

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS  
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO

ANA LUISA ESCORZA DA SILVA

**Avaliação do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* em fotobioreator  
contínuo do tipo “flat-panel” alimentado com vinhaça, meio WC e meio WC  
enriquecido com glicerol**

VERSÃO CORRIGIDA  
SÃO CARLOS  
2015



ANA LUISA ESCORZA DA SILVA

Avaliação do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* em fotobioreator contínuo do tipo “flat-panel” alimentado com vinhaça, meio WC e meio WC enriquecido com glicerol

Trabalho de graduação apresentado ao  
Departamento de Hidráulica e Saneamento  
da Escola de Engenharia de São Carlos da  
Universidade de São Paulo para obtenção  
do título de Bacharel em Engenharia  
Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Penalva  
Reali

Co-orientador: Gabriel Dibbern Sacchi

SÃO CARLOS  
2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,  
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS  
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

S586a      Silva, Ana Luisa Escorza da  
                 Avaliação do crescimento da microalga Chlorella  
                 vulgaris em fotobioreator contínuo do tipo "flat  
                 panel" alimentado com vinhaça, meio WC e meio WC  
                 enriquecido com glicerol. / Ana Luisa Escorza da Silva;  
                 orientador Marco Antônio Penalva Reali; coorientador  
                 Gabriel Dibbern Sacchi. São Carlos, 2015.

Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) --  
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de  
São Paulo, 2015.

1. Chlorella vulgaris. 2. Fotobioreator. 3.  
Microalga. 4. Meio padrão WC. 5. Vinhaça. I. Título.

# FOLHA DE JULGAMENTO

---

Candidato(a): Ana Luisa Escorza da Silva

Data da Defesa: 30/10/2015

Comissão Julgadora:

Resultado:

Marco Antonio Penalva Reali (Orientador(a))

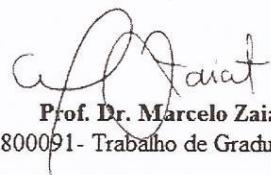
Aprovada

Mirna Helena Regali Seleg him

Aprovada

Eloá Cristina Figueirinha Pelegrino

Aprovada



Prof. Dr. Marcelo Zaiat  
Coordenador da Disciplina 1800091 - Trabalho de Graduação



*Dedico este trabalho aos meus pais José Luís e Pepita, por todo amor, carinho e incentivo ao estudo e também ao meu irmão Gustavo pelo amor e companheirismo.*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, José Luís e Pepita, e meu irmão, Gustavo, e meus tios Célia e Alexandre, e também toda família, por todo amor, apoio, paciência e suporte, tanto na vida pessoal quanto em minha formação superior, porque sem eles isso tudo não seria possível.

Agradeço também ao meu orientador, o professor Marco Antônio Penalva Reali, pela oportunidade de pesquisa e todo conhecimento repassado na iniciação e graduação.

Ao Gabriel Dibbern Sacchi, por toda assistência, paciência, infinitas explicações e pelo compartilhamento de sua pesquisa.

À Andressa Bichara, pelos ensinamentos, assistência em biologia e também compartilhamento da pesquisa.

Ao Rodrigo Vieira, por toda ajuda, tanto em análises da pesquisa até na limpeza dos fotobiorreatores.

À todos os pesquisadores, técnicos e funcionários do LATAR, Teresa, Gabriel, Andressa, Eloá, Gabi, Thalita, Guilherme, Paulo, Priscila, Karen, Rodrigo, pelo companheirismo, ajuda e convivência durante todo o ano.

Ao Alcino pelo conhecimento, ajuda e disponibilidade em momentos de falhas técnicas, nos mais diversos horários.

Aos membros da banca, professora Mirna Helena Regali Seleghim e Eloá Cristina Figueirinha Pelegrino, pelas contribuições desde o desenvolvimento da pesquisa.

À Fapesp, que contribuiu diretamente com a infraestrutura do projeto.

À todos os professores e funcionários da Engenharia Ambiental e à Universidade de São Paulo, pelo apoio, conhecimento, ensino e oportunidades.

À todos os amigos da Engenharia da Odebrecht Ambiental, Gian, Anelisa, Euvaldo, Milena, Evelise, Hércules, André, Luís, Reynaldo, Palini e Steven pela compreensão e contribuições no trabalho.

À todos os amigos de São Carlos e da Ambiental 010, em especial Paty, Ana Carol, Lost, João, Paula, Nina e Naty, pelos longos seis anos de curso, amizade, moradia, companheirismos, ensinamentos, ajuda e muito estudo em conjunto.

Aos meus amigos de Atibaia, Bié, Luiza, Lauro, Caio e Evy, pelo amor intenso, amizade, suporte e muitas emoções compartilhadas.



“Não espere que teu barco chegue, nade em direção a ele.”

Samuel Johnson



## RESUMO

**SILVA, A. L. E. Avaliação do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* em fotobiorreator contínuo do tipo “flat-panel” alimentado com vinhaça, meio WC e meio WC enriquecido com glicerol.** 2015. 72p. Monografia (Bacharelado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

O interesse em cultivos controlados de microalgas cresceu significamente nos anos recentes em diversas áreas, como no tratamento de efluentes e na produção de biodiesel. O cultivo em sistemas fechados, como fotobiorreatores (FBR), apresenta maior controle sobre as variáveis como iluminação, aeração, temperatura. A microalga *Chlorella vulgaris* é uma das mais utilizadas em tratamento de águas residuárias e, havendo quantidade suficiente dos nutrientes necessários no efluente, ela consegue crescer e degradar a matéria orgânica existente. A produção de etanol a partir da cana-de-açúcar gera como resíduo a vinhaça. A cada 1 litro de etanol produzido, são gerados de 10 a 12 litros de vinhaça, que pode ser tratada por microalgas. A presente pesquisa avaliou o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* em dois fotobiorreatores de escoamento contínuo (FBRC) do tipo “flat-panel”, alimentados com: vinhaça, meio padrão WC modificado e meio padrão WC modificado com adição de glicerol. Para monitoramento das microalgas nos FBRC foram realizadas análises de clorofila-a, absorbância em comprimentos de onda específicos, OD, pH, temperatura, DQO, turbidez e densidade óptica. Na alimentação das microalgas com meio padrão nos dois FBRC, só o FBRC 2 recebia glicerol. Testou-se TDH de 7 dias (1º teste) e depois de 3,5 dias (2º teste). Foi testada também a recirculação no FBRC 2 (3º teste). Já na alimentação com vinhaça foram realizados dois testes, um com uso de vinhaça microfiltrada (1º teste) e outro com esterilização da vinhaça em autoclave variando-se o TDH (2º teste). Analisando os resultados de absorbância e clorofila-a com meio padrão, foi possível constatar que as microalgas conseguiram crescer com TDH de 3,5 dias e no meio sem glicerol. No experimento com vinhaça, as microalgas conseguiram crescer sem interferência de fungos com a esterilização da vinhaça em autoclave, porém os resultados das análises não foram constantes, apresentando instabilidades ao longo da pesquisa.

Palavras-chave: *Chlorella vulgaris*, fotobiorreator, microalga, meio padrão WC, vinhaça.



## ABSTRACT

SILVA, A. L. E. **Evaluation of the growth of microalgae *Chlorella vulgaris* in continuous flat panel photobioreactor, fed with vinasse, WC medium and WC medium enriched with glycerol.** 2015. 72 p. Dissertation (Bachelor's Degree) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

The interest in the use of controlled microalgae cultivation has grown significantly in the past years in different fields, such as wastewater treatment and biodiesel production. The growth of microalgae in closed systems, like photobioreactors, has the advantage of a better control over the variables, such as light, aeration and temperature. The microalgae *Chlorella vulgaris* is one of the most used in wastewater treatment, and with enough amount of nutrients in the effluent, they have the capacity to grow and remove organic matter. Vinasse is a residue of sugar cane in the ethanol production. For each liter of ethanol produced, 10 to 12 liter of vinasse are generated, which microalgae can treat. This research evaluates the growth of *Chlorella vulgaris* in two continuous "flat-panel" photobioreactors, fed with three different substances: vinasse, modified WC medium and modified WC medium complemented with glycerol. To monitor the algae growth in the photobioreactors, the following analysis were performed: chlorophyll-a, absorbance in specific wavelengths, dissolved oxygen, pH, temperature, COD, turbidity and optical density. At first, the feeding source of microalgae was WC medium in the two systems, but only the second system received glycerol. The retention time of 7 days (1° test) was implemented and then 3,5 days (2° test). In the second system, the recirculation was tested as well (3° test). After that, the feeding source was changed to vinasse and the research began using microfiltrated vinasse (1° test) and then the vinasse was sterilized in autoclave changing the retention time (2° test). After analyzing absorbance and chlorophyll-a results with WC medium, it was possible to note that the microalgae grew with the hydraulic retention time of 3,5 days and without glycerol. In the research with vinasse, the microalgae was able to grow without bacteria or fungi with sterilizing the vinasse in autoclave, however the results of the analyses were not constant, showing instabilities during the research.

Key words: *Chlorella vulgaris*, photobioreactor, microalgae, WC medium, vinasse.



## Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. OBJETIVOS .....	23
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	25
3.1 Microalgas .....	25
3.2 Fotobiorreatores.....	28
3.3 Glicerol.....	29
3.4 Vinhaça .....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	33
4.1 Premissas.....	33
4.2 Montagem dos Fotobiorreatores.....	34
4.3 Sistemas de Fotobiorreatores .....	35
4.4 Reservatórios de alimentação .....	39
4.5 Vazão de recalque do meio de alimentação .....	42
4.6 Limpeza dos sistemas .....	43
4.7 Pesquisa com Meio padrão WC modificado .....	43
4.7.1 Complementação de meio padrão.....	45
4.7.2 Partida dos FBRC com meio padrão WC modificado .....	46
4.7.3 Funcionamento.....	46
4.8 Pesquisa com Vinhaça .....	48
4.8.1 Primeiro teste com vinhaça .....	49
4.8.2 Segundo teste com vinhaça.....	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1 Utilização de meio padrão.....	51
5.1.1 Primeiro Teste .....	51
5.1.2 Segundo Teste.....	53
5.1.3 Terceiro Teste .....	55
5.2 Utilização de vinhaça .....	59
5.2.1 Microfiltração.....	59
5.2.2 Primeiro teste com vinhaça .....	60
5.2.3 Segundo teste com vinhaça.....	61
6. CONCLUSÃO .....	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	69



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

"	Polegadas
$\lambda$	Comprimento de onda para medir absorbância
°C	Graus Celsius
BGN	Braun-Grunow Medium
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
COD	Chemical Oxygen Demand
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
FBR	Fotobiorreatores em batelada
FBRC	Fotobiorreatores contínuos
LATAR	Laboratório de Tratamento Avançado e Reuso de Águas
LD	Limite de detecção
mg(L.d) <sup>-1</sup>	Miligramma por litro por dia
mgDBO.L <sup>-1</sup>	Miligramma de DBO por litro
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Nitrogênio Amoniacal
NTU	Unidades Nefelométricas de Turbidez
OD	Oxigênio dissolvido
pH	Potencial de hidrogênio
ppm	Parte por milhão
SST	Sólidos Suspensos Totais
t.(ha.ano) <sup>-1</sup>	Tonelada por hectare por ano
TDH	Tempo de Detenção Hidráulico
UC	Unidade de Cor
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto
W	Watt
WC	Water Culture Medium



## 1. INTRODUÇÃO

O fitoplâncton é responsável por parte do oxigênio da atmosfera e é o único produtor primário no oceano, dando suporte, junto com as algas microscópicas, ao ecossistema marinho. São consideradas microalgas as algas microscópicas, que podem ser organismos procarióticos ou eucarióticos.

No geral, as microalgas possuem diversas utilizações, como suplemento alimentar, produção de antibióticos, vitaminas, cosméticos, produção de proteínas, entre outros (BONINI, 2012). O cultivo controlado de microalgas tornou-se muito interessante para áreas como produção de biodiesel e tratamentos de águas residuárias, pois elas possuem como vantagem o crescimento sob condições simples, de baixo custo e metabolismo bastante ativo. Além disso, as microalgas incorporam à sua biomassa a matéria orgânica e nutrientes presentes em efluentes, possuindo capacidade de degradação e remoção dessas substâncias. Elas possuem pigmentos como clorofila-*a* e *b*, mas também podem armazenar óleo, sendo indicadas como matéria-prima para a produção de biocombustíveis.

A *Chlorella vulgaris* é uma microalga eucariótica unicelular, do tipo clorofícea e de água doce, e uma das mais utilizadas em tratamento de efluentes, sendo importante o conhecimento das melhores condições de seu crescimento.

Existem várias formas de cultivo de microalgas, que podem ocorrer em sistemas abertos ou fechados, desde que haja os macronutrientes necessários, como carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, e também os micronutrientes. As microalgas também necessitam de luz ou CO<sub>2</sub>. O cultivo ainda pode utilizar meios sintéticos, os quais possuem exatamente os componentes necessários para o desenvolvimento da microalga, como o meio WC (Water Culture) (GUILLARD, LORENZEN, 1972).

O cultivo de microalgas para produção de biocombustíveis também pode envolver o tratamento de um resíduo, como a vinhaça, a qual é gerada na produção do etanol. A cada 1L de etanol produzido, são gerados aproximadamente 10L de vinhaça, a qual é normalmente disposta na agricultura como fertilizante. Contudo, a utilização deste efluente como meio de cultivo para o desenvolvimento de microalgas ainda requer estudos que busquem identificar a melhor forma de cultivo, motivação para esta pesquisa.



## 2. OBJETIVOS

O objetivo da pesquisa foi avaliar se haveria o crescimento da microalga eucariótica *Chlorella vulgaris* em um sistema de fotobiorreator contínuo do tipo “flat panel” alimentado com três diferentes meios:

- Meio padrão WC, preparado conforme Guillard e Lorenzen (1972), mas sem silicato de sódio;
- Meio padrão WC, preparado conforme Guillard e Lorenzen (1972), sem silicato de sódio e com adição de glicerol;
- Vinhaça microfiltrada.

Para tal experimento, foram mantidos constante em todas as etapas o fotoperíodo, a vazão de ar fornecida ao fotobiorreator e a temperatura ambiente e do meio de cultura. Variou-se o tipo de alimentação, o tempo de detenção hidráulica (TDH), e a vazão de alimentação.

Além disso, na etapa final do experimento utilizando meio padrão WC como fonte de alimentação, foi testada a recirculação do meio em um dos fotobiorreatores.

Foram realizadas a implantação e todo acompanhamento da partida e da operação do fotobiorreator.



### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Microalgas

As microalgas são organismos microscópicos, unicelulares e constituem um grupo bastante diversificado quanto à morfologia, tamanho, cor e complexidade de estrutura. São fotossintéticos, ou seja, possuem moléculas de clorofila e habilidade de produzir oxigênio, e são constituídas de: proteínas, carboidratos, lipídios e ácido nucléicos (PEQUENO *et al*, 2012). Podem ser organismos eucarióticos, como as algas verdes, vermelhas, diatomáceas, ou procarióticos, como as cianobactérias. As microalgas eucarióticas possuem pigmentos como clorofila-*a* e *b*, β-caroteno e xantofilas, podendo acumular amido ou óleo como forma de reserva de energia, segundo sua fisiologia, que pode ser alterada para favorecer a produção de lipídeos. Ocorrem principalmente em ambiente marinho, água doce e no solo (regiões úmidas) e vivem em vida livre ou em simbiose com outros organismos. Existem somente cerca de 1000 cepas de coleções, das quais poucas são cultivadas em escala industrial (BONINI, 2012), sendo que há mais de 200.000 espécies de microalgas eucarióticas e o número exato é desconhecido, revelando o baixo número de estudos sobre esse tema (PÉREZ, 2007).

Com estrutura celular simples e grande superfície volumétrica, as microalgas absorvem grande quantidade de nutrientes. Além disso, convertem a energia solar com mais eficiência do que plantas superiores, por conta de sua estrutura simplificada. Possuem rápido crescimento e alta produtividade. Dependendo da natureza da espécie, meio de cultivo e fatores ambientais, as células das microalgas podem possuir composição bioquímica diferenciada (BONINI, 2012).

*Chlorella vulgaris* é uma alga unicelular eucariótica de água doce pertencente à classe Chlorophyceae, que foi primeiramente estabelecida em 1980 por Beijerinck e sua foto pode ser vista na Figura 1.



**Figura 1. Foto da microalga do gênero *Chlorella sp.* (extraída de PÉREZ, 2007).**

O gênero *Chlorella sp.* foi o primeiro a ser cultivado em escala comercial, no Japão na década de 60, com o intuito de ser usado como suplemento alimentar. Ainda hoje o cultivo de microalgas é feito para a alimentação humana e animal, oferecendo também a extração de compostos de elevado valor agregado, como polissacarídeos, vitaminas, carotenoides, entre outros. Outra área de interesse é a produção de biocombustíveis, como gás hidrogênio, metano, bioetanol e biodiesel, a partir de microalgas. A mitigação de problemas ambientais também pode ser feita através desses microrganismos, como o sequestro de carbono (BONINI, 2012). As microalgas podem ser alimentadas com emissões gassosas de indústrias que geram os gases de efeito estufa, diminuindo-os no ambiente, como o próprio CO<sub>2</sub>, o qual é liberado em grandes quantidades nas usinas produtoras de etanol.

Atualmente, as microalgas podem ser utilizadas no tratamento de águas residuárias, já que removem a matéria orgânica e os nutrientes dos efluentes, incorporando-os à sua biomassa, além de suas condições simples de crescimento e baixo custo.

Quanto ao cultivo de microalgas, existem quatro tipos: autotrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotoautotrófico. O cultivo autotrófico de microalgas é o mais comum, caracterizando-se pela utilização de energia solar como fonte de energia, e CO<sub>2</sub> como fonte de carbono para a realização da fotossíntese (BONINI, 2012). Já o cultivo fotoautotrófico, a luz é a única fonte de energia, ou seja, a energia luminosa é transformada em energia química devido às reações fotossintéticas (BONINI, 2012).

As microalgas, em cultivos autotróficos, precisam somente de água, nutrientes, luz e CO<sub>2</sub>. Pérez (2007) menciona um estudo feito pela empresa americana Green Fuel Technologies, em que gases de exaustão emitidos por uma usina termoelétrica foram utilizados na alimentação de microalgas em fotobiorreatores. Houve uma redução de

82,3% da concentração de CO<sub>2</sub> na exaustão em dias ensolarados e 50,1% em dias nublados.

No cultivo heterotrófico, as microalgas se desenvolvem sem a presença de luz e a partir de moléculas orgânicas solúveis, utilizando-as como fonte de carbono e energia. Substitui-se o CO<sub>2</sub> da atmosfera, utilizado em culturas autotróficas, por uma fonte de carbono orgânico solúvel, como glicose, acetato ou glicerol, que são as mais utilizadas nesse sentido. Já no cultivo mixotrófico, a fotossíntese é a principal fonte de energia, porém os microrganismos necessitam tanto de CO<sub>2</sub> como de compostos orgânicos, para respiração, em seu desenvolvimento. Em uma pesquisa feita por Bonini (2012) com cultivo mixotrófico, as microalgas apresentaram maiores valores de velocidades específicas de crescimento quando foi adicionada glicose ao meio de cultivo.

Independentemente do tipo de cultivo, os macronutrientes necessários para o crescimento das microalgas são carbono, fósforo, nitrogênio e enxofre. Geralmente, as águas residuárias agroindustriais possuem essas substâncias, sendo um meio propício para esses microrganismos e, assim, além de ser uma cultura de baixo custo, não há preocupação com subproduto ou lodo, pois as microalgas assimilam os nutrientes em sua biomassa. Desde que haja quantidade suficiente desses nutrientes necessários no meio, as microalgas conseguem crescer e degradar a matéria orgânica existente no efluente. Em um estudo feito por Feng *et al* (2011), em tratamento de água residuária sintética com intuito de produção de lipídios, foi verificada a remoção de 86% de DQO, 97% de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e 96% de fosfato total da água residuária, e produção de lipídios de 147mg(L.d)<sup>-1</sup>.

As microalgas conseguem remover nitrogênio e fósforo do meio em que estão inseridas, além de também assimilarem íons metálicos e metais pesados. Tam *et al* (2001) realizaram um estudo com a *Chlorella vulgaris*, onde o objetivo foi a remoção de níquel, e o resultado foi de 70% de remoção deste metal.

Em laboratório podem ser preparados meios sintéticos, como o meio BGN (Braun-Grunow Medium) (RIPKA *et al*, 1979) ou o meio padrão WC (Water Culture) (GUILLARD, LORENZEN, 1972). Assim, os nutrientes específicos são combinados e as microalgas podem se desenvolverem condições mais controladas.

A cianobactéria *Spirulina maxima* é encontrada em águas salgadas e largamente consumida como alimento. Ela já é comercialmente produzida e alvo de vários estudos ecológicos, fisiológicos e bioquímicos para diversas aplicações. Já em 1982, Samson e

Leduy realizaram uma pesquisa com cultivo da microalga em fotobiorreator de 130L com condições controladas. A cepa foi mantida em fotobiorreator anular de 8L, em condições nem sempre controladas. As microalgas mantidas no fotobiorreator de 8L, mesmo sem total controle das condições em que eram mantidas, continuaram crescendo, enquanto as microalgas do fotobiorreator maior não conseguiram sobreviver. Apesar da pesquisa nessa época não ter demonstrado sucesso no crescimento em larga escala, vê-se o interesse nesse tipo de cultivo há bastante tempo.

A biomassa obtida no cultivo de microalgas pode ser usada como fertilizante para o solo, aproveitamento das proteínas ou obtenção de biocombustíveis. O óleo encontrado nas microalgas é similar aos óleos vegetais por causa de suas características físico-químicas e, portanto, as microalgas são indicadas como matéria-prima de biodiesel (TEIXEIRA, 2006).

A produção de biocombustíveis é uma boa alternativa ao uso dos combustíveis fósseis e, ao contrário de estender o solo para plantação de oleaginosas, que poderia ser usado para produção de alimentos, o cultivo de microalgas necessita de pequeno espaço para crescer. Além do mais, as oleaginosas tradicionalmente utilizadas para os biocombustíveis não são a fonte mais produtiva de óleo vegetal se comparadas com o óleo produzido pelas microalgas. Segundo Pérez (2007), o rendimento de extração de óleo de soja é de 0,2 a 0,6 tonelada por hectare por ano, enquanto o rendimento das microalgas é de 50 a 150 t.(ha.ano)<sup>-1</sup>. Além do teor de óleo presente nesses microrganismos ser maior que o da soja, o óleo também possui a maior densidade de lipídeos se comparado com outras oleaginosas como canola, óleo de palma, milho e coco. Assim, pode-se extrair mais óleo vegetal por área e diminuir o custo do biocombustível (PÉREZ, 2007).

### **3.2 Fotobiorreatores**

Para o cultivo de microalgas eucarióticas podem ser utilizados sistemas abertos ou fechados, sendo os sistemas abertos representados pelas lagoas, que possuem as mesmas condições do ambiente externo, possuindo como vantagem baixos custos de instalação e operação e, ao mesmo tempo, suscetível às condições ambientais como radiação solar, temperatura e maior vulnerabilidade às contaminações. Os sistemas

fechados, por sua vez, são caracterizados pelos fotobiorreatores, que permitem o controle sobre temperatura, pH e melhores condições assépticas.

Fotobiorreatores são reatores constituídos por paredes transparentes para que haja penetração de luz, a qual pode ser artificial ou proveniente do Sol. Caso seja realizada a opção pela iluminação artificial, é possível controlar o fotoperíodo (período de exposição à luz) e a intensidade luminosa fornecida.

Uma desvantagem em relação aos sistemas abertos está no custo inicial de implantação e operação, que são mais elevados (BONINI, 2012). Contudo, a produção obtida nos sistemas fechados chega a ser de 3 a 5 vezes maior, se comparada com a produção nos sistemas abertos. Além disso, o controle das condições de cultivo garante a produção contínua de microalgas, viabilizando a produção comercial, enquanto os sistemas abertos estão suscetíveis aos fatores externos como temperatura, luminosidade e contaminação por outros microrganismos.

O fotobiorreator pode ser operado em batelada, semi-batelada, ou de forma contínua. Na primeira operação, o fotobiorreator recebe juntamente as microalgas e os nutrientes os quais são completamente removidos ao final do ciclo de operação. Na operação em semi-batelada, são realizadas remoções periódicas de microalga, e o volume retirado é reposto através da adição de meio de cultivo. Já na operação contínua, a colheita de microalgas é realizada continuamente, assim como a inserção do meio de cultura (PÉREZ, 2007).

### 3.3 Glicerol

Em meios de cultivo mixotrófico ou heterotróficos de microalgas, ao invés de fixar o CO<sub>2</sub> atmosférico, as microalgas utilizam uma fonte de carbono orgânico dissolvido no meio de cultura. A fonte de carbono pode ser glicose, acetato ou glicerol.

A substância glicerol também é conhecida como glicerina, sendo amplamente utilizada na indústria farmacêutica e alimentícia, e também em cosméticos, tabaco, fibras têxteis, fabricação de tintas e resinas, entre outros. Desde 2000, o mercado para glicerina está em crescimento, atingindo 800 mil toneladas produzidas de diversas formas, como síntese microbiana, via química e via fermentativa. Dessa produção, 10% são representados pelo glicerol com origem na produção de biodiesel advindo da

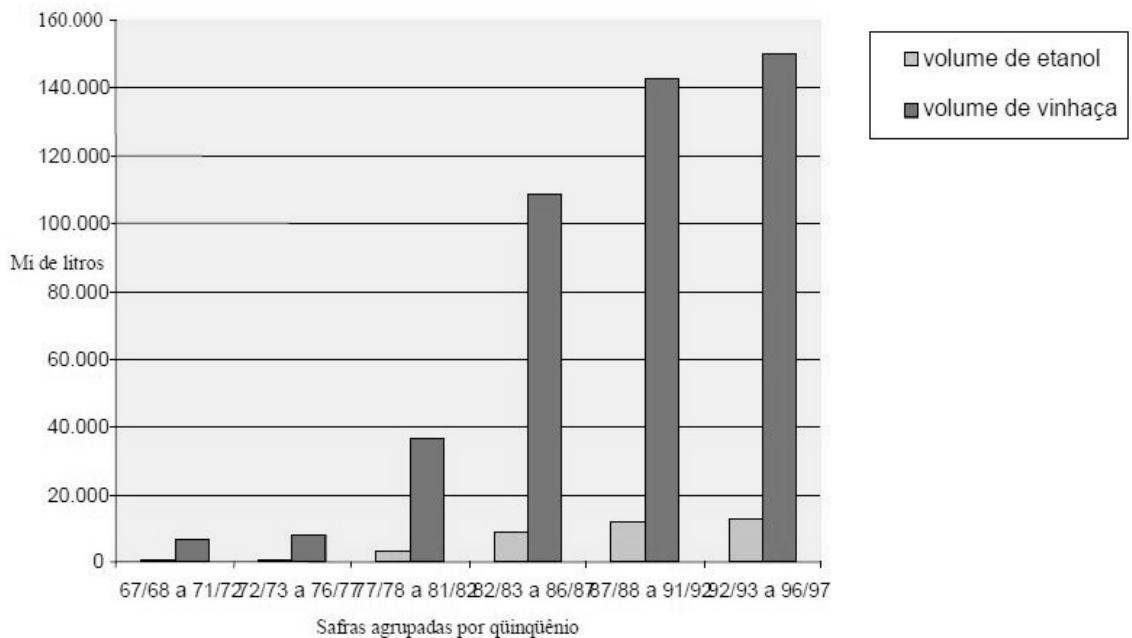
Europa e Estados Unidos. Em 2002, a produção com origem na indústria do biodiesel aumentou para 200 mil toneladas (BIODIESELBR, 2006).

Como visto, o cultivo de microalgas pode ser utilizado para a produção de biocombustíveis, como o biodiesel. Além disso, em sua produção há geração de glicerol como subproduto. Esse composto pode ser usado como fonte de carbono para o cultivo heterotrófico ou mixotrófico de microalgas, gerando um ciclo fechado e autossustentável, onde o subproduto, glicerol, da segunda etapa do processo poderia ser reaproveitado, tornando-se a fonte de alimentação das microalgas da primeira etapa.

### **3.4 Vinhaça**

A vinhaça é um efluente gerado através da destilação do vinho, que é o caldo da cana-de-açúcar fermentado, na produção de etanol, sendo que para cada litro de etanol produzido são gerados de 10 a 12 litros de vinhaça. De acordo com Pereira, Alquini e Günther (2009) a vinhaça é altamente poluente, atingindo valores até 100 vezes mais que o esgoto doméstico, pela alta quantidade de matéria orgânica e demanda bioquímica de oxigênio (DBO), variando de 20.000 a 35.000 mgDBO.L<sup>-1</sup>. Além disso, seu pH é baixo, variando de 4,5 a 5,5, possui 93% de água e altas concentrações de cálcio, nitrogênio, fósforo, magnésio (CENTURION *et al*, 1983).

Devido à crise do petróleo na década de 70, o governo brasileiro lançou o decreto nº 76.593 de 1975 criando o Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL) incentivando a produção de etanol a partir de cana-de-açúcar, mandioca ou outro insumo. Com isso, a produção no Brasil cresceu de 555 milhões de litros de etanol em 1975/76 para 17,5 bilhões de litros em 2006/07 (UNICA, 2007). Juntamente com o etanol, a produção de vinhaça também aumentou, totalizando mais de 140 bilhões de litros, como mostrado o grande impacto visual no Gráfico 1.



**Gráfico 1 - Volume produzido de etanol e vinhaça (em milhões de litros) de 1967 a 1997 no Brasil.** Gráfico construído por Laime (2011) a partir de dados do Workshop "Agroindústria Canavieira e o Novo Ambiente Institucional" (1998), Hassuda (1989) e Gloeden et al (1992).

A Portaria nº 323 do Ministério do Interior, em 1978, proibiu o lançamento direto ou indireto de vinhaça em corpos hídricos, obrigando indústrias sucroalcooleiras a apresentarem projetos de solução para uso desse passivo ambiental. Assim, várias alternativas tecnológicas surgiram para o destino e tratamento da vinhaça, como aerobiose, reciclagem na fermentação, combustão, disposição no solo, incineração, produção de levedura, utilização na construção civil, fabricação de ração animal, digestão anaeróbia, fertirrigação, entre outros. Dentre as alternativas, as mais utilizadas por seu estágio de desenvolvimento são a aerobiose, reciclagem na fermentação e fertirrigação. A aerobiose é um processo bioquímico que necessita de oxigênio para obtenção de energia por algum nutriente, como a glicose (LAIME, 2011).

A fertirrigação, solução bastante utilizada, é vantajosa porque a vinhaça possui altos valores de potássio e matéria orgânica. Porém, pelo teor elevado de DQO e pelo baixo pH, sua aplicação no solo deve ser restritiva e controlada (BONINI, 2012). Glória (1984) afirma que mesmo tendo baixo pH, a vinhaça corrige a acidez do solo, aumenta a capacidade de troca catiônica do mesmo e é um fertilizante de alta qualidade. Segundo Vieira (1986), fertirrigação ocorre quando utiliza-se a água de irrigação para transportar o adubo orgânico ou químico na plantação, juntando-se os processos de

irrigação e adubaçāo. Ou seja, desde que aplicada uma quantidade adequada, a vinhaça não prejudica o solo, e sim aumenta a atividade microbiológica acelerando a sua decomposição. Ao adotar o uso de fertilizante por vinhaça, há uma redução de custos na produção agrícola, que pode reduzir o problema ambiental da disposição da vinhaça, mas não ser mais vantajoso economicamente pelo alto valor no transporte de grandes volumes de um líquido.

A norma P4.231 de 2006 da CETESB regulamenta a aplicāo da vinhaça no solo no estado de São Paulo. A dosagem de vinhaça a ser aplicada deve ser calculada levando em consideração a profundidade e fertilidade do solo, concentração de potássio na vinhaça e extração média desse elemento por cultura.

Em caso de dosagens excessivas, em que não é respeitada a capacidade de absorção e neutralização da vinhaça no solo, a aplicāo da vinhaça é desvantajosa. E, além do solo, as águas subterrâneas também podem ser contaminadas, podendo prejudicar o fornecimento de água potável.

Outras soluções disponíveis para tratamento da vinhaça são a conversão da matéria orgânica da vinhaça em metano e biodigestão anaeróbica objetivando a produção de energia.

São poucos os estudos sobre tratamento de vinhaça utilizando-a como fonte de alimentação para microrganismos. No Laboratório de Tratamento Avançado e Reuso de Águas (LATAR), da Universidade de São Paulo, estão sendo conduzidos vários estudos sobre o tema. Na pesquisa de Oliveira e Cáceres (1986), na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), os cultivos de *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus bijugatus* desenvolveram-se melhor em solução de vinhaça do que em meio sintético, havendo maior concentração celular.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Premissas

O projeto foi realizado em parceria com a mestrandona Andressa Bichara<sup>1</sup> e com o doutorando Gabriel Dibbern Sacchi<sup>2</sup> e possuiu como base dois sistemas de fotobiorreatores contínuos (FBRC) do tipo “flat-panel” separados e independentes, cada um com quatro unidades em série, implantados no Laboratório de Tratamento Avançado e Reuso de Águas (LATAR) do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC-USP. A infraestrutura utilizada nos reatores foi confeccionada segundo Samson e Leduy (1985) com algumas adaptações. Foram alimentados com meio padrão WC, porém sem silicato de sódio, sendo designado neste trabalho como meio padrão WC modificado, segundo testes de Bichara (2014) e, posteriormente, com vinhaça tratada físico-quimicamente e diluída em água, conforme testes realizados por Sacchi (2015).

Os dois sistemas de FBRC possuíam variáveis iguais, como fotoperíodo, vazão de ar e temperatura. A diferença entre os dois sistemas, na primeira parte do estudo, foi a adição da substância glicerol no meio padrão de um deles. Na Figura 2, pode-se observar um esquema da pesquisa com meio padrão.

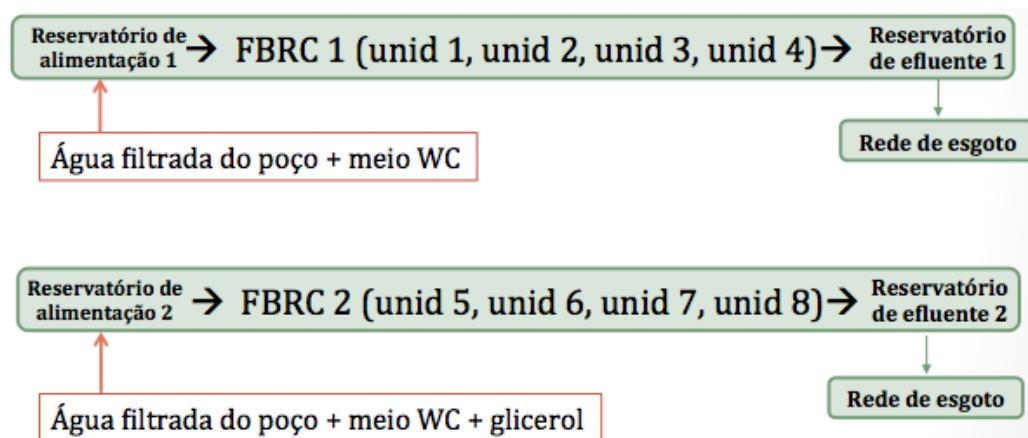


Figura 2 - Esquema da pesquisa com meio padrão utilizado como fonte de alimentação. "Unid" são as unidades de cada FBRC.

<sup>1</sup>BICHARA, A. Tratamento de vinhaça por processos físico-químicos de precipitação química, e flotação e sua utilização como meio de cultivo para a microalga de potencial energético, *Chlorella vulgaris*. 152 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

<sup>2</sup> SACCHI, G. D. Flotação por ar dissolvido aplicado à separação de microalgas cultivadas em fotobiorreator, alimentado com vinhaça pré-tratada físico-quimicamente, com vistas à exploração de seu potencial bioenergético. Tese (Doutorado) a ser defendida - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Depois foi feita a segunda parte da pesquisa, alimentando os FBRC com vinhaça, tendo seu esquema representado na Figura 3.

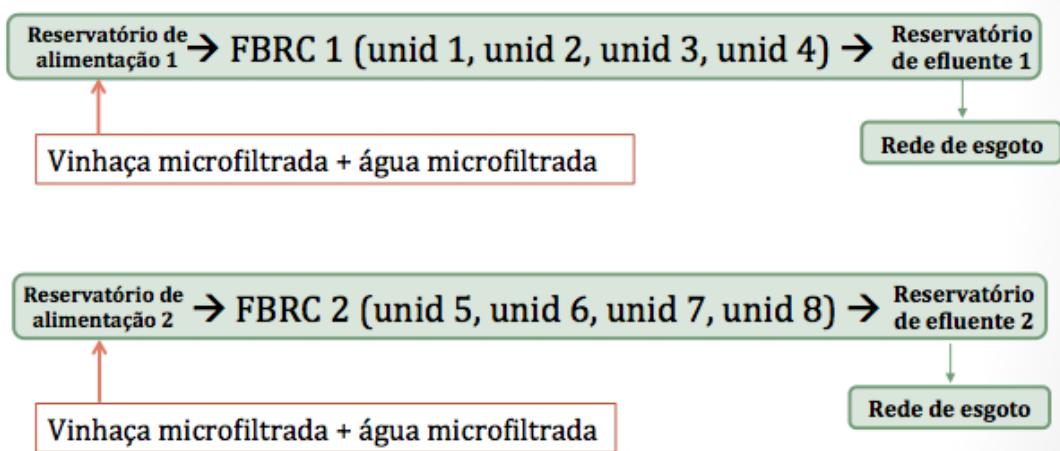


Figura 3 - Esquema da pesquisa usando vinhaça microfiltrada como fonte de alimentação. "Unid" representa cada unidade de cada FBRC.

Cada FBRC possuía seu próprio sistema de refrigeração, aquecimento, aeração e iluminação. Foi definido o estudo do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (clone 097), que foi obtida do departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). O inóculo obtido não era axênico, ou seja, não estava totalmente livre de bactérias.

O inóculo foi mantido em laboratório em fotobiorreator (FBR) de bancada e operação em batelada de 2 litros. Para evitar contaminações, a replicação do inóculo era feita em sala especial em condições assépticas, com câmara de fluxo laminar e bico de Bunsen para esterilização. A aeração era feita por ar comprimido que passava por uma válvula reguladora de pressão e por um sistema de tripla filtração, com diâmetro de 0,2 µm, deixando o ar com qualidade medicinal.

Durante a operação do FBR em batelada identificou-se que havia um consórcio de microalgas *Chlorella vulgaris* e alguma espécie do gênero *Chlamidomonas*, e não foi possível a separação das mesmas.

#### 4.2 Montagem dos Fotobiorreatores

A montagem dos dois sistemas de FBRC junto ao laboratório LATAR demandou um tempo considerável por causa da confecção de cada unidade, montagem das instalações hidráulicas e elétricas, montagem de sala especial e partida das unidades, levando essa etapa aproximadamente cinco meses. A identificação e contenção de vazamentos (com cola de silicone), testes hidráulicos e identificação de pontos críticos

de obstruções dos FBR com escoamento contínuo (FBRC) levaram mais dois meses. Os dois sistemas FBRC possuíam individualmente quatro unidades em série, totalizando oito unidades iguais feitas sob medida, com 120cm de comprimento, 10cm de largura e 60cm de altura. Elas foram feitas em material de acrílico e possuíam tampa para evitar contaminações. As unidades eram apoiadas em uma estrutura metálica de aço inoxidável e com abertura para a remoção das mesmas para manutenção. No interior de cada unidade foram instalados 3 apoios de acrílico para reforço da estrutura, já que o peso exercido pelo líquido, sendo 64 litros, poderia deformar as paredes do FBRC. Em cada unidade havia também um registro para drenagem localizado na base, uma entrada para alimentação a 2cm da base, e um vertedor na face oposta, na parte superior, para manutenção do volume definido, já que o escoamento era contínuo. As unidades foram colocadas em alturas diferentes para permitir um escoamento por gravidade entre as unidades, sendo aplicado um desnível de aproximadamente 10 cm entre a primeira e a última unidade.

### 4.3 Sistemas de Fotobiorreatores

Como os fotobiorreatores eram contínuos, a primeira unidade de cada sistema (unidade 1 e unidade 5) recebia diretamente a alimentação, de cada respectivo reservatório de alimentação e entrava pela parte inferior da unidade. A estrutura do FBRC pode ser vista na Figura 4.



Figura 4 - Sistema FBRC 1 em operação com *Chlorella vulgaris*, contendo as unidades 4, 3, 2, 1 da esquerda para a direita.

A sala dos fotobiorreatores, com acesso controlado, era localizada no segundo andar do Laboratório de Tratamento Avançado e Reuso de Águas (LATAR) na EESC-USP, no primeiro andar de onde ficavam os reservatórios de alimentação, e teve suas janelas revestidas para que não entrasse nenhuma luz solar, como pode ser vista na Figura 5.



**Figura 5 - Vista geral da sala com os dois sistemas de fotobiorreatores, com as janelas revestidas para que não entrasse luz solar.**

Os dois sistemas de FBRC eram independentes, tanto na alimentação, cada um com seu respectivo reservatório de alimentação e tipo de alimentação, quanto na coleta de efluente, cada qual em um reservatório.

O conteúdo da primeira unidade seguia para a segunda, que seguia para a terceira e por fim, seguia para a quarta. Depois de ser vertido da quarta e última unidade de cada sistema, considerado o efluente do FBRC, o conteúdo seguia para seu respectivo reservatório do tipo tambor de fibra de vidro, por gravidade, localizado ao lado dos reservatórios de alimentação, como visto na Figura 6 e 7. Cada reservatório de efluente do FBRC possuía capacidade de 250L e possuía um sistema de agitação, para que o efluente continuasse homogêneo. Depois, o conteúdo era encaminhado para a rede de esgoto, pois a microalga *Chlorella vulgaris* não é tóxica, podendo ser descartada



**Figura 6. Reservatórios de alimentação.**



**Figura 7. Reservatórios de efluente das unidades 4 e 8.**

normalmente na rede.

Cada FBRC possuía seu sistema próprio de refrigeração, aquecimento, aeração e iluminação. Para que o meio dentro de cada unidade de cada sistema fosse constantemente misturado e houvesse tanto oxigênio quanto CO<sub>2</sub>, também era necessária aeração. Em cada unidade havia um sistema de aeração com controle individual, composto por um medidor de vazão, registro agulha e uma mangueira porosa. A mangueira possuía diâmetro interno de 16mm e 5 mm de espessura, sendo utilizada na piscicultura, mas neste estudo utilizada para distribuição do ar dentro da unidade, formando bolhas para a aeração, que subiam até o nível d'água. O ar da aeração passava por uma tripla filtração, com carvão ativado e filtros de 0,1μm e 0,001μm, como pode ser visto na Figura 8. A vazão utilizada foi de 0,25vvm (volume de ar por volume de meio por minuto), correspondendo a 16L.min<sup>-1</sup>. Para ajuste e manutenção da aeração, a mangueira era sempre desconectada do sistema de distribuição para ser possível ajustar esse valor à pressão ambiente, e depois reconectada.

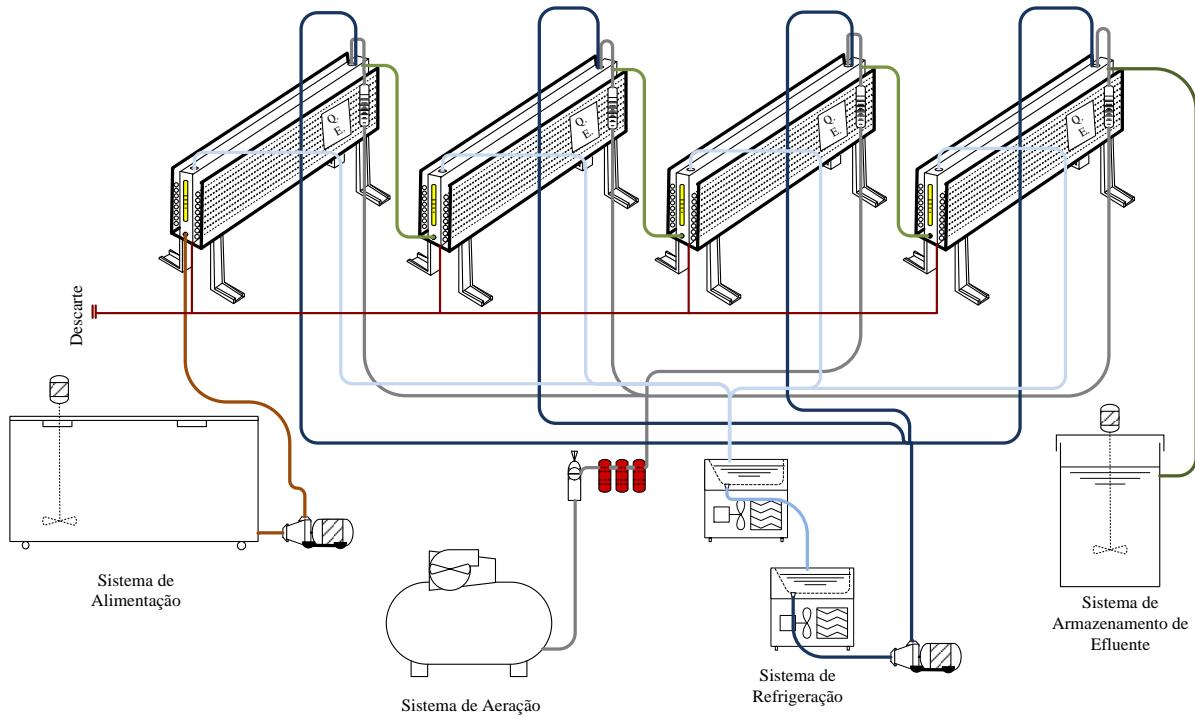


Figura 8 - Sistema de filtração de ar com tripla filtração.

As microalgas também precisam de luz para seu crescimento, sendo providas por 8 lâmpadas fluorescente tubulares de 40W e 120cm de comprimento, de cada lado de cada unidade, totalizando 16 lâmpadas por unidade, vistas na Figura 4 anterior. As lâmpadas ficavam fixas na estrutura de aço inoxidável escovado, em volta dos FBRC. Definiu-se 12 horas de ambiente claro e 12 horas de ambiente escuro, programando-se as luzes com um auxílio de um timer para ficarem acesas das 7 às 19 horas. O sistema de iluminação era individual, ou seja, cada unidade possuía seu sistema independente, mas

todos foram programados para o mesmo horário, em virtude de todas as unidades estarem na mesma sala.

Como os FBRC ficavam em uma mesma sala, que era totalmente fechada, e cada unidade possuía 16 lâmpadas, foi necessária a instalação de um sistema de refrigeração ambiente para controle da temperatura interna, mantido a 24,5°C. Foi instalado um sistema de exaustão para auxiliar a troca gasosa no interior da sala, funcionando a cada 15 minutos, já que o nível de oxigênio aumentaria por causa da fotossíntese. Foi necessária também a instalação de outro sistema de refrigeração, interno aos reatores, consistindo na circulação de água refrigerada através de um tubo de aço inoxidável de  $\frac{1}{4}$ " em forma de U no interior de cada unidade, mas que não entrava em contato com o meio, para auxiliar na troca térmica. A água era proveniente de duas unidades refrigeradoras externas à sala dos FBRC sendo bombeada para um sistema de distribuição e depois para os tubos de cada unidade de cada sistema, independentemente, e com a mesma temperatura. A água refrigerada recirculava automaticamente quando a temperatura do meio chegava a 25°C e continuava até a temperatura interna das unidades ser 24,5°C, de forma automatizada. Essa refrigeração era necessária já que a troca térmica era grande entre a sala e os fotobiorreatores durante o dia, mesmo com o sistema de refrigeração ligado. Ao mesmo tempo que era necessária a refrigeração, também eram necessários aquecedores para que a temperatura do meio à noite não caísse tanto, uma vez que as lâmpadas estavam desligadas. Então, cada unidade de cada sistema também possuía um aquecedor de aquário de 300W a 24°C, com controle analógico. O esquema geral dos FBRC, sistemas de aeração, alimentação, refrigeração e armazenamento de efluente pode ser visto na Figura 9.



**Figura 9 - Esquema geral dos fotobioreatores com sistemas de alimentação, aeração, refrigeração, armazenamento de efluente e descarte (SACCHI, 2015).**

#### 4.4 Reservatórios de alimentação

Para o estoque de meio padrão WC modificado e vinhaça foi necessário determinar primeiramente o volume dos reservatórios de alimentação, sendo medidas as alturas, larguras e comprimentos dos mesmos. Com 69cm de altura, 53cm de comprimento e 141cm de largura, resultou-se na capacidade total de 471,0 litros em cada reservatório de alimentação. Como essa capacidade máxima não seria atingida, e não havia como fazer qualquer marca para conhecimento do volume de meio padrão ou vinhaça, foi elaborada uma régua em cano de PVC e papel milimetrado onde foi anotado o volume de líquido, segundo as alturas da parede do reservatório de alimentação, conforme a Tabela 1.

**Tabela 1 - Volume dos reservatórios de alimentação pelas alturas.**

Altura (cm)	Comprimento (cm)	Largura (cm)	Volume (L)
1	53	108	6
2	53	108	11
3	53	108	17
4	53	108	23

5	53	108	29
6	53	108	34
7	53	108	40
8	53	108	46
9	53	108	52
10	53	108	57
11	53	108	63
12	53	108	69
13	53	108	74
14	53	108	80
15	53	108	86
16	53	108	92
17	53	108	97
18	53	108	103
19	53	108	109
20	53	108	114
21	53	108	120
22	53	108	126
23	53	108	132
24	53	108	137
25	53	108	143
26	53	141	150
27	53	141	157
28	53	141	165
29	53	141	172
30	53	141	180
31	53	141	187
32	53	141	195
33	53	141	202
34	53	141	209
35	53	141	217
36	53	141	224
37	53	141	232
38	53	141	239
39	53	141	247
40	53	141	254
41	53	141	262
42	53	141	269
43	53	141	277
44	53	141	284
45	53	141	292
46	53	141	299
47	53	141	307
48	53	141	314
49	53	141	322
50	53	141	329
51	53	141	337
52	53	141	344
53	53	141	351

<b>54</b>	53	141	359
<b>55</b>	53	141	366
<b>56</b>	53	141	374
<b>57</b>	53	141	381
<b>58</b>	53	141	389
<b>59</b>	53	141	396
<b>60</b>	53	141	404
<b>61</b>	53	141	411
<b>62</b>	53	141	419
<b>63</b>	53	141	426
<b>64</b>	53	141	434
<b>65</b>	53	141	441
<b>66</b>	53	141	449
<b>67</b>	53	141	456
<b>68</b>	53	141	464
<b>69</b>	53	141	471

Continuação da Tabela 1.

Uma observação a ser feita é que até 26cm do fundo de cada reservatório de alimentação encontrava-se um degrau, por isso a largura aumentou de 108cm para 141cm. Na Figura 10, tem-se a régua em PVC elaborada para a pesquisa. Para medir-se o nível de meio dos reservatórios de alimentação, era necessário desinfetar a régua, que ficava exposta aos microrganismos do ambiente, com etanol a 70% a cada uso.



Figura 10. Em (a) e (b) imagens da régua utilizada para determinação do volume de meio nos reservatórios de alimentação.

#### 4.5 Vazão de recalque do meio de alimentação

Cada sistema possuía uma bomba dosadora de baixa vazão, de 1 a 5L, que succionava o meio padrão modificado do respectivo reservatório de alimentação e o recalcava para o respectivo FBRC.

A bomba foi calibrada de acordo com a vazão necessária que entraria nas unidades dos sistemas FBRC. A curva de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* foi definida por Bichara (2014), conforme Gráfico 2, identificando-se que para atingir seu crescimento exponencial, seriam necessários 5 dias no reator. Como o fotobioreator estava em série, teoricamente, a primeira unidade era onde ficavam as microalgas mais jovens, que seguiam para os fotobioreatores seguintes e na quarta unidade estariam as microalgas mais velhas, com declínio de seu crescimento. Foi definido então um TDH de 7 dias pelos ensaios em FBR de batelada, assim uma mesma microalga demoraria 7 dias para crescer no primeiro reator e chegar até a saída da quarta unidade, chegando a seu crescimento exponencial no 5º dia, desde a entrada no sistema, até a última unidade.

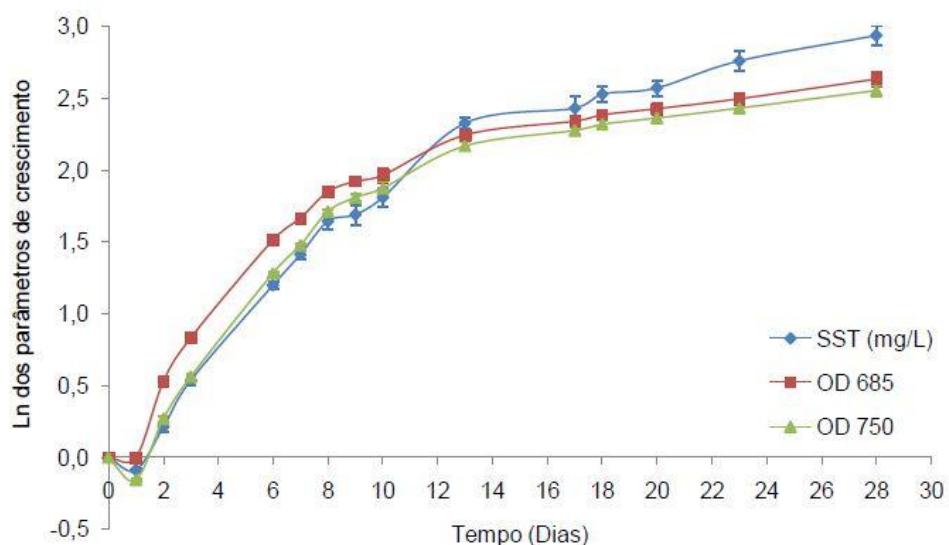


Gráfico 2. Curva de crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* extraído de Bichara (2014). Curvas normalizadas de crescimento por biomassa (mg/L) e densidade óptica (685 e 750nm).

O FBRC era contínuo com 4 unidades em série, onde cada unidade possuía capacidade de 64L, então, somando-se, eram 256L com tempo de detenção hidráulico de 7 dias, ou seja,  $4,23 \cdot 10^{-4} \text{ L.s}^{-1}$  ou  $1,52 \text{ L.h}^{-1}$ .

Pelo TDH definido e vazão de  $1,52 \text{ L.h}^{-1}$ , as curvas de frequência e intensidade de cada bomba de cada sistema foram ajustadas de modo que a vazão desejada fosse obtida. Esse procedimento foi feito somente como referência, pois diariamente a vazão de meio era medida com proveta e cronômetro para garantir os valores definidos previamente.

O meio de alimentação era então bombeado de cada reservatório de alimentação para as unidades 1 e 5, sendo que o sistema de FBRC 1 era composto pelas unidades 1, 2, 3 e 4 e o FBRC 2, composto pelas unidades 5, 6, 7 e 8.

#### **4.6 Limpeza dos sistemas**

Foi realizada a limpeza de todo o sistema, depois que ele estava montado, para o início da pesquisa, utilizando-se uma solução de água e Extran de  $50\text{ml.L}^{-1}$  nos reservatórios de alimentação, nas unidades dos FBRC e no sistema de aeração que entra em contato com as microalgas. Durante o funcionamento, quando foi preciso encerrar entre um teste e outro, essa solução de água e Extran foi utilizada para retirar o material aderido às paredes. Depois dessas soluções, utilizava-se hipoclorito de sódio 5ppm, para eliminação de bactérias ou fungos, permanecendo no interior das unidades dos FBRC por tempo de contato de 24 horas. Enxaguava-se os FBRC com água corrente e os secava. Finalmente passava-se etanol 70% imediatamente antes do uso.

#### **4.7 Pesquisa com Meio padrão WC modificado**

A fonte sintética de alimentação da microalga *Chlorella vulgaris* utilizada foi o meio padrão WC, que foi preparado em laboratório para esta pesquisa conforme Guillard e Lorenzen (1972) e estocado em dois reservatórios de alimentação horizontais a  $4\pm2^\circ\text{C}$ , um para cada sistema, refrigerado e com agitadores mecânicos para constante mistura. Os reservatórios de alimentação foram internamente revestidos com fibra de vidro para evitar vazamentos. O meio padrão WC modificado foi preparado a partir da água microfiltrada por poros de  $0,2\mu\text{m}$  de um poço profundo (sem aplicação de cloro), que abastece o laboratório LATAR da USP São Carlos, com mais algumas soluções que são preparadas previamente, sendo 5 soluções estoque, uma solução de micronutrientes e uma de vitaminas. Como a alimentação era feita duas vezes por semana, decidiu-se

deixar preparado 2L de cada solução a cada duas semanas, e frascos de 40ml com a vitamina. A massa de cada reagente das soluções estoque pode ser conferida na Tabela 2.

**Tabela 2- Massa de cada solução estoque segundo Meio WC de Guillard e Lorenzen (1972).**

<b>Composição das Soluções Estoque</b>	<b>Massa (g/2L)</b>
Solução 1	CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O
Solução 2	MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O
Solução 3	NaHCO <sub>3</sub>
Solução 4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Solução 5	NaNO <sub>3</sub>
Solução 6	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> . 9 H <sub>2</sub> O

A solução 6 não foi usada neste meio já que ela é utilizada quando a alga necessita de Silício, e este tipo de microalga não requer essa solução. Já a massa de reagente para a solução de micronutrientes pode ser conferida na Tabela 3.

**Tabela 3 - Massa da solução de micronutrientes segundo Meio WC de Guillard e Lorenzen (1972).**

<b>Solução 7 - Micronutrientes</b>	
	<b>Massa (g do composto/2L)</b>
Na <sub>2</sub> EDTA	8,72
FeCl <sub>3</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	6,3
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	0,02
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	0,044
CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0,02
MnCl <sub>2</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	0,36
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0,012
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2

Essas seis soluções eram preparadas misturando-se cada reagente com um pouco de água deionizada em balão volumétrico de 2L com agitadores magnéticos. Após total dissolução dos reagentes completa-se o volume com água deionizada até 2L. As soluções eram mantidas em recipientes de 2L e armazenadas em câmara fria, que eram consumidas em, no máximo, uma semana. A solução de vitaminas era composta pelos reagentes da Tabela 4, também preparada com água deionizada.

**Tabela 4 - Massa de cada componente da solução de vitamina.**

<b>Solução 8 -Vitaminas</b>		
	Massa (g do composto/L)	Massa (g/10L)
Tiamina.HCl	0,1	1
Biotina	0,0005	0,005
B12	0,0005	0,005

As soluções prontas de vitaminas eram congeladas para conservação e totalmente descongeladas, seja pela temperatura ambiente ou em banho-maria, no momento do preparo do meio padrão.

#### **4.7.1 Complementação de meio padrão**

O enchimento dos reservatórios de alimentação com o meio padrão WC modificado era feito em etapas. Primeiro, a mangueira de água de poço do laboratório era desinfetada com etanol a 70% e era medido o nível de meio dos reservatórios de alimentação com a régua. A água do poço não possuía cloro e passava por um cartucho de filtração de 0,2µm de porosidade, controlando a entrada de bactérias, e seguia para um dos reservatórios de alimentação, até enchê-lo. Depois, era medido o volume de água final com a régua de PVC.

Sabendo-se o volume de água afluente, que era a subtração do volume final pelo volume inicial, calculava-se o volume que era necessário de cada solução estoque, de micronutrientes e vitamina para o meio padrão modificado. Era necessário 1ml de cada solução estoque e de micronutrientes a cada 1 litro de água do poço filtrada e 1ml da solução de vitamina a cada 10 litros de água de poço filtrada. As soluções eram medidas em proveta de 500mL e misturadas em um recipiente de 2L. Despejava-se esse volume no reservatório de alimentação e, juntamente com a água microfiltrada, esse era o meio padrão modificado. Este era constantemente misturado dentro de cada reservatório de alimentação através de agitadores mecânicos tipo hélice instalados no interior, com seu motor de acionamento na tampa, funcionando continuamente e deixando-o homogêneo.

Era feito o mesmo procedimento para o outro reservatório de alimentação, porém adicionando-se glicerol com o meio padrão modificado, sendo necessária a concentração de 0,92g.L<sup>-1</sup> da substância para cada 1 litro de água do poço microfiltrada. Os reservatórios de alimentação, que eram sempre complementados e nunca esvaziados, permaneciam sempre trancados para garantir a menor contaminação

possível do meio padrão modificado com o ambiente externo. Deve-se notar que o meio de cultivo não foi esterilizado em autoclave devido aos grandes volumes utilizados.

#### **4.7.2 Partida dos FBRC com meio padrão WC modificado**

A unidade estava vazia quando foi adicionado o inóculo, que estava sendo mantido em FBR de bancada em batelada de 2L. O inóculo foi preparado em 3 FBR com meio WC modificado e sem solução tampão, e de seu volume total, metade foi para cada FBRC, para que os dois sistemas recebessem o mesmo inóculo, que encontrava-se na metade da fase exponencial de crescimento. O volume adicionado em cada unidade foi de 3L de inóculo somente nas unidades 1 e 5, e as unidades dos FBRC foram alimentadas com o meio padrão WC modificado, dando início à operação dos mesmos.

Os reatores foram enchendo com a vazão do TDH e a aeração foi sendo aumentada conforme aumento do volume dos reatores. Após 7 dias, os dois sistemas estavam completos, ou seja, cada unidade continha 64L de meio de cultivo e microalgas. O efluente das unidades 4 e 8, depois do 7º dia, começou a ser estocado nos reservatórios, que foram utilizados em outro tipo de estudo.

Durante o tempo de enchimento completo das quatro unidades de cada FBR, foi ajustando-se novamente a vazão e intensidade das bombas, levando-se em consideração a definição do TDH de 7 dias.

#### **4.7.3 Funcionamento**

Assim que todo sistema ficou completo, ou seja, as oito unidades com 64 litros cada, obteve-se uma amostra da quarta unidade de cada sistema, para realização de análises, e foi definida a obtenção de amostras dessas unidades duas vezes por semana, nas unidades 4 e 8. Tal monitoramento foi realizado a partir da leitura da absorbância em 3 comprimentos de onda específicos (665, 685 e 750 $\text{nm}$ ) e clorofila- $a$  segundo método de Nush (1980) e modificado segundo norma holandesa (NEDERLANDSE NORM NEN 6520, 1981), além das determinações constantes de OD, pH e temperatura, para observação do comportamento das microalgas.

Observou-se que seria necessário completar o meio padrão duas vezes por semana nos reservatórios de alimentação e a realização das análises seria feita duas

vezes por semana da quarta unidade e após quatro análises constantes, seria realizada a análise de absorbância e clorofila das quatro unidades de cada sistema. Foi necessário também ajustar as bombas através da medição diária da vazão de meio bombeado de cada sistema, pois a vazão variava constantemente. Diariamente também era feita uma checagem do nível dos FBRC, com intuito de verificar se nenhuma mangueira entre as unidades estava entupida, da vazão de ar para a aeração, da temperatura da sala através de um termômetro instalado perto da unidade 1 e se não havia nenhuma lâmpada queimada nas paredes dos FBRC.

O tempo total de funcionamento dos FBRC foi de 165 dias, e, devido a problemas de crescimento da microalga, a pesquisa com meio padrão acabou sendo dividida em três testes.

#### **4.7.3.1    Primeiro teste**

No primeiro teste foi definido o TDH de 7 dias e vazão de  $1,52 \text{ L.h}^{-1}$  nos dois sistemas FBRC. A duração total foi de 63 dias de operação. Como o sistema 2 não apresentou índices favoráveis de crescimento da microalga, com o crescimento de contaminantes dominando o cultivo, iniciou-se o próximo teste.

#### **4.7.3.2    Segundo Teste**

No segundo teste foi decidido reduzir o TDH para 3,5 dias, pois assim a vazão de alimentação seria dobrada, passando a  $3,0 \text{ L.h}^{-1}$ , fornecendo alimento mais rapidamente para as microalgas. É importante destacar que nesta etapa a única mudança em relação à anterior foi o aumento da vazão, não havendo qualquer outra modificação nos sistemas.

O primeiro sistema continuou com um bom desenvolvimento das microalgas e teve duração de 45 dias. Porém, o segundo sistema não apresentou tal crescimento e operou por 25 dias nessas novas condições. Como houve inexistência de microalgas no sistema 2, ele teve que ser desligado.

#### **4.7.3.3    Terceiro Teste**

O terceiro teste baseou-se em continuar com a mesma vazão de alimentação e mesmo TDH do segundo teste,  $3,0 \text{ L.h}^{-1}$  e 3,5 dias, nos dois sistemas de FBRC. Apenas foi incluída uma recirculação com vazão inicial de  $11,4 \text{ L.h}^{-1}$  no FBRC 2 da unidade 4 para a

unidade 1, utilizando-se uma bomba dosadora de baixa vazão (de 1 a 50L). As mangueiras de sucção e recalque da recirculação foram colocadas diretamente dentro das unidades 1 e 4.

Como o segundo sistema na etapa anterior foi desligado, foi retirado metade do volume de cada unidade do sistema 1 para cada unidade correspondente do sistema 2. Assim, os dois sistemas possuíam a mesma qualidade de meio e mesmo estágio de crescimento da *Chlorella vulgaris*. As unidades foram completadas com meio padrão e aguardou-se 42h para o ligar a recirculação no segundo sistema.

Nesta etapa o FBRC 1 operou por 58 dias e o FBRC 2 por 14 dias. Decidiu-se desligar a recirculação da quarta à primeira unidade do segundo sistema, já que não havia presença de microalgas, e continuar operando-o, nas mesmas condições do FBRC 1. Assim, o FBRC 2 operou por mais 30 dias, sem a recirculação. Um resumo da quantidade de dias de cada teste nos sistemas pode ser observado na Tabela 5.

Ainda assim, o sistema 2 acabou não se recuperando, com falta de microalgas e presença de bactérias, e ele foi, então, desligado.

Após, o primeiro sistema também foi desligado e foi feito o processo de limpeza para a próxima etapa da pesquisa, a alimentação das microalgas com vinhaça.

**Tabela 5 - Resumo da quantidade de dias de cada teste com meio padrão.**

Testes	Duração FBRC 1	Duração FBRC 2
1º teste	63 dias	63 dias
2º teste	45 dias	25 dias
3º teste	57 dias	Com recirculação: 14 dias
		Sem recirculação: 30 dias

#### **4.8 Pesquisa com Vinhaça**

A segunda etapa da pesquisa foi realizada alterando-se a fonte de alimentação das microalgas para vinhaça. Foram usados os dois sistemas FBRC, com as mesmas características estruturais da pesquisa anterior.

Depois dos três testes com meio padrão, os FBRC foram desligados e totalmente limpos para a nova etapa. Como o cultivo escolhido foi o mixotrófico, ou seja, as microalgas dependem também da luz para realização de fotossíntese, foi necessário atentar para o fato de que a vinhaça possui alto valores de cor e turbidez, podendo

prejudicar o fornecimento de luz dos microrganismos. Por isso, foi usado o polímero catiônico SUPERFLOC C492 (KEMIRA) para coagulação da vinhaça e realizada uma microfiltração antes de seu contato com as microalgas, segundo tese de Sacchi (2015). A microfiltração, sendo uma separação física de materiais, foi feita em filtro do tipo Bag com 1,0 $\mu$ m de abertura de poros.

Foram realizados testes em fotobioreator de bancada operando em batelada de 2L alimentado com vinhaça microfiltrada em diferentes porcentagens. Por meio desses testes, foi decidido que a melhor proporção seria de 5% de vinhaça no meio de cultivo (SACCHI, 2015). Além disso, foram definidas as análises para acompanhamento do processo: turbidez, densidade óptica 685 e 750 $\text{nm}$ , absorbância em 254 $\text{nm}$  da amostra filtrada, DQO da amostra microfiltrada e clorofila-*a*. Essas análises foram realizadas duas vezes por semana em cada unidade e na entrada da primeira unidade, que é onde entrava o meio de cultivo. Durante o estudo, não foi usada solução tampão para controle do pH.

#### **4.8.1 Primeiro teste com vinhaça**

Como estipulado anteriormente, seria usada uma solução de vinhaça filtrada e diluída a 5% para não prejudicar o crescimento das microalgas. Em testes de bancada em FBR de batelada foi mantido um inóculo de 100mL de vinhaça microfiltrada não esterilizada em autoclave, 100mL de água deionizada e 1,8L de cultura de *Chlorella vulgaris* em fase estacionária. Esse inóculo foi mantido em FBR de batelada de 2L por 18 dias em sala de cultivo. Através de análises e visualmente, as microalgas conseguiram desenvolver-se e se adaptaram ao meio de cultivo com vinhaça nessas condições.

O cultivo em FBRC utilizou 3,6L do inóculo da sala de cultivo, sendo alimentado com uma solução do reservatório de alimentação de 5% vinhaça e água microfiltrada do poço profundo que abastece o Laboratório LATAR. O TDH ficou definido em 7 dias e o teste teve duração total de 11 dias, devido à falta de microalgas nos sistemas e presença de bactérias e fungos.

#### **4.8.2 Segundo teste com vinhaça**

Após o primeiro teste, optou-se por esterilizar a vinhaça em autoclave para evitar a presença de microrganismos que competissem com a microalga. Como os

reservatórios de alimentação possuía grande volume, só a vinhaça foi esterilizada em autoclave, antes de ser diluída nos reservatórios. Além disso, foi adicionado também o antiespumante Y-30 da Sigma-Aldrich com 5ppm, segundo Sacchi (2015), pois nos FBRC a forte presença de espuma estaria carreando as microalgas para fora dos reatores.

O inóculo dessa vez foi mantido somente com meio padrão WC modificado, sem adição de vinhaça, devido aos contratemplos da pesquisa. O volume utilizado foi de 4L em cada sistema de FBRC, sendo que as microalgas do inóculo estavam na metade da fase exponencial. O TDH continuou definido em 7 dias e, portanto, vazão de 1,52 L.h<sup>-1</sup>. Depois que o sistema ficou completo, ou seja, depois de sete dias, diminuiu-se a vazão para 0,63 L.h<sup>-1</sup> (TDH: 17 dias) por 9 dias. Como não houve melhora no crescimento, aumentou-se a vazão para 0,89 L.h<sup>-1</sup> (TDH: 12 dias) por 3 dias, e ao final, aumentou-se a vazão para 1,52 L.h<sup>-1</sup>, novamente retornando ao TDH de 7 dias, com duração de 84 dias.

A duração do segundo teste foi de 103 dias, sendo que por duas vezes (dias 34 e 57) foram adicionados inóculos de microalgas cultivadas em meio padrão diretamente na primeira unidade dos FBRC, na tentativa de aumentar o desenvolvimento da microalga.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Utilização de meio padrão

#### 5.1.1 Primeiro Teste

Nos Gráficos 3 e 4, observa-se a curva de absorbância em comprimentos de ondas específicos (665, 685 e 750nm) em relação aos dias corridos após a inoculação dos FBRC 1 (sem glicerol) e FBRC 2 (com glicerol). As análises de absorbância são do efluente de cada sistema, ou seja, da saída da quarta unidade de cada FBRC. O tempo total do primeiro teste foi de 63 dias nos dois sistemas.

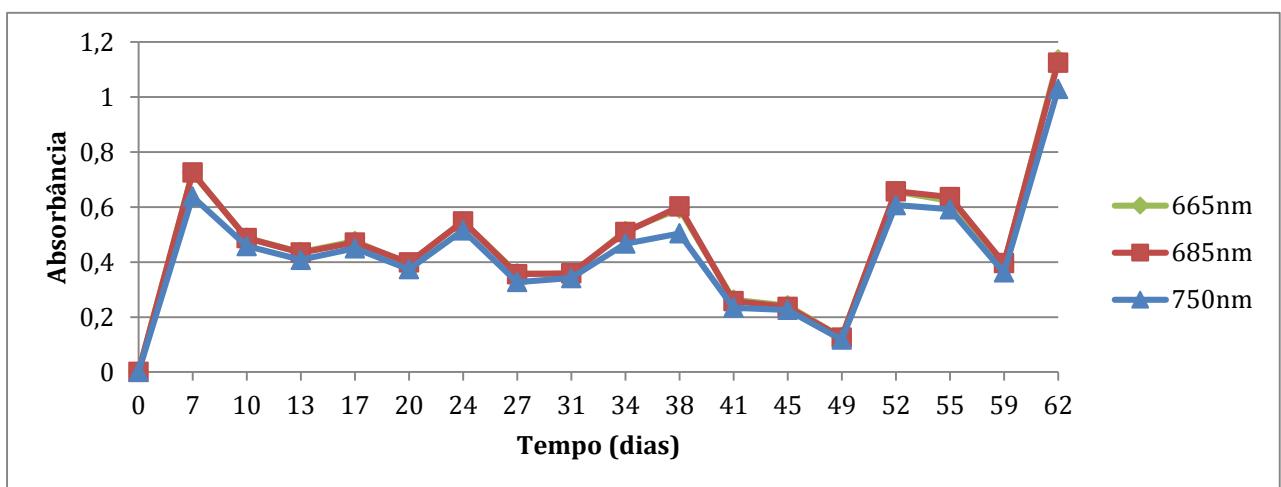


Gráfico 3. Absorbância em 665, 685 e 750nm do efluente do FBRC 1 no primeiro teste.

Nos gráficos de absorbância percebe-se que as curvas variam bastante de valor, tanto no FBRC 1 como no FBRC 2, o que indica a não adaptação das microalgas ao meio ou a forma de cultivo. Os valores de absorbância em 665 e 685nm, que indicam a presença de pigmento verde, sendo uma análise rápida e indireta da presença de

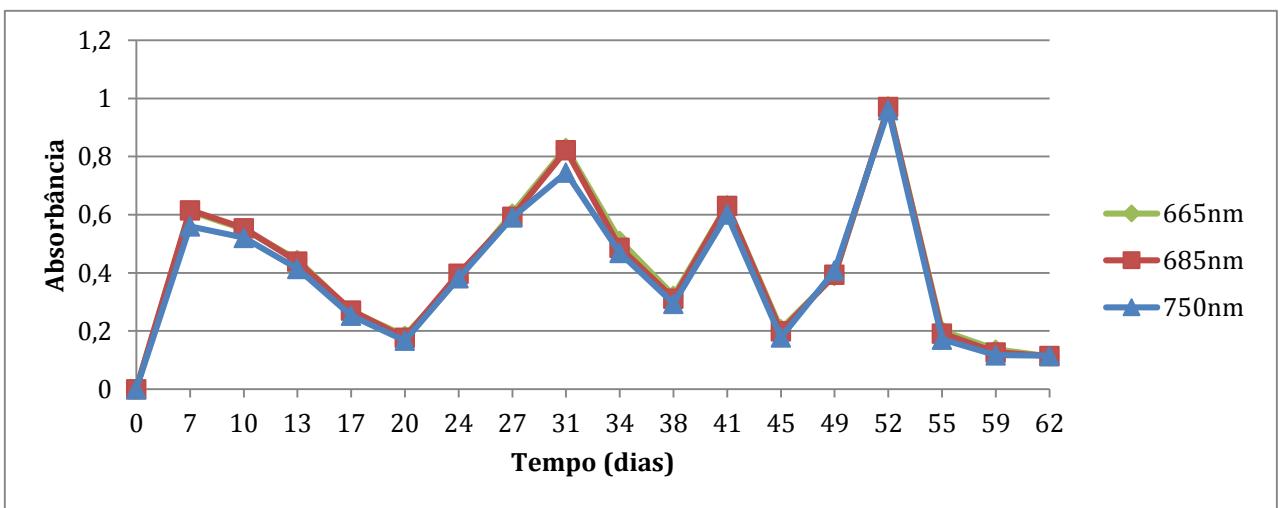


Gráfico 4. Absorbância em 665, 685 e 750nm do efluente do FBRC 2 no primeiro teste.

clorofila, foram muito parecidos e se sobressaíram nos gráficos. Mesmo a absorbância em  $750\text{nm}$ , que é o indicativo de turbidez, também teve valores parecidos com a absorbância nos outros comprimentos de onda.

Portanto, entre os dois sistemas, com vazão de meio padrão WC modificado de  $1,52\text{ L.h}^{-1}$  e TDH de 7 dias, não é possível concluir se a inclusão de glicerol no segundo sistema é mais benéfico, pois a microalgas não cresceram e nem se adaptaram ao meio.

Nos gráficos 5 e 6, observam-se os valores de clorofila-a e feofitina. No FBRC 1, os valores de clorofila-a estão maiores do que os de feofitina, indicando que as microalgas estavam crescendo em maior quantidade do que morrendo.

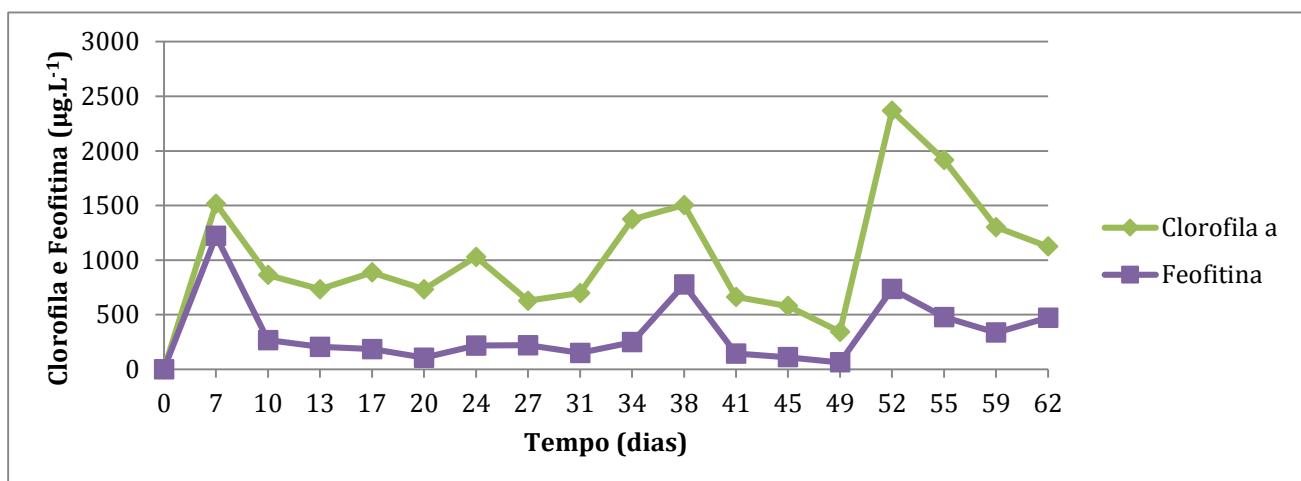


Gráfico 5. Clorofila-a e feofitina (em  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) do primeiro teste no FBRC 1.

Os valores nos gráficos de clorofila-a e feofitina também variaram bastante no FBRC 1, e se mantiveram mais constantes no FBRC 2, porém neste sistema alguns valores foram negativos e a clorofila-a nos últimos dias estava perto de zero. Pode-se perceber que as análises de clorofila-a e feofitina são mais indicativos da presença de microalgas do que as análises de absorbância. Pelos resultados das análises, decidiu-se

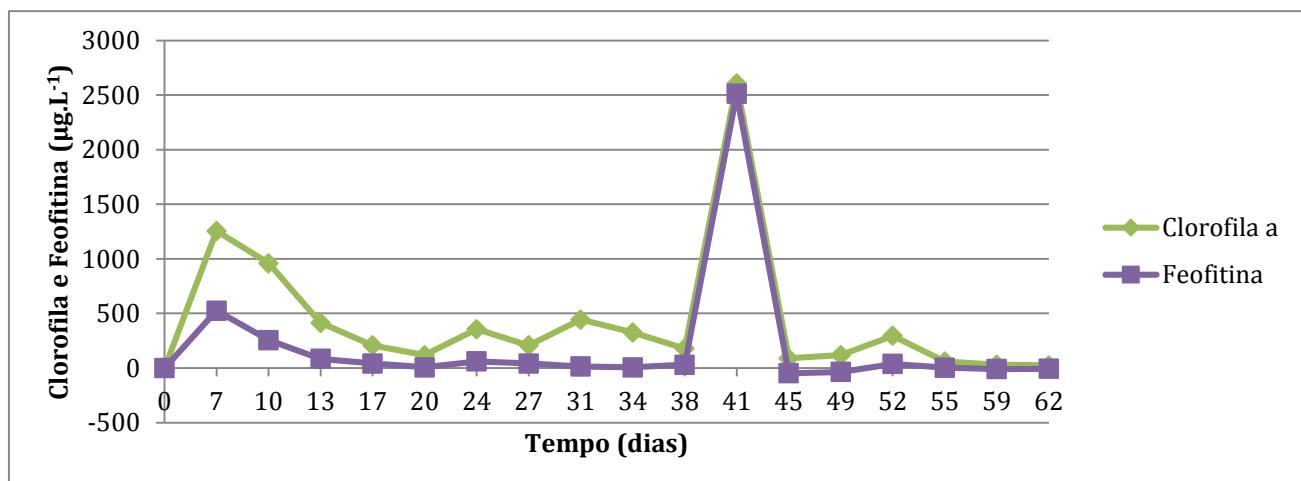


Gráfico 6. Clorofila-a e feofitina (em  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) do primeiro teste no FBRC 2.

aumentar a vazão de alimentação de meio padrão para o dobro, pois assim as microalgas teriam maior acesso aos nutrientes.

Estas decisões foram baseadas também nas observações in-loco.

### 5.1.2 Segundo Teste

Para o segundo teste foi decidido aumentar a vazão de alimentação para  $3,0 \text{ L.h}^{-1}$  e o TDH, consequentemente, foi diminuído para 3,5 dias, sendo que os sistemas só tiveram a vazão incrementada, sem a interrupção do sistema.

Pelas Figuras 11 e 12 pode-se comparar as fotos dos dois sistemas no 4º dia de cultivo do segundo teste. É visível o bom crescimento da microalga no sistema 1, que apresentou a cor verde, característica do desenvolvimento da microalga que realiza a atividade fotossintética. Já o sistema 2, enriquecido com glicerol, não apresentou tal coloração, pois teve crescimento heterotrófico.



Figura 11 - Foto do 4º dia de cultivo do FBRC 1 no segundo teste.

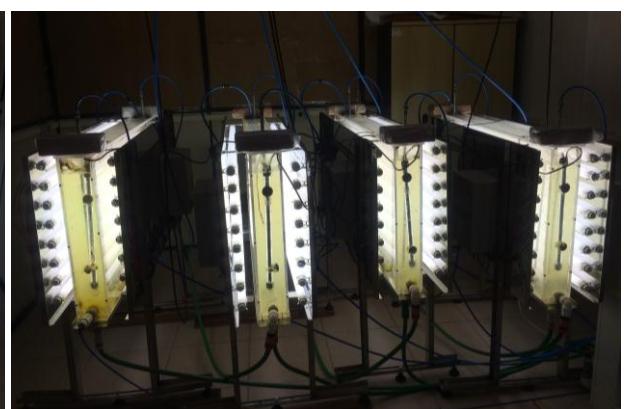


Figura 12 - Foto do 4º dia de cultivo no FBRC 2 no segundo teste.

Nos Gráficos 7 e 8 estão os resultados de absorbância do segundo teste, que teve um total de 45 dias para o FBRC 1 e 25 dias para o FBRC 2.

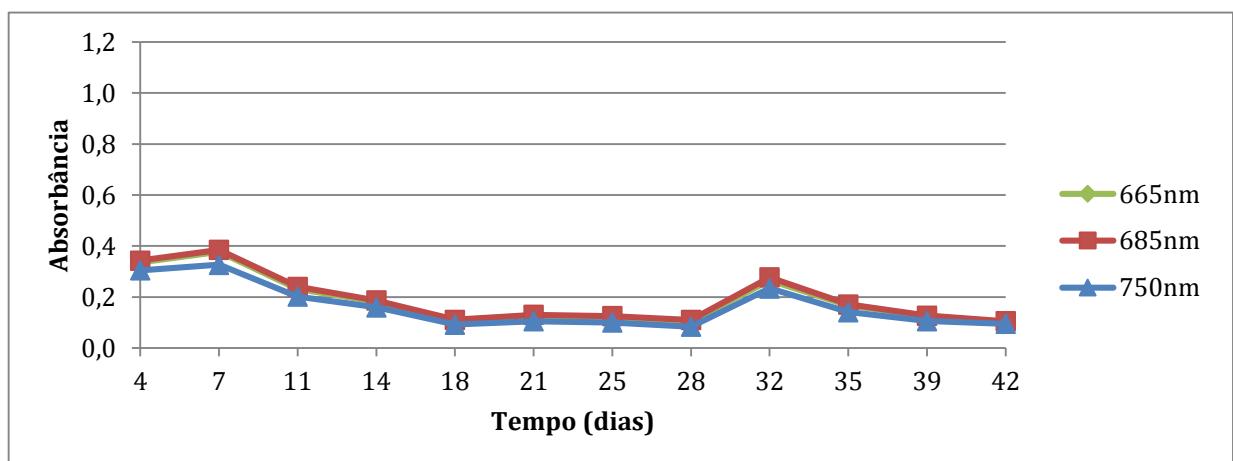


Gráfico 7. Absorbância (665, 685 e 750nm) do segundo teste no efluente do FBRC 1.

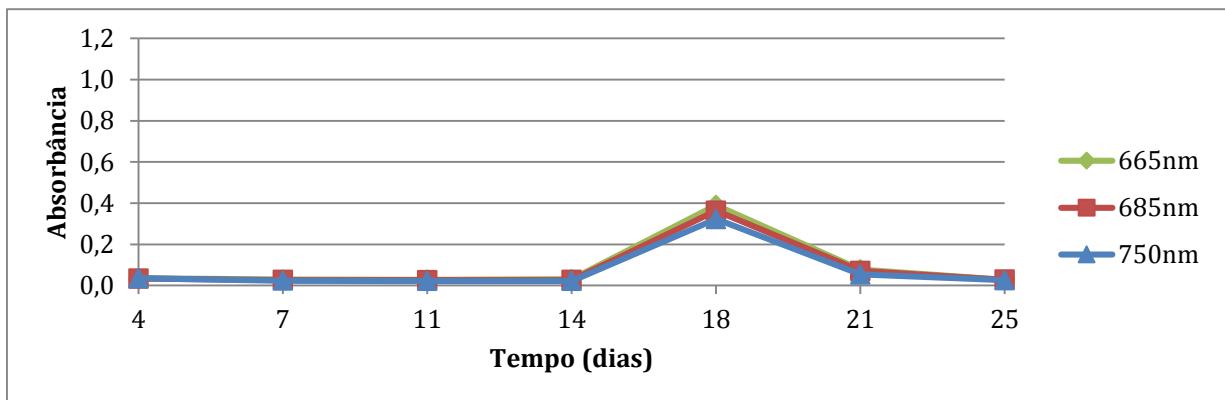


Gráfico 8. Absorbância (665, 685 e 750nm) do segundo teste no efluente do FBRC 2.

Em relação ao primeiro teste, pode-se observar nos gráficos que os valores de absorbância tornaram-se mais constantes com o aumento da vazão de alimentação. Porém, no sistema 2 os valores chegaram próximos de zero, concluindo-se que o glicerol no sistema 2 não favoreceu o crescimento das microalgas, já que apresentou crescimento heterotrófico e o cultivo de bactérias e fungos que foi beneficiado. Nos Gráficos 9 e 10, observa-se os valores de clorofila-a e feofitina para o segundo teste dos FBRC 1 e 2.

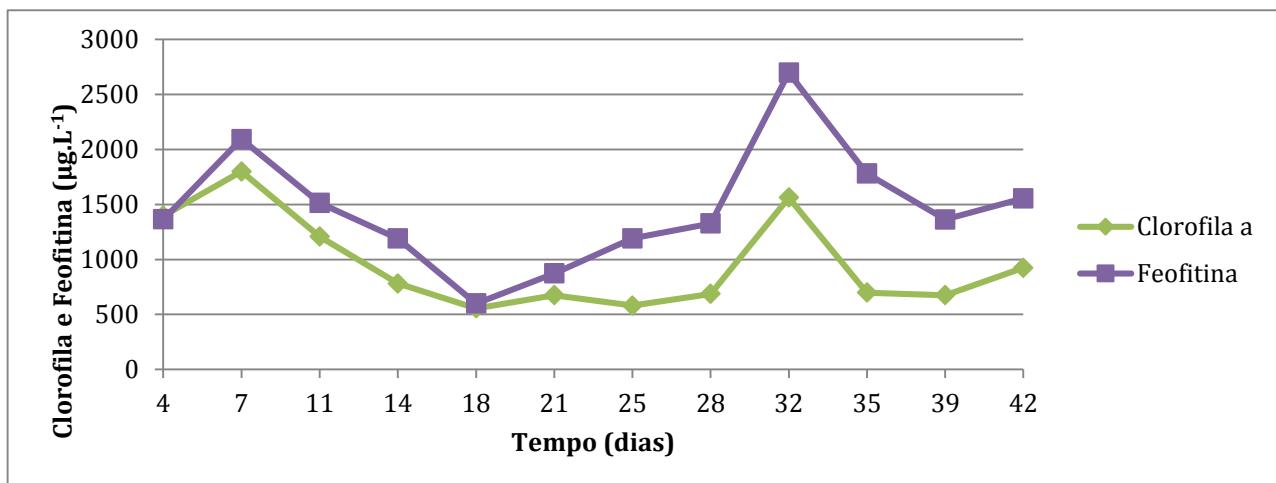


Gráfico 9. Clorofila-a e feofitina do segundo teste do FBRC 1.

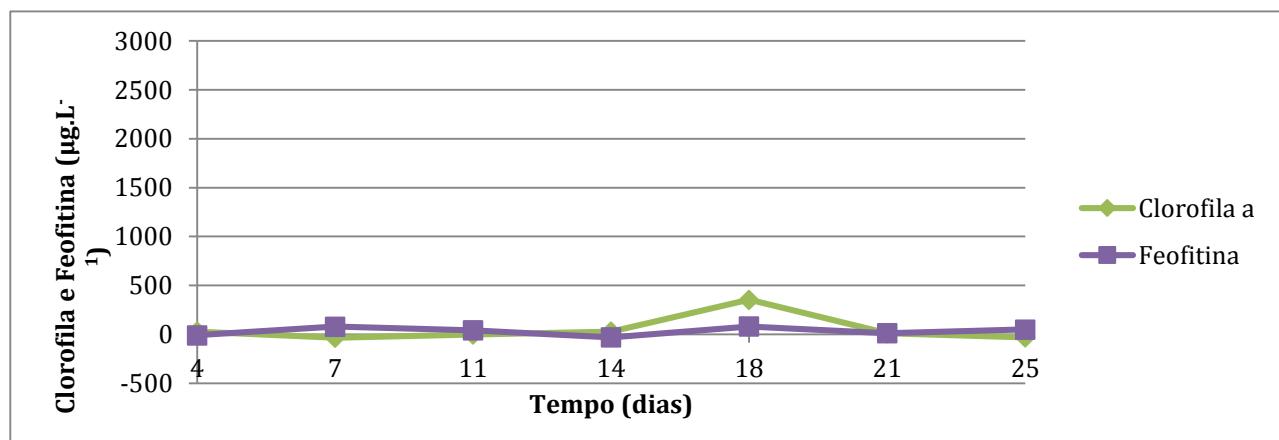
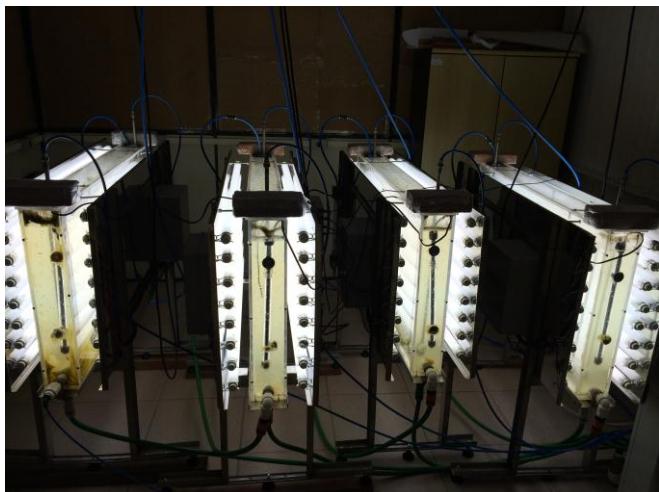


Gráfico 10. Clorofila-a e feofitina do segundo teste do FBRC 2.

No Gráