diretamente na produção de algas em meio de cultivo com vinhaça digerida, foram feitas seis triplicatas das seguintes proporções de vinhaça: 0, 16 e 48% (v/v), com e sem aeração por bombas de aquário (Figura 2.1-A).

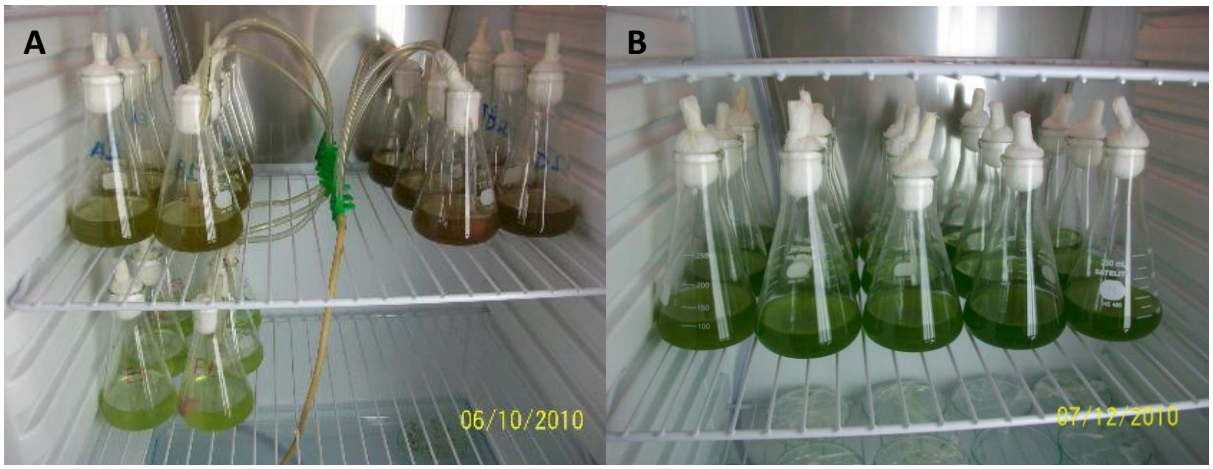

Figura 2.1: A- Foto do experimento para verificar a interferência da aeração. B- Foto do experimento para verificar o nutriente limitante.

Outro experimento foi realizado com a finalidade de verificar o nutriente limitante no crescimento do consórcio microalgal (Figura 2.1-B). Para isso foram incubadas quatro

triplicatas, sendo uma controle, uma utilizando uréia ($CO(NH_2)_2$) como fonte de nitrogênio, uma com fosfatos (KH_2PO_4 + K_2HPO_4) como fonte de fósforo e outra com bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) como fonte de carbono. Estes reagentes foram escolhidos, pois os mesmos podem ser utilizados como tamponante na digestão anaeróbia da vinhaça. O teste foi realizado da seguinte maneira: todos os Erlenmeyers foram incubados com as mesmas proporções de meio BBM e microalgas, sendo monitorado o crescimento algal ao longo do tempo. Após alguns dias, quando o crescimento microalgal diminuiu, foi acrescentado 0,882 $g.L^{-1}$ de $CO(NH_2)_2$, 0,175 $g.L^{-1}$ de KH_2PO_4 + 0,075 $g.L^{-1}$ de K_2HPO_4 e 2,882 $g.L^{-1}$ $NaHCO_3$, respectivamente, sendo que os dois primeiros foram baseados no meio BBM e o último na relação C:N na ordem de 9:1.

Diariamente, os Erlenmeyers eram homogeneizados para as algas entrarem em contato com o meio de cultivo, pois as mesmas sedimentavam. Além disso, os mesmos eram trocados de posição de forma que todos os Erlenmeyers recebessem igual iluminação dentro da incubadora.

Os experimentos duraram entre 10 e 20 dias cada um. O parâmetro de monitoramento para o crescimento microalgal em todos os testes foi a turbidez (turbidímetro Hanna), pois fornece uma estimativa direta de biomassa (em $g.L^{-1}$) através da correlação entre a turbidez e a biomassa seca (Toyoda *et al*., 2011). O pH também foi verificado (pH-metro Tecnal). No início e no fim de cada teste, os SST foram determinados, bem como o teor de óleos e graxas (TOG).

Para a caracterização da vinhaça digerida foram realizadas análises dos seguintes parâmetros: pH, turbidez, DQO, NT, fosfato total, cálcio e potássio. Todos os parâmetros analisados foram de acordo com o *Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005).

Concomitantemente ao experimento de esterilização foi realizado um teste onde se aumentava a temperatura gradualmente (25, 28, 38 e 42 ºC), monitorando a proporção percentual de espécies microalgais através da câmara de Neubauer. Neste teste foram utilizadas as microalgas adaptadas a vinhaça (alíquota das microalgas guardadas na geladeira), entretanto, elas estavam sendo cultivadas há cerca de 4 meses somente em meio BBM, na bancada do laboratório, a 23 ºC, com 3000 lux e fotopoeriodo de 14/8 horas claro/escuro. Assim, as

espécies iniciais de microalgas deste experimento não são as mesmas das utilizadas nos demais testes.

2.2.3 Análise dos dados

Os dados de todos os experimentos, executados em triplicata, foram coletados e analisados utilizando a Microsoft Excel. Em todas as análises de significância das médias foi aplicado o teste *t* de Student para dados pareados e variâncias iguais com auxílio da Microsoft Excel com nivel de significância de 5%.

Quando o crescimento das algas é exponencial, a quantidade de biomassa pode ser descrita pela equação 2.1:

$$X_t = X_0 e^{\mu t} \qquad \text{(Equação 2.1)}$$

Neste caso, caracterizado pela linearidade da curva de $\ln(X_t/X_0)$ contra o tempo t, a taxa de crescimento especifico (μ, d^{-1}) pode ser calculado a partir da equação 2.2.

$$\mu = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t - t_0} \qquad \text{(Equação 2.2)}$$

Nestas equações, X_t e X_0 são as concentraçãos de biomassa algal, obtida pela turbidez (UNT) no tempo t e t_0 (dias), respectivamente. No entanto, após algum tempo o crescimento geralmente não mais é exponencial (Zwietering *et al.*, 1990). Neste caso, uma taxa de crescimento específico máximo ($\mu_{máx.}$, d^{-1}) pode ser estimada pela regressão exponencial da fase logarítmica da curva de crescimento celular (Zhao *et al*., 2011; Rosa *et al*. 2011). Uma outra aproximação para quantificar a taxa de crescimento pode ser encontrada utilizando o modelo de Gompertz. Como alguns experimentos não seguem o crescimento exponencial, uma análise das taxas de crescimento conforme o modelo de Gompertz (Zwietering *et al.*, 1990) também foi realizado. Neste caso, a taxa de crescimento pode ser obtida realizando uma adaptação da curva da Equação 2.3 aos dados experimentais, ajustando os parametros X_{max} (concentração maxima da biomassa, $g.L^{-1}$), μ_{max} (taxa de crescimento maximo, $g.L^{-1}.d^{-1}$) e □ (tempo do fase *lag*, d):

$$X_t = X_{\max} e^{-e^{\left[\frac{\mu e}{X_{\max}}(\lambda - t)+1\right]}} \qquad \text{(Equação 2.3)}$$

A diferença em unidades faz que a taxa de crescimento conforme a Equação 2.3 não pode ser comparada diretamente com a taxa de crescimento especifico obtida a partir da Equação 2.2. Aproximadamente $\mu_{gompertz}$ pode ser descrito na Equação 2.4.

$$\mu_{gompertz} = \frac{\mu e}{X_{\max}} \qquad \text{(Equação 2,4)}$$

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Identificação de microalgas

Da amostra cultivada, encontraram-se no mínimo cinco táxons de microalgas, todos pertencentes à ordem Chlorococcales, sendo eles: *Chlorella sp*. (um táxon) pertencente à família Oocystaceae*; Desmodesmus sp*. (dois táxons) e *Scenedesmus sp*. (dois táxons) ambos pertencentes à família Scenedesmaceae. A proporção destas espécies foi de aproximadamente 97, 2 e 1%, respectivamente.

2.3.2 Testes com microalgas

A análise dos resultados de medições de sólidos suspensos totais (SST) e turbidez para uma ampla quantidade de amostras dos testes com microalgas mostraram que existe uma correlação linear entre os dois parâmetros (Figura 2.2). Assim, usando esta relação empírica, a turbidez das soluções dos Erlenmeyers pode ser usada para determinar a concentração de algas, sem utilizar métodos destrutivos, como o método para determinação de sólidos suspensos totais (SST).

A primeira série de experimentos indicou que não há diferença significativa entre a utilização do meio de cultivo BBM esterilizado (μ_{max} = 0,27 d^{-1}) e não esterilizado (μ_{max} = 0,24 d^{-1}). Com isso, os demais testes foram realizados em meio de cultivo não esterilizado, visto que o objetivo desta pesquisa é o cultivo com o efluente de um reator anaeróbio, com grande quantidade de microrganismos presente, e que aplicação do método de esterilização em grande escala, pode inviabilizar o processo.

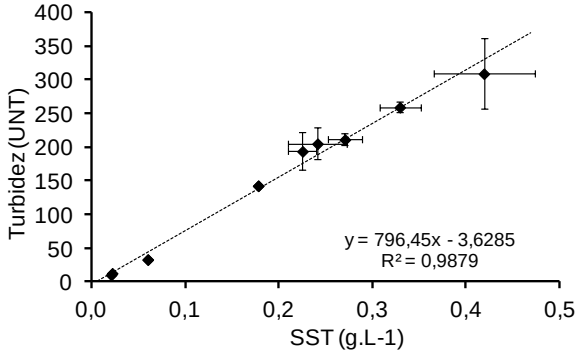

Figura 2.2: Correlação entre turbidez e SST.

O pH onde as algas são cultivadas, não afetou seu crescimento nestas faixas testadas, pois as taxas de crescimento no meio BBM não mostram diferenças significativas para valores de pH entre 6 e 7,5 (Figura 2.3-A). A taxa de crescimento médio (exponencial) para essa faixa de pH foi de 0,418±0,02 d^{-1}. Na triplicata onde não foi aplicado tampão (controle), o pH chegou a valores em torno de 10,0 (Figura 2.3-B), sem mostrar interferência no crescimento das algas. Essa elevação do pH ocorreu em todos os experimentos que não se utilizaram tampão. O aumento do pH ocorre pelo consumo de gás carbônico e/ou íons bicarbonato (HCO_3^-) e, conseqüentemente, consumo de íons H^+ pelas células das microalgas durante a fotossíntese (Rodríguez-Maroto *et al*. 2005; Chi *et al*., 2011). O pKa de HCO_3^- em água doce a 25 ºC e 1 atm é de aproximadamente 10,33, sendo que, desta forma, o ácido/base do par bicarbonato/carbonato pode agir como um tampão forte em torno deste pH (Chi *et al*., 2011). Segundo Larsdotter (2006), o pH depende da forma em que o carbono inorgânico (CO_2, HCO_3^- e CO_3^{2-}), encontra-se na solução.

Na digestão anaeróbia da vinhaça, o pH tende a cair para valores baixos para permitir a metanogênese completa (van Haandel, 2005). A implicação desta observação é que, após a separação das algas do seu meio de cultivo, a reciclagem desse meio para o reator anaeróbio em vez da reciclagem para o fotobiorreator, pode ser uma forma viável e barata de aumentar a alcalinidade no reator anaeróbio tratando a vinhaça neste esquema integrado. Com isso, pode-se diminuir gastos com tamponantes, como o bicarbonato de sódio e uréia, comumente utilizados na digestão anaeróbia da vinhaça.

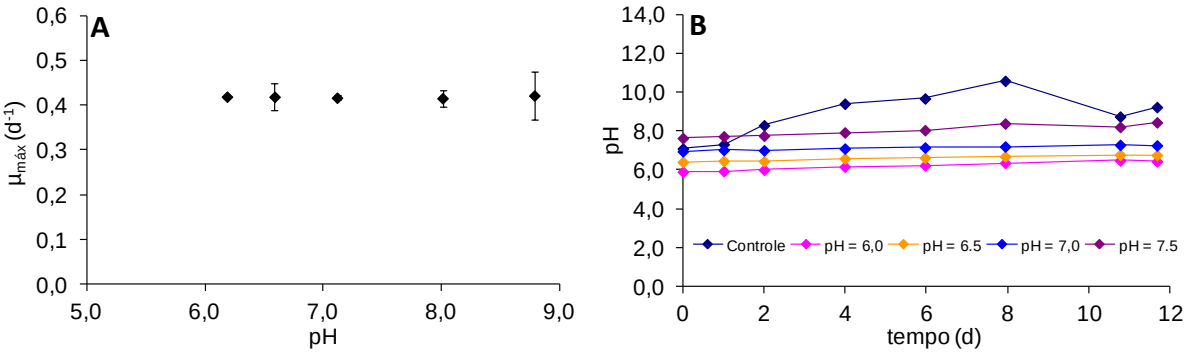

Figura 2.3: A- Taxa máxima de crescimento ($\mu_{máx}$) em diferentes pH. B-pH durante o teste.

Por outro lado, a temperatura na qual as microalgas são cultivadas tem um forte efeito no crescimento (exponencial), mostrando que as microalgas analisadas preferem crescer em temperaturas em torno de 30 °C ($\mu_{máx}$= 0,49 d^{-1}), significativamente diferente de 23 e 35 °C. Além disso, observou-se um declínio da taxa de crescimento específico máximo com o aumento da temperatura (Figura 2.4-A). Entretanto, pode-se ter subestimado a temperatura ótima visto que cada temperatura analisada era mantida constante durante todo o tempo e sabe-se que, na realidade, existe variação de temperatura ao longo do dia, sendo que à noite elas são bem mais baixas.

Até 40°C, as microalgas conseguem se desenvolver normalmente (Figura 2.4-B). Quando a temperatura se eleva para 45°C (linha laranjada), parte das microalgas morreram no início do teste, entretanto, as espécies que resistiram conseguem se desenvolver a essa temperatura, apresentando taxa de crescimento de 0,18 d^{-1}. Já a uma temperatura de 50°C as microalgas não conseguem se desenvolver, atingindo uma taxas de crescimento aproximadamente nula (0,014 d^{-1}).

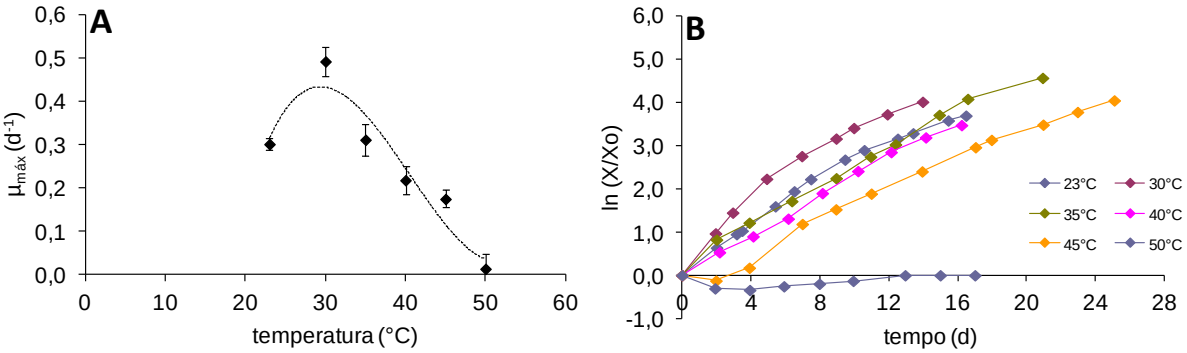

Figura 2.4: A- Taxa máxima de crescimento ($\mu_{máx}$) em diferentes temperaturas. B-Representação logarítmica do crescimento das microalgas em diferentes temperaturas.

Estes resultados são confirmados pelos resultados de Guedes *et al*. (2011), onde avaliaram os efeitos da temperatura e do pH no crescimento da microalga *Scenedesmus obliquus*. Os autores também concluíram que a temperatura desempenha um papel mais importante sobre a taxa máxima de crescimento do que o pH, onde a maior taxa de crescimento da biomassa (0,29 dia^{-1}) foi obtida em pH de 6,0 e temperatura de 30 °C. Isso significa que um grande cuidado com o fotobiorreator (Capítulo 3) deve ser tomado, em relação à dissipação de calor eficiente ou de arrefecimento, visto que o superaquecimento pode facilmente ocorrer.

A vinhaça digerida anaerobiamente por reator anaeróbio demonstra ser um bom suprimento de nutrientes para o cultivo de microalgas. Entretanto, encontraram-se dificuldades em se encontrar a real taxa de crescimento específico visto que o mesmo não segue crescimento exponencial (Figura 2.5-A), ao contrário dos experimentos controles (sem vinhaça digerida). As características da vinhaça digerida utilizada neste teste foram: pH de 7,12, turbidez de 326 UNT, DQO de 1220 $mgDQO.L^{-1}$, nitrogênio total de 76 $mgNT.L^{-1}$, fosfato total de 46 $mgPO_4^{3-}.L^{-1}$, além de 52 $mg.L^{-1}$ de cálcio.

Ao se calcular μ_t utilizando os dados do $\ln(X/X_0)$ desde o inicio do experimento (t=0) até o tempo = t (Figura 2.5-B), pode-se observar que a taxa de crescimento diminui ao longo do tempo quando se utilizam vinhaça digerida e que, em torno do dia 7, as taxas de crescimento começam a se manter iguais as do controle, que tem uma taxa de crescimento constante (crescimento realmente exponencial). Isto implica que a vinhaça digerida tem algum componente que favorece um crescimento rápido das algas nos primeiros dias, enquanto que, no controle, o crescimento tem taxa constante. Experimentos mais detalhados serão realizados com a finalidade de investigar e estudar estes componentes.

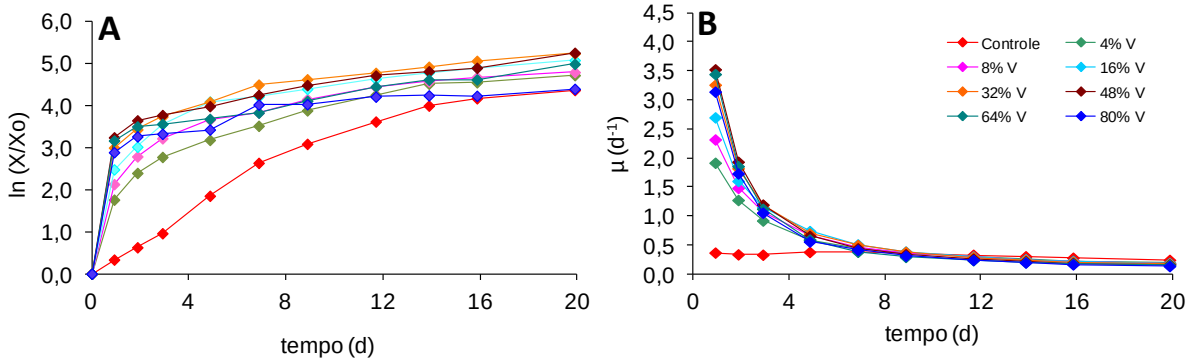

Figura 2.5: A- Representação do crescimento exponencial em diferentes diluições de vinhaça digerida; Vinhaça digerida (V). B- Taxa específica de crescimento ao longo do tempo.

As microalgas podem ser cultivadas em meio contendo vinhaça digerida, onde, assumindo crescimento exponencial, a maior taxa de crescimento foi obtida em uma concentração de 48% (v/v), apresentando $\mu_{máx}$ de 1,93 d^{-1} (Figura 2.6-A). Já pelo modelo de Gompertz, esta taxa é bem menor, sendo que a concentração ótima da vinhaça é de 32% (v/v) com $\mu_{máx}$ de 0,18 d^{-1} (Figura 2.6-B). Este melhor crescimento com vinhaça digerida pode ter ocorrido pelo fato da vinhaça possuir nutrientes essenciais ao crescimento microalgal como nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, entre outros. Em meios com concentrações maiores de vinhaça, a taxa de crescimento começa diminuir, podendo-se atribuir este fato ao aumento da turbidez no meio, impedindo a passagem de luz solar, proporcionada pela matéria orgânica remanescente contida na vinhaça digerida. Entretanto, o crescimento (exponencial) ainda ocorre em diluições menores e é superior ao controle. A taxa de crescimento, utilizando-se vinhaça digerida em uma concentração de 80%, ainda pode ser considerada boa ($\mu_{máx}$=1,73 d^{-1}), enquanto que, pelo Gompertz, a partir de 60% de vinhaça, sua utilização é insatisfatória, visto que crescimento é menor que o controle.

Admitindo-se crescimento exponencial neste experimento, foram encontradas taxas maiores de crescimento se comparadas com as encontradas por Wang *et al*. (2009), onde cultivaram *Chlorella* sp. a 25±2 °C, com iluminação continua de 200 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$ e com 100 rpm de agitação, usando quatro tipos de efluentes de uma ETE: antes da decantação primária, depois da decantação primária, depois do tanque de lodos ativados e após a centrifugação do lodo. As taxas de crescimento específico obtidos foram de 0,412, 0,429, 0,343 e 0,948 d^{-1}, baseado também em crescimento exponencial, enquanto a remoção de fosfato chegou a 83,2, 90,6, 4,69 e 85,6% e de nitrogênio total a 68,4, 68,5, 50,8 e 82,8%, respectivamente.

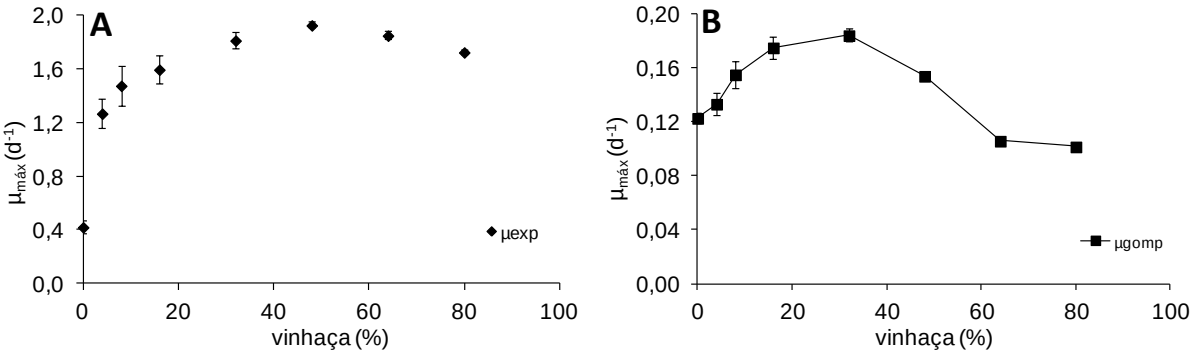

Figura 2.6: A-Taxa crescimento exponencial (μ_{exp}) em diferentes concentrações de vinhaça digerida. B-Taxa crescimento por Gompertz (μ_{gomp}) em diferentes concentrações de vinhaça digerida.

Já pelo modelo Logistic modificado, Travieso *et al*. (2006) encontraram taxa de crescimento de 1,20 d^{-1} em 800 mgDQO.L^{-1}, ao cultivarem *Chlorella vulgaris* com efluente de suinocultura (341 mgNT.L^{-1}, 419 mgPO_3^{-4}.L^{-1}, 10189 mgDQO.L^{-1} e pH = 6,0), em frascos de 1 litro, em luz natural (0,60-0,75 W.cm^{-2}.d^{-1}), com temperaturas variando de 27 a 32 °C durante o dia e 21 a 25 °C durante à noite, em diluições de 250, 400, 520, 650, 800 e 1100 mgDQO.L^{-1}.

Verifica-se que os testes com vinhaça digerida apresentaram uma elevação no pH para valores acima de 9,0 já nos primeiros dias (Figura 2.7-B) ao contrário do teste controle. Isto ocorre possivelmente devido ao consumo pelas microalgas do bicarbonato de sódio presente na vinhaça digerida, utilizado como tamponante durante o processo da digestão anaeróbia. Pode-se verificar também que em concentrações mais baixas de vinhaça, o pH é relativamente mais elevado do que em concentrações mais altas, nos primeiros dias. Isto pode acontecer pelo fato da conversão em biomassa algal ser mais rápida em concentrações menores de vinhaça. Nos últimos dias de teste, todas as diluições apresentam pH em torno de 10, reforçando a idéia da possível utilização desse líquido para o fornecimento de alcalinidade em reatores anaeróbios.

A partir da Figura 2.7-B pode-se verificar que não houveram diferenças significativas entre os testes com e sem esterilização, tanto para crescimento exponencial como por Gompertz, exceto para 20% com µ exponencial. Isto é favorável ao cultivo de microalgas com vinhaça digerida por reator UASB, visto que a mesma não irá dispor de sistemas de esterilização constante antes do cultivo contínuo.

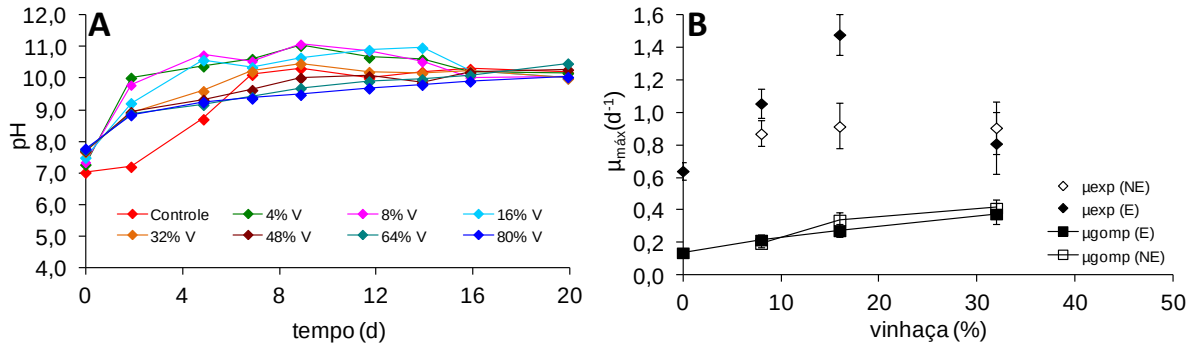

Figura 2.7: A- pH durante o teste; Vinhaça digerida (V). B- Taxa de crescimento em diferentes concentrações de vinhaça para verificar a influência da esterilização; Taxa de crescimento exponencial (μ_{exp}); Taxa de crescimento por Gompertz (μ_{gomp}); Esterilizado (E) e Não Esterilizado (NE).

A aeração também não interfere significativamente no cultivo de microalgas, ao se utilizar a vinhaça digerida diluída, para crescimento exponencial e Gompertz (Figura 2.8-A). Entretanto, sem o uso da vinhaça, a aeração faz diferença. Isto pode acontecer pela presença de bicarbonato de sódio na vinhaça digerida, fornecendo CO_2 suficiente para as microalgas, reduzindo a necessidade de uma fonte externa de (gás) carbono como a aeração. Isto se torna vantajoso do ponto de vista econômico, pois não demandaria energia para promover a aeração. Entretanto, um estudo mais aprofundado deve ser realizado para verificar se é mais viável a utilização de bicarbonato de sódio na digestão anaeróbia para posterior cultivo de microalgas ou injetar CO_2 diretamente no cultivo, visto que este último é gerado em excesso em destilarias de etanol, podendo ser reaproveitado. Jiménez *et al*. (1995) estudou o efeito da aeração em cultivos de *Dunaliella viridis* com e sem adição de bicarbonato, e constataram que a aeração não contribuiu para aumentar a concentração de carbono inorgânico total na solução devido à alta concentração de bicarbonato já presente.

Com o experimento para verificação do nutriente limitante para o cultivo desse consórcio microalgal (Figura 2.8-B), pode-se concluir que o bicarbonato de sódio (0,27 d^{-1}) interfere muito mais no crescimento microalgal do que a uréia (0,15 d^{-1}) e os fosfatados (0,10 d^{-1}). Sem a adição de nenhum nutriente, a taxa de crescimento ficou em torno de 0,15 d^{-1}. Nos fosfatados, a taxa de crescimento reduziu, sendo comprovada pelo declínio do pH, enquanto que, nos demais, o pH não foi alterado significativamente, encontrando-se em torno de 10,0.

A partir desses resultados conclui-se também que o principal contribuinte para o crescimento microalgal nos testes com vinhaça digerida anaerobiamente foi o bicarbonato de sódio. A partir da fórmula da biomassa algal ($C_{106}H_{181}O_{45}N_{16}P$) descrita por Christenson & Sims (2011), pode-se verificar que as microalgas necessitam cerca de 7 vezes mais carbono do que nitrogênio, sendo este o limitante do crescimento. Com isso, pode-se concluir que a digestão anaeróbia da vinhaça utilizando o bicarbonato de sódio como tamponante é melhor para o subsequente cultivo de algas com o efluente produzido do que a digestão anaeróbia utilizando uréia como tamponante.

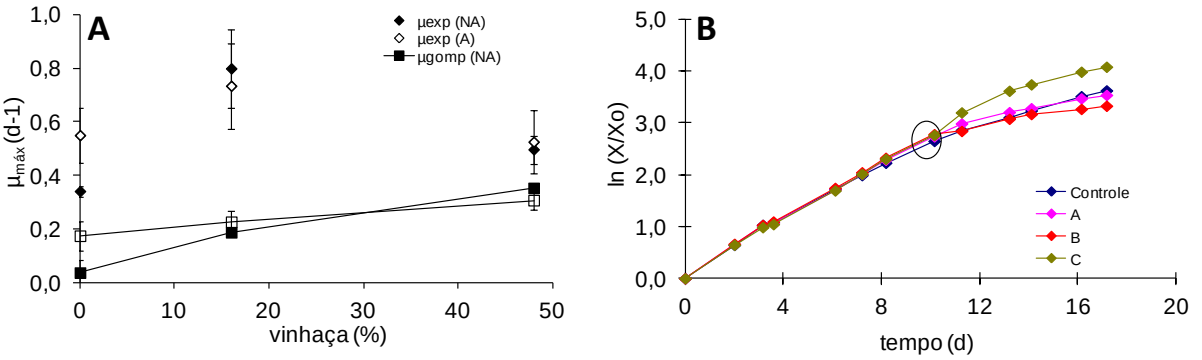

Figura 2.8: A- Taxa de crescimento em diferentes concentrações de vinhaça; Taxa de crescimento exponencial (μ_{exp}); Taxa de crescimento Gompertz (μ_{gomp}); Aerado (A); Não Aerado (NA). B- Representação do crescimento exponencial em diferentes tipos de reagentes adicionados: A ($CO(NH_2)_2$), B (KH_2PO_4+K_2HPO_4) e C ($NaHCO_3$).

Através do monitoramento das espécies microalgas em função da temperatura, pode-se observar que a proporção da microalga *Chlorella* sp. se eleva de 19,3% (em 25 ºC) para 39,8% (em 42 ºC), enquanto que as espécies de *Desmodesmus* e *Scenedesmus* 1 diminuem. Já a proporção da microalga *Scenedesmus* sp. 2 se eleva até 38 ºC, mas decai quando a temperatura aumenta para 42 ºC. Assim, pode-se concluir que a microalga *Chlorella* sp. consegue se desenvolver melhor do que as outras espécies quando a temperatura é mais elevada. Testes mais precisos deverão ser realizados, de forma que a proporção real de espécies em função da temperatura seja encontrada utilizando as mesmas microalgas aplicadas nos testes anteriores, visto que, a cultura utilizada neste teste não era mais a mesma dos testes anteriores.

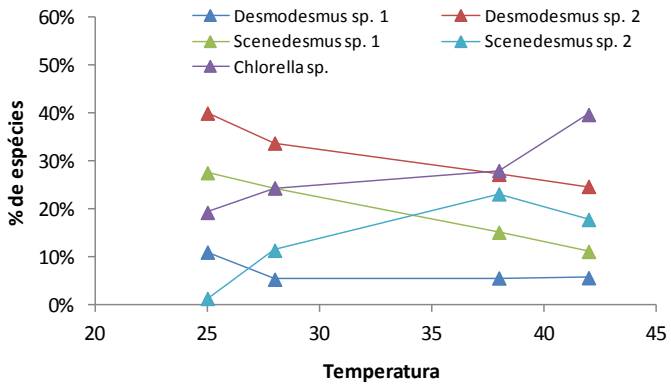

Figura 2.9: Porcentagens das espécies microalgais em função da temperatura.

2.4 Conclusão

O principal parâmetro que precisa ser controlado para otimizar o processo de produção de microalgas é a temperatura, onde a temperatura ótima de cultivo do consorcio de microalgas analisado é de aproximadamente 30°C, apresentando $\mu_{máx}$ de 0,49 d^{-1}. As microalgas ainda conseguem se desenvolver a 45 °C após adaptação, todavia, com taxa de crescimento menor, de 0,18 d^{-1}. Em temperaturas acima destas, como 50°C, não houve crescimento.

O pH, no entanto, não parece influenciar no cultivo de microalgas, pois, além dos crescimentos logarítmicos ter se mantido significativamente iguais, as taxas de crescimento máximo são iguais também.

A maior taxa de crescimento ($\mu_{máx}$) foi obtida utilizando a vinhaça digerida diluída a 48% (v/v), onde apresentou $\mu_{máx}$ de 1,93 d^{-1}, enquanto que, a uma concentração de 0 e 80% (v/v) de vinhaça digerida, foram obtidos μ_{exp} de 0,42 e 1,73 d^{-1}, admitindo-se crescimento exponencial. Entretanto, se utilizando o modelo Gompertz, os valores numericos destas taxas são bem menores, sendo que a melhor taxa de crescimento é em uma concentração de 32% (v/v) onde apresentou μ_{gomp} de 0,18 d^{-1}, enquanto que o controle foi de 0,12 d^{-1}. O principal contribuinte para isso, além dos nutrientes presentes na vinhaça digerida, pode ter sido o bicarbonato de sódio, evidenciados também nos testes de verificação do nutriente limitante. Constatou-se também que a aeração e a esterilização não influenciam significativamente em cultivos com vinhaça digerida, apresentando mais uma vantagem da utilização desse resíduo, uma vez que não haverá gastos de energia com esses processos.

2.5 Referências Bibliográficas

APHA, AWWA e WEF (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, American Public Health Association. Washington - DC, USA.

Aziz M. A. & Ng W. J. (1992). Feasibility of wastewater treatment using the activated-algae process. *Bioresource Technology*, **40**, pp. 205–208.

Barrocal, V.M., García-Cubero, M.T., González-Benito, G., Coca, M. (2010). Production of biomass by Spirulina maxima using sugar beet vinasse in growth media. *New Biotechnology*. **27** (6), pp. 851-856.

Bertoldi, F.C., Sant'anna, E., Barcelos-Oliveira, J.L. (2009). C*hlorella vulgaris* cultivated in hydroponic wastewate. *Acta Horticulturae*, **843**, pp. 203-210.

Bicudo C. E. M. & Menezes M. (2005). *Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições*. 2.ed. São Carlos: RiMa Editora, 2006. v.1. 498 p. Disponível em

http://www.scribd.com/doc/29605562/GENEROS-DE-ALGAS-DE-AGUAS-CONTINENTAIS-DO-BRASIL-2%C2%AA-edicao (acesso em 10 de novembro de 2010).

Briggs M. (2008). *Widescale Biodiesel Production from Algae*. http://www.energybulletin.net/node/2364 ultima edição: August 2004, ultimo acesso: Sept. 30, 2008.

Bruhn A., *et al*. (2011). Bioenergy potential of *Ulva lactuca*: Biomass yield, methane production and combustion. *Bioresource Technology*, **102** (3), pp. 2595-2604.

Carioca, J.O.B. & Arora, H.L. (1984). Biomassa:Fundamentos e Aplicações Tecnológicas. Fortaleza: Edição UFC. p. 644.

Chinnasamy S, Bhatnagar A, Hunt RW, Das KC. (2010). Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource Technol*; **101**, pp. 3097–105.

Chi Z., O'Fallon J.V., Chen S. (2011). Bicarbonate produced from carbon capture for algae culture. *Trends in Biotechnology*, **29** (11).

Christenson, L., Sims, R. (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*, **29** (6), pp. 686-702.

Chisti Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv*; **25**, pp. 294–306.

Collet P., *et al*. (2011). Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production. *Bioresource Technology*, **102** (1), pp. 207-214.

Döll, M.M.R. & Foresti, E. (2010). Effect of the sodium bicarbonate in the treatment of vinasse in AnSBBR operated at 55 and 35°C. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*; **15** (3), pp. 275-282.

Fox, R. D. (1996). *Spirulina: production & potencial*. Edisud, Aix-en-Provence, p. 38.

Guedes, A.C., Amaro, H.M., Pereira, R.D., Malcata, F.X. (2011). Effects of temperature and pH on growth and antioxidant content of the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Biotechnology Progress*, **27** (5), pp. 1218-1224.

González C., Marciniak J., Villaverde S., León C., Muñoz P. A. (2008). Efficient nutrient removal from swine manure in a tubular biofilm photo-bioreactor using algae-bacteria consortia. *Water Science & Technology*, **58** (1), pp 95–102.

Hammouda, O., Gaber, A., Abdel-Raouf, N. (1994). Microalgae and wastewater treatment. *Ecotoxicol. Environ*. **31**, pp. 205–210.

Kebede-Westhead E., Pizarro C., Mulbry W. W. (2006). Treatment of swine manure effluent using freshwater algae: Production, nutrient recovery, and elemental composition of algal biomass at four effluent loading rates. *Journal of Applied Phycology*, **18**, p. 41-46.

Jiménez, C., Mercado J., J. Aguilera, J.M. Rodríguez-Maroto, F.X. Niell (1995). Effect of turbulence and inorganic carbon supply on growth of *Dunaliella viridis* Teodoresco. *Int. J. Salt Lake Res.*, **4** , pp. 223–232.

Larsdotte, K. (2006). Wastewater treatment with microalgae – a literature review. *Vatten*, **62**, pp. 31–38.

Lim, S.-L., Chu, W.-L., Phang, S.-M. (2010). Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. *Bioresource Technology*, **101** (19) , pp. 7314-7322.

Mulbry W., *et al.* (2008). Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: Algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers. *Bioresource Technology*, **99**, pp. 8137-8142.

Nichols H.W. (1973). Growth media–freshwater, J. Stein, Editor, *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 7–24.

Oncel, S.S., Imamoglu, E., Gunerken, E., Sukan, F.V. (2011). Comparison of different cultivation modes and light intensities using mono-cultures and co-cultures of *Haematococcus pluvialis* and *Chlorella zofingiensi*s. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **86** (3) , pp. 414-420.

Rai L. C., *et al.* (2000). Services of Algae to the environment. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **10** (2), pp. 119-136.

Rodríguez-Maroto J. M., Jiménez C., Aguilera J., Niell F. X. (2005). Air bubbling results in carbon loss during microalgal cultivation in bicarbonate-enriched media: experimental data and process modeling. *Aquacultural Engineering*, **32** (3-4), pp. 493-508.

Rosa, A.P.C.D., Carvalho, L.F., Goldbeck, L., Costa, J.A.V. (2011). Carbon dioxide fixation by microalgae cultivated in open bioreactors. *Energy Conversion and Management*, **52** (8-9) , pp. 3071-3073.

Sakai, N.; Sakamoto, Y.; Kishimoto, N.; Chihara, M.; Karube, I. (1995). *Chlolrella* strains from hot spring tolerant to high temperature and high CO2. *Energ Convers Manage*, **16**, pp. 693 – 696.

Sheehan J., *et al.* (1998). *A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program—Biodiesel from Algae*. National Renewable Energy Laboratory. Golden, CO: p.328.(NREL/TP-580-24190).

Tarlan E., Dilek, F. B., Yetis, U. (2002). Effectiveness of algae in the treatment of a wood-based pulp and paper industry wastewater. *Bioresource Technology*, **84**, pp. 1–5.

Toyoda, K., Gishi, M. and Ihara, I. (2011). Effect of light quality and nutrients on growth of hydrocarbon-rich microalgae, Botryococcus braunii. *Acta Horticulturae*, **907**, pp. 255-258.

Travieso, L., Benítez, F., Sánchez, E., Borja, R., Martín, A., Colmenarejo, M.F. (2006). Batch mixed culture of Chlorella vulgaris using settled and diluted piggery waste. *Ecological Engineering*, **28** (2) , pp. 158-165.

Travieso L., F. Benítez, E. Sánchez, R. Borja, M. León, F. Raposo and B. Rincóna (2008). Performance of a Laboratory-scale Microalgae Pond for Secondary. Treatment of Distillery Wastewaters. *Chem. Biochem. Eng*., **22** (4), 467–473.

van Haandel A. C. e Lettinga G. (1994). *Tratamento anaeróbio de esgotos: um manual para regiões de clima quente*. EPGRAF. Campina Grande - PB, Brasil.

van Haandel A. C. (2005). Integrated energy production and reduction of environmental impact at alcohol distillery plants. *Water Science and Technology*, **52** (1-2), 49-57.

Verstraete W., *et al.* (2010) *The techno-economical potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae*. 12th World Congress on Anaerobic Digestion. Guadalajara, MX: IWA. oct. 31 - nov. 4, 9 p.

Wang L, Min M, Li Y, Chen P, Chen Y, Liu Y, et al. (2009). Cultivation of green algae Chlorella sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Appl Biochem Biotechnol*; **162** (4), pp. 1174-1186.

Wijffels R. H. e Barbosa M. J. G. D. V. (2010). An Outlook on Microalgal Biofuels. *Science*, **329**, pp. 796-799.

Yang, C.F., Ding, Z.Y., Zhang, K.C. (2008). Growth of Chlorella pyrenoidosa in wastewater from cassava ethanol fermentation. *World J Microbiol Biotechnol*, **24** (12), pp. 2919-2925.

Zamalloa C., *et al.* (2011). The techno-economic potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae. *Bioresource Technology*, **102** (2), pp. 1149-1158.

Zhao, B., Zhang, Y., Xiong, K., Zhang, Z., Hao, X., Liu, T. (2011). Effect of cultivation mode on microalgal growth and CO_2 fixation. *Chemical Engineering Research and Design*, **89** (9) , pp. 1758-1762.

Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, **56** (6) , pp. 1875-1881.

3 Cultivo de microalgas em fotobiorreator, testes iniciais

Resumo

A produção de microalgas tem se tornado cada vez mais atrativa para a obtenção de produtos de interesse energético como os biocombustíveis, tanto na forma de hidrogênio e metano, como biodiesel. Seu cultivo pode ocorrer em reatores abertos e fechados, sendo que este último apresenta vantagens sobre o primeiro, ganhando destaque os fotobiorreatores (FBRs). Com o intuito de se produzir quantidades consideráveis de microalgas para posterior conversão em biodiesel ou biogás, foi projetado um FBR tipo *flat panel* com capacidade de 40 litros e 0,78 m^2 de área superficial, colocado ao ar livre no teto do laboratório com inclinação de 30° em sentido norte-sul, operando em bateladas e fluxo contínuo. Dados *on-line* de turbidez, temperatura (ambiente e do líquido), pH e ORP foram monitorados. Constatou-se que o principal fator que teve de ser controlado é a temperatura, sendo que mecanismos de controle foram colocados no FBR ao longo do tempo, como película de controle solar e trocador de calor. A película de controle solar conseguiu diminuir a temperatura do líquido em torno de 11,8 ºC, enquanto que o trocador de calor controlou 3 ºC. A taxa máxima de crescimento microalgal (μ_{max}) obtida foi de 0,30 d^{-1} para fluxo em batelada com trocador de calor e película de controle solar e 0, 19 d^{-1} para fluxo contínuo com vazão de 5 $L.d^{-1}$, sem trocador de calor mas com película solar.

Este capítulo foi redigido de acordo com as instruções do *Journal "Bioresource Technology*", onde uma versão modificada será submetida, após tradução para o idioma inglês.

3.1 Introdução

Atualmente, o cultivo de microalgas é considerado um processo promissor para a obtenção de produtos de grande interesse energético como os biocombustíveis (hidrogênio, metano e biodiesel), além de servir como matéria-prima para indústrias de cosméticos, alimentícias e farmacêuticas (Chisti, 2007; Scragg *et* al., 2002; Bruhn *et al.*, 2011; Collet *et al.*, 2011). Em comparação a culturas terrestres convencionais, o cultivo de microalgas apresenta vantagens devido ao crescimento rápido das mesmas (Carvalho *et al*., 2011) e por não demandar terra arável, não competindo com a produção de alimentos. Além disso, não necessita de grandes quantidades de água doce para seu cultivo, pois as mesmas podem ser cultivadas em águas salinas e resíduos domésticos e industriais (Walker *et al*., 2005; Wang *et al*., 2009; Wiley *et al*., 2011).

O cultivo de microalgas pode acontecer em diversos tipos de reatores de distintas formas e tamanhos. Entre os mais utilizados, existem os reatores fechados como os fotobiorreatores (FBR's), que podem ser tubulares ou de telas planas (*flat panels*), feitos de vidro, acrílico ou plástico, projetados para melhor captação da luz; e reatores abertos, como os *raceways*, feitos normalmente de concreto, muito utilizados na produção industrial de microalgas. Os *raceways* possuem uma operação mais barata, entretanto, os FBRs alcançam uma quantidade de biomassa microalgal cerca 30 vezes superior à quantidade obtido nos *raceways*, além de permitir melhor controle do meio de cultivo (pH, temperatura, etc.), enquanto os *raceways* sofrem altas taxas de evaporação e possível contaminação (Chisti, 2007; Christenson & Sims, 2011). Assim, a utilização dos FBRs torna-se mais viável economicamente.

Jorquera *et al*. (2010) analisaram o ciclo de vida energético da produção de biomassa microalgal de *Nannochloropsis* sp. em reatores *raceways* e fotobiorreatores tubular e *flat panel*. Os autores constataram que o FBR tubular não é viável economicamente, pois apresentou uma razão líquida de energia (quociente da energia produzida pela energia requerida para a produção de biomassa) inferior a 1,0, enquanto que, nos demais reatores, esta razão foi superior a 1,0.

Scragg *et al*. (2002) avaliaram o crescimento de *Chlorella vulgaris* e *Chlorella emersoniiem* em fotobiorreatores tubulares de 230 L, em meio de cultura Watanabe normal e com baixo teor de nitrogênio, a 25 °C, intensidade luminosa de 76 $\mu mol.m^{-2}.s^{-1}$, com 16/8 horas de

luz/escuro e agitação de 60 rpm. Os autores obtiveram uma taxa máxima de crescimento de 0,40 d^{-1} e 0,38 d^{-1} em meio de cultura normal e 0,69 d^{-1} e 0,38 d^{-1} em meio de cultura com baixo teor de nitrogênio para *Chlorella vulgaris* e *Chlorella emersoniiem*, respectivamente.

Para que o processo de produção de microalgas seja aprimorado, o desenho do FBR deve considerar o transporte de gases, tanto para a entrada do CO_2, como para a saída do O_2, além de prever fatores como a temperatura interna, pH e iluminação (Chisti, 2007; Kunjapur & Eldridge, 2010).

Um dos principais parâmetros que devem ser controlados em FBRs ao ar livre é a temperatura, pois estes têm tendência ao superaquecimento, especialmente no verão, devido à irradiação forte e alta temperatura ambiente (Converti *et al*., 2009; Goetz *et al*., 2011). Em um fotobiorreator desenvolvido por Goetz *et al*. (2011), tipo *flat panel* com área de superfície iluminada de 0,33 m^2 e um volume total de 4,5 L, a temperatura chegou em aproximadamente 55 °C. Converti *et al*. (2009) estudaram o efeito da temperatura (20, 25, 30 e 38 °C) na taxa de crescimento e teor de lipídios da microalga *Chlorella vulgaris*. Eles concluíram que a temperatura influencia fortemente na produção de lipídios e na taxa de crescimento máximo, onde este último foi interrompido em 38°C. Já Sakai *et al*. (1995) constataram que microalgas como *Chlorella* sp., podem suportar uma temperatura de até 42 ºC. Assim, deve-se aplicar tecnologias que controlem a temperatura em FBRs, principalmente em países como o Brasil, visto que temperaturas elevadas inibem o crescimento de microalgas. Uma das técnicas mais utilizadas para o controle da temperatura em FBRs é o resfriamento com água, seja imergindo-os diretamente em uma piscina de água ou pulverizando água sobre a superfície dos mesmos, entretanto são técnicas que encarecem o processo de produção de microalgas (Goetz *et al*., 2011).

Outro fator importante é a luz necessária para a fotossíntese das microalgas, pois a luz incidente excessiva ou insuficiente restringe o desempenho da biomassa microalgal, diminuindo seu rendimento metabólito ou fotoinibindo a reação (Carvalho *et al*., 2011).

Muitas pesquisas estão sendo realizadas de forma a aprimorar o cultivo e produção de microalgas e a utilização de efluentes industriais e domésticos no cultivo ganha destaque, devido à presença de nutrientes como nitrogênio, fósforo e potássio, que podem ser reaproveitados, diminuindo gastos e dando uma destinação útil a esses efluentes. Um resíduo

que pode satisfazer essa condição é a vinhaça, muito utilizada na fertirrigação, porém com elevada carga orgânica, que pode ser prejudicial ao solo e águas subterrâneas (van Haandel, 2005). Se digerida anaerobiamente, a carga orgânica da vinhaça diminui, bem como sua turbidez, e os nutrientes ainda permanecem (van Haandel & Lettinga, 1994; Döll & Foresti, 2010). Assim, esse efluente pode ser utilizado com mais eficiência no cultivo de microalgas.

Dessa forma, o presente trabalho visa o cultivo de microalgas em um fotobiorreator de 40 litros, tipo *flat panel*, disposto ao ar livre, com o intuito de produzir a máxima concentração de microalgas possíveis para posteriormente ser convertida em biodiesel ou biogás. Em testes preliminares, como é o caso do presente trabalho, o cultivo será realizado com meio de cultivo padrão (BBM) de forma a realizar adequações no FBR. Futuramente será utilizada a vinhaça anaerobiamente digerida como meio de cultivo, continuando a pesquisa.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Construção do fotobiorreator

O fotobiorreator, tipo *flat panel* ou tela plana, foi projetado em acrílico com dimensões de 1,20 m x 0,65 m x 0,05 m, resultando em 0,78 m^2 de área superficial e volume de aproximadamente 40 litros. No topo do FBR foi instalado um separador de biomassa e sobrenadante (tanque de sedimentação) com dimensões aproximadas de 0,10 cm x 0,65 cm x 0,10 cm e volume útil de cerca de 3 litros. O FBR foi colocado no teto do LABE (Laboratório de Efluentes) da UFMS (Universidade Federal de Mato Grosso do Sul), em Campo Grande-MS, com inclinação de 30° para o norte. Uma bomba de recirculação com vazão de 1200 $L.d^{-1}$ (SarloBetter SB 80, São Caetano do Sul - SP, Brasil) foi instalado para manter o conteúdo do reator homogeneizado. O fluxo do líquido foi ascensional, onde o afluente entra na parte inferior e o efluente sai na parte superior. Na parte inferior, 13 injetores de gás permitem a injeção de gás CO_2 (de um cilindro; White Martins, Campo Grande-MS, Brasil) ou ar comprimido (por meio de um compressor de ar de aquário), para suprir a demanda de CO_2 e retirar o oxigênio produzido por meio de *stripping*. Sensores de pH (Provitec, São Paulo-SP, Brasil), temperatura ambiente e do líquido, potencial de oxi-redução (ORP) (Provitec, São Paulo-SP, Brasil) e um turbidímetro *on-line* (Dr Lange GmbH, Berlin, Alemanha) foram instalados na linha de recirculação do FBR e monitorados *online* através do *softwere* Guardian 1.3 (Boncz *et al.* 2008). Foi utilizado um radiador e uma bomba de recirculação com capacidade de 150 $L.h^{-1}$, para controlar a temperatura.

Uma placa plana de acrílico, com 2 mm de espessura, foi colocado paralelamente a 5 cm da área superficial do FBR para servir de suporte para o emprego de uma película de controle solar. Um esquema do reator é apresentado na Figura 3.1, fotos do reator encontram-se no Capítulo 5 (Figura 5.1-A, B, C, D, E e F.).

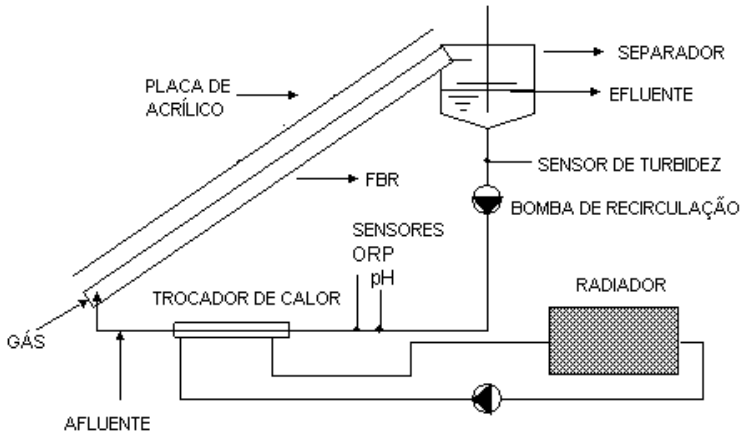

Figura 3.1: Representação esquemática do reator e equipamentos usados

3.2.2 As microalgas

O consórcio de microalgas foi coletado na lagoa de armazenamento de uma usina de açúcar e álcool (foto anexada), situada perto da cidade de Sidrolândia-MS, diretamente na superfície da lagoa, próxima à margem, em frascos de polietileno. O consórcio era composto por *Chlorella* sp. (97%), *Desmodesmus* sp. (2%) *e Scenedesmus* sp. (1%), coletadas em uma lagoa de armazenamento de vinhaça, visto que as espécies são adaptadas a este efluente.

3.2.3 Testes com películas de controle solar

Baseado no princípio de que as películas de controle solar são utilizadas para atenuar a luminosidade e o calor em automóveis, devido ao bloqueio parcial de raios infravermelhos (Insulfilm™, 2011), foram realizados testes para verificar em qual tipo de película, o crescimento microalgal é melhor, para colocá-la, posteriormente, na placa plana de acrílico paralela ao FBR.

Em frascos Winkler de 300 mL foi adicionada uma solução composta de meio de cultivo BBM (90%) e microalgas (10%). Ao redor de cada frasco foi colocado um envoltório de plástico com a película estudada, distantes cerca de cinco cm do frasco (Figura 1.0). Os frascos foram dispostos em luz solar, no sentido norte-sul. Foi analisado um frasco sem

película (controle) e os demais com as seguintes películas: azul espelhada 10% (de visibilidade), verde espelhada 15%, prata espelhada 20% grafite espelhada 20 e 10%, todos da marca "*sun control*". O crescimento microalgal foi monitorado através da turbidez (turbidímetro Hanna), pois fornece uma estimativa indireta de biomassa ($g.L^{-1}$), através da correlação entre a turbidez e a biomassa seca (Toyoda *et al*., 2011), como também descrita no Capítulo 2 desta dissertação. Foi realizada análise de nitrogênio total e filtrado em amostras do FBR de acordo com *Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2005).

3.2.4 Partida do FBR

Inicialmente, para ajuste no FBR, este foi operado em batelada, onde utilizou se água da torneira. Posteriormente foi colocado meio de cultivo BBM (Nichols, 1973) e cerca de 100 mL de solução estoque de microalgas. A partir dos dados monitorados *on-line*, foram realizadas adequações no FBR de forma a controlar a temperatura, principal problema encontrado, sendo que, uma delas foi a adição da película azul espelhada (10% de visibilidade) na placa plana de acrílico paralela ao FBR, da marca "*sun control*", no 12º dia.

3.2.5 FBR operado em batelada e contínuo

O FBR foi inoculado novamente e o mesmo operou em batelada até as microalgas atingirem seu crescimento máximo ou pararem de crescer exponencialmente. Depois, o FBR foi operado continuamente com afluente composto de meio BBM diluído em água da torneira, armazenado em uma geladeira (4±1 °C) e bombeado por uma bomba peristáltica. O efluente também era armazenado na mesma geladeira. A vazão afluente inicial foi de aproximadamente 5 $L.d^{-1}$, equivalendo a um TDH de 8 dias. O FBR funcionava 13 horas por dia (das 6 às 19 horas), controlado por um *timer* digital. No 44º dia foi colocado um trocador de calor no FBR, pois os dispositivos de controle de temperatura presentes não foram suficientes.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Testes com películas de controle solar

As taxas máximas de crescimento ($\mu_{máx}$) para as películas azul espelhada 10%, verde espelhada 15%, prata espelhada 20%, grafite espelhada 10%, grafite espelhada 20% e controle foram de 0,53, -0,11, -0,04, 0,27, 0,21 e -0,17 d^{-1}, respectivamente. A Figura 3.2 apresenta o

crescimento logarítmico das microalgas com diferentes películas. Como se pode observar, a película que obteve o melhor desempenho foi a azul espelhada 10%. Sem película (controle) houve morte das microalgas, fato atribuído à temperatura excessiva, atenuada pela película nos demais testes.

Segundo Carvalho *et al*. (2011), cerca de metade do que é fotossinteticamente útil no espectro solar (400-700 nm) é utilizado no crescimento de microalgas e as faixas do espectro mais eficientes para a fotossíntese compreende a luz azul (420-450 nm) e a luz vermelha (660-700 nm), confirmando o melhor desempenho da película azul.

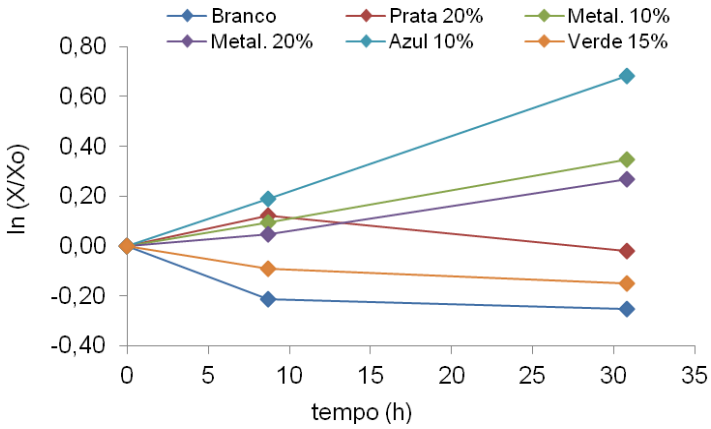

Figura 3.2: Representação do crescimento exponencial utilizando diferentes películas de controle solar

3.3.2 Partida do FBR

Na Figura 3.3, encontra-se o monitoramento *on-line* de temperatura e turbidez. Em I, a bomba de recirculação estava desligada, então o líquido não passava pelo turbidímetro. O crescimento observado pode ser devido ao líquido contido no turbidímetro e não no FBR.

Em II, com a bomba de recirculação ligada, a temperatura média do líquido foi de 56,2 ± 1,9 °C, enquanto que a turbidez média foi 12,9 ± 0,4 UNT, não detectando crescimento microalgal. Sheng *et al*. (2011) constataram que temperaturas acima de 44 °C inibem fortemente a taxa de crescimento específico (diminuição de até 66 %), a taxa de produção de biomassa (diminuição de até 71 %), as taxas de utilização de nutrientes (decréscimo de até 77 %) e taxa de produção de lípidos (decréscimo de até 80 %) da microalga *Synechocystis sp* cultivadas em FBR de 16 litros.

Já em III, quando foi colocada a película azul espelhada, baseado nos resultados do item 3.4.1, a temperatura média monitorada do líquido foi de 44,4 ± 1,7 °C, implicando que a película de controle solar conseguiu reduzir a temperatura do liquido em em média 11,8 °C, aumentando a turbidez média para 24,1 ± 0,6 UNT. Isto se deve pelo fato da película conseguir refletir parte dos raios infravermelhos, responsáveis pelo aumento da temperatura. No dia 14,3 ocorreu um problema no FBR e o mesmo esvaziou-se, sendo inoculado novamente (Item 3.4.3).

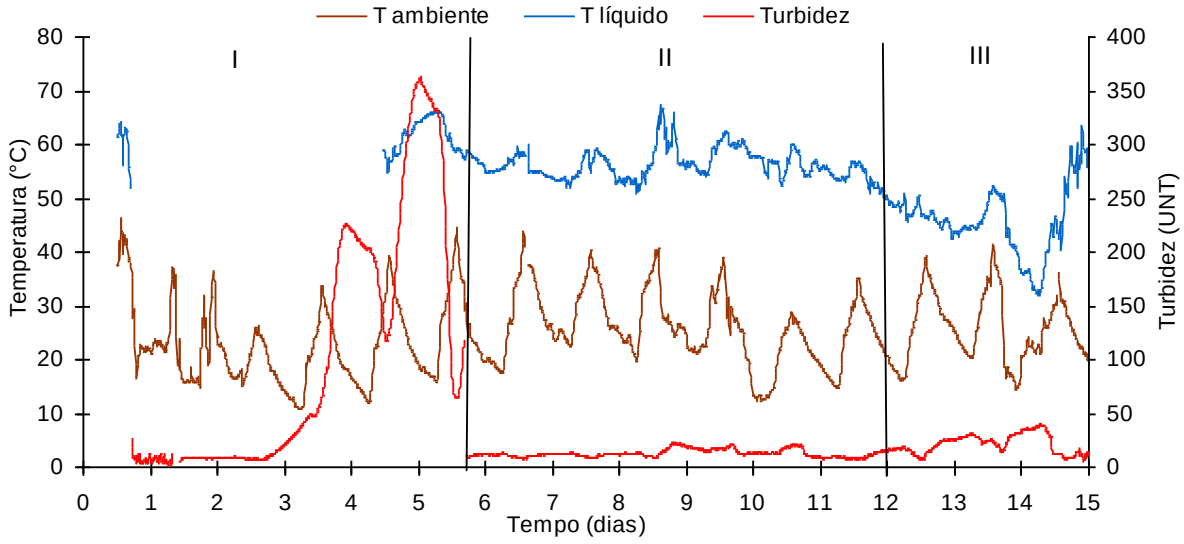

Figura 3.3: Resultados do monitoramento *on-line* de temperatura e turbidez.

3.3.3 FBR operado em batelada e contínuo

Após a nova inoculação, o FBR operou em batelada, em I, conforme a Figura 3.4, onde apresentou máximo de 385 UNT. Entretanto, quando o sistema operou continuamente, em II, a turbidez diminuiu (medição *on-line*), em média, para 30 ± 27 UNT, onde se constatou que o tempo de duplicação microalgal não foi suficiente para uma produção constante de microalgas. Entretanto, a partir das medições *off-line* pode-se verificar por volta do dia 13,5 que a cultura começa a se desenvolver, mesmo operando continuamente e com temperaturas máximas em torno de 45 °C, apresentando uma taxa máxima de crescimento de 0,19 d^{-1} (entre 13,5 e 21,7 dias). A partir destes resultados começou a verificar as causas das discrepâncias entre as medições de turbidez *on-line* e *off-line*.

Em III, o sistema retornou a operar em batelada, devido à análise dos resultados *on-line* que apresentavam o decaimento da turbidez. Entre os dias 36 e 44 não houve medições *on-line* de nenhum parâmetro devido a um problema no computador.

Em IV foi colocado o trocador de calor, conseguindo controlar até 3 ºC (média de 31 ± 5 ºC). Observou-se também que houve diferenças entre a turbidez medida *on-line* e a *off-line*. Isto pode ter ocorrido devido à formação de espuma dentro do turbidímetro, apresentando resultados que não representaram a realidade. Devido este fato, em IV, ponto A, o turbidímetro foi mudado de posição, ocorrendo uma mudança abrupta na turbidez. Baseado na turbidez *off-line*, a taxa máxima de crescimento exponencial ($\mu_{máx}$) obtida foi de 0,30 d^{-1} (durante o período de 45,8 a 53,7 dias), onde a média das temperaturas máximas para este período foram de 40 ± 4 °C. Até o 58º dia, a cultura cresceu até 139 UNT, entretanto a mesma iniciou a fase de morte das microalgas. Este fato não pode ser atribuído à temperatura visto que a mesma manteve-se praticamente constante, antes e depois da morte das microalgas. A possível causa pode ser a falta de CO_2 visto que ainda existia nitrogênio no meio de cultivo, cerca de 10 mgNT.L^{-1} e, conforme os resultados obtidos nos testes do Capítulo 2 (Figura 2.8), pode-se verificar que os compostos carbonatados limitam muito mais o crescimento do que o nitrogênio. Pode-se observar também que a cultura se desenvolveu mesmo com as temperaturas máximas terem atingido 43 °C.

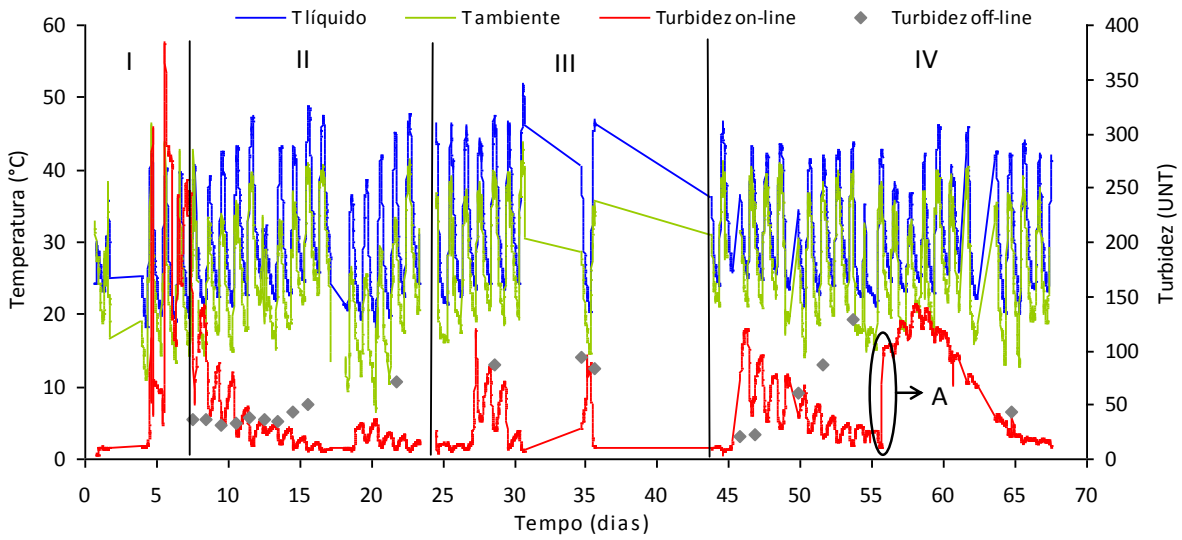

Figura 3.4: Resultados monitoramento *on-line* de turbidez e temperatura ambiente e do líquido e *off-line* de turbidez.

As medições de turbidez alcançadas no FBR não atenderam o esperado, pois, baseado nos testes do Capítulo 2, em condições controladas, a turbidez chegou a 1100 UNT em 20 dias, em experimentos com Erlenmeyers de 250 mL cultivando microalgas em meio de cultivo BBM, o mesmo utilizado neste teste. Entretanto, a taxa de crescimento máximo (0,19 d^{-1} para contínuo e 0,30 d^{-1} para batelada) não é tão inferior a dos encontrados nos testes do Capítulo 2, onde variou de 0,35 a 0,64 d^{-1} cultivando também em meio BBM.

Com os resultados obtidos até aqui, conclui-se que algo pode estar limitando o crescimento microalgal, onde os principais fatores que podem ser responsáveis por isso são o nutriente limitante ou o excesso de luz devido à espessura do FBR. Para isso, a pesquisa será continuada com o intuito de verificar essa causa e aprimorar o cultivo. Como os testes realizados são preliminares, ainda se encontram muitas barreiras quanto ao cultivo de microalgas em FBRs, principalmente operacionais, que ainda serão estudas para alcançar resultados satisfatórios de cultivo de microalgas em FBRs e, posteriormente, espera-se utilizar a vinhaça digerida anaerobiamente como meio de cultivo, visto que os resultados obtidos nos testes em condições controladas (Capitulo 2) foram satisfatórios.

3.4 Conclusão

O principal fator que influencia e deve ser controlado em FBRs colocado no ar livre e recebendo iluminação solar é a temperatura. Mecanismos de controle foram colocados no FBR para isto, como película de controle solar e trocador de calor com bomba de recirculação. A película de controle solar conseguiu controlar a temperatura do líquido em torno de 11,8 ºC, enquanto que o trocador de calor reduziu a temperatura em mais 3 ºC. Entretanto, a aplicabilidade de alguns desses dispositivos de controle de temperatura em escala real pode ser limitada pelas despesas com energia para bombeamento e ventilação e, por isso, alternativas mais econômicas devem ser testadas no FBR. O uso da película solar pode ser uma alternativa, porém deve ser combinada com outro método como, por exemplo, o aumento da espessura do FBR.

Através das medições *off-line* de turbidez, a taxa máxima de crescimento microalgal exponencial (μ_{max}) foi de 0,30 d^{-1} para fluxo em batelada com película de controle solar e trocador de calor e 0, 19 d^{-1} para fluxo contínuo com vazão de 5 $L.d^{-1}$, com película solar, sem trocador de calor.

3.5 Referências Bibliográficas

APHA, AWWA e WEF (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, American Public Health Association. Washington - DC, USA.

Boncz, M. Á., Bezerra, L. P., Ide, C. N. e Paulo, P. L. (2008). Optimisation of biogas production from anaerobic digestion of agro-industrial waste streams in Brazil. *Water Science and Technology*, **58** (8), pp. 1659-1664.

Bruhn A., *et al*. (2011). Bioenergy potential of *Ulva lactuca*: Biomass yield, methane production and combustion. *Bioresource Technology*, **102** (3), pp. 2595-2604.

Carvalho A. P., Silva S. O., Baptista J.M., Xavier Malcata F. (2011). Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. *Appl Microbiol Biotechnol*, **89**, pp. 1275–1288.

Chisti Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv.*, **25**, pp. 294–306.

Christenson, L., Sims, R. (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*, **29** (6), pp. 686-702.

Collet P., *et al*. (2011). Life-cycle assessment of microalgae culture coupled to biogas production. *Bioresource Technology*, **102** (1), pp. 207-214.

Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P., Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of Nannochloropsis oculata and Chlorella vulgaris for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, **48** (6), pp. 1146-1151.

Döll, M.M.R. & Foresti, E. (2010). Effect of the sodium bicarbonate in the treatment of vinasse in AnSBBR operated at 55 and 35°C. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*; **15** (3), pp. 275-282.

Goetz, V., Le Borgne, F., Pruvost, J., Plantard, G., Legrand, J. (2011). A generic temperature model for solar photobioreactors. *Chemical Engineering Journal* , **175** (1), pp. 443-449.

Insulfilm (2011). Eficiência do Insulfilm™. http://www.insulfilmautomotivo.com.br/eficienciainsulfilm (acessado em 9 de dezembro de 2011).

Kunjapur, A.M., Eldridge, R.B. (2010) Photobioreactor design for commercial biofuel production from microalgae. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, **49** (8), pp. 3516-3526.

Sakai, N.; Sakamoto, Y.; Kishimoto, N.; Chihara, M.; Karube, I. (1995). *Chlolrella* strains from hot spring tolerant to high temperature and high CO2. *Energ Convers Manage*, **16**, pp. 693 – 696.

Scragg, A. H.; Illman, A. M.; Crden, A.; Shales, S. W. (2002). Growth of microalgae with increased calorifi c values in a tubular bioreactor. *Biomass e Bioenergy*, **23**, pp. 67-73.

Sheng, J., Kim, H.W., Badalamenti, J.P., Zhou, C., Sridharakrishnan, S., Krajmalnik-Brown, R., Rittmann, B.E., Vannela, R. (2011). Effects of temperature shifts on growth rate and lipid characteristics of *Synechocystis sp*. PCC6803 in a bench-top photobioreactor. *Bioresource Technology*, **102** (24) , pp. 11218-11225.

van Haandel A. C. e Lettinga G. (1994). *Tratamento anaeróbio de esgotos: um manual para regiões de clima quente*. EPGRAF. Campina Grande - PB, Brasil.

Walker, T.L., Purton, S., Becker, D.K., Collet, C. (2005). Microalgae as bioreactors. *Plant Cell Reports*, **24** (11), pp. 629-641.

Wang L, Min M, Li Y, Chen P, Chen Y, Liu Y, et al. (2009). Cultivation of green algae Chlorella sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Appl Biochem Biotechnol*; **162** (4), pp. 1174-1186.

Wiley, P.E., Campbell, J.E., McKuin, B. (2011). Production of Biodiesel and Biogas from Algae: A Review of Process Train Options. *Water Environment Research*, **83** (4), pp. 326-338.

Carvalho A. P., Silva S. O., Baptista J.M., Xavier Malcata F. (2011). Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. *Appl Microbiol Biotechnol*, **89**, pp. 1275–1288.

Nichols H.W. (1973). Growth media–freshwater, J. Stein, Editor, *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 7–24.

Toyoda, K., Gishi, M. and Ihara, I. (2011). Effect of light quality and nutrients on growth of hydrocarbon-rich microalgae, Botryococcus braunii. *Acta Horticulturae*, **907**, pp. 255-258.

van Haandel A. C. (2005). Integrated energy production and reduction of environmental impact at alcohol distillery plants. *Water Science and Technology*, **52** (1-2), 49-57.

4 Conclusões gerais e recomendações

4.1 Testes sem vinhaça

O principal parâmetro que precisa ser controlado para otimizar o processo de produção de microalgas é a temperatura, evidenciado tanto nos testes em condições controladas (Capítulo 2), como nos testes com o FBR disposto ao ar livre (Capítulo 3). A temperatura ótima de cultivo do consórcio de microalgas analisado (Capítulo 2) é de aproximadamente 30°C, apresentando $\mu_{máx}$ de 0,49 d^{-1}, enquanto que elas ainda conseguem se desenvolver a 45 °C após adaptação, porém, com taxa de crescimento inferior (0,18 d^{-1}). Já nos testes com o FBR, o mesmo consórcio de microalgas apresentou taxas de crescimento de 0,30 d^{-1}, com temperatura média e máxima atingindo 31 e 40 °C, respectivamente. Esta taxa de crescimento no FBR foi maior possivelmente pela adaptação das microalgas e pela variação de temperatura durante o dia e noite, enquanto que nos testes em Erlenmeyers, a temperatura era mantida constante. O uso da película de controle solar no FBR apresentou-se como uma boa alternativa para diminuir a temperatura do líquido, controlando até 11,8 °C.

O pH, no entanto, não parece influenciar na taxa de crescimento das microalgas na faixa de pH de 6,0 a 8,5 e, além disso, observou-se a tendência do meio em elevar o pH no decorrer do tempo, devido ao consumo de gás carbônico e/ou íons bicarbonato pelas células das microalgas. Isto pode ser vantajoso, pois após a separação das algas do seu meio de cultivo, a reciclagem desse meio pode servir como alcalinizante para o reator anaeróbio fornecendo a vinhaça digerida que serve como parte do meio de cultivo, já que este processo tende a sofrer acidificação. Assim, experimentos futuros serão realizados de forma a verificar essa condição.

4.2 Testes com vinhaça

A maior taxa de crescimento ($\mu_{máx}$) foi obtida utilizando a vinhaça digerida diluída a 48% (v/v), onde apresentou $\mu_{máx}$ de 1,93 d^{-1}, enquanto que, a uma concentração de 0 e 80% (v/v) de vinhaça digerida, foram obtidos $\mu_{máx}$ de 0,42 e 1,73 d^{-1}, admitindo-se crescimento exponencial. O principal contribuinte para isso, além dos nutrientes presentes na vinhaça digerida, pode ter sido o bicarbonato de sódio. Constatou-se também que a aeração e a

esterilização não influenciam significativamente em cultivos com vinhaça digerida, apresentando mais uma vantagem da utilização desse resíduo, uma vez que não haverá gastos de energia com esses processos.

4.3 Sugestões para trabalhos futuros

Recomenda-se que experimentos mais detalhados devem ser realizados para verificar compostos que possam estimular ou inibir o crescimento microalgal e, com isso, pode-se aperfeiçoar o cultivo de microalgas, otimizando a produção de compostos que estimulem o crescimento.

Recomenda-se também que se investigue o porquê que as microalgas não atingem uma turbidez elevada no FBR como atingem nos testes em condições controladas, se é pela falta de CO_2 ou fotoinibição.

E por fim, aperfeiçoar o método de Gompertz e Logistic para estimar a taxa máxima de crescimento de microalgas utilizando vinhaça digerida anaerobiamente como meio de cultivo.

Anexo 1

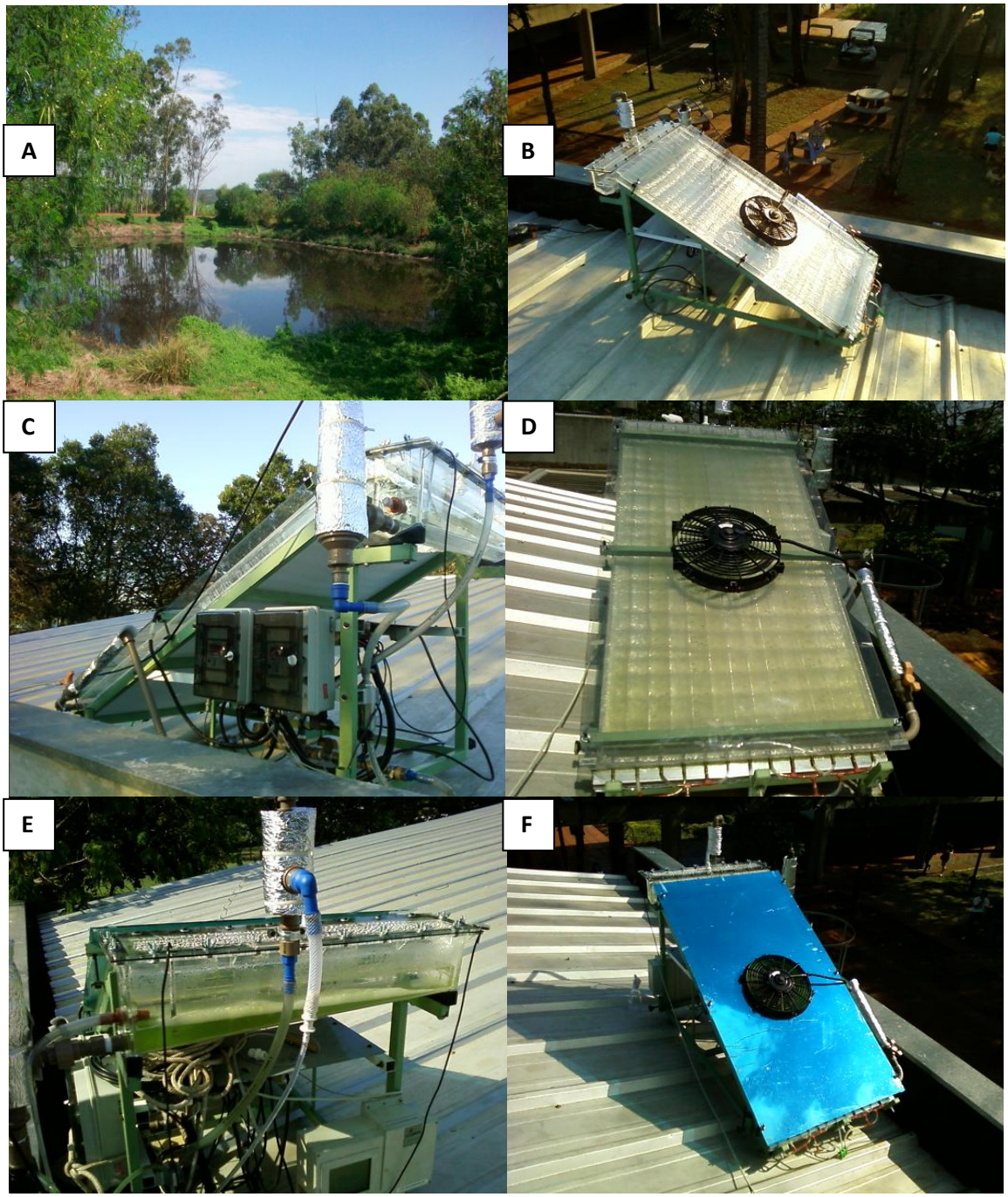

Figura 0.1: A- Foto da lagoa de armazenamento de vinhaça onde a amostra foi coletada. B, C, D, E e F – Fotos do FBR.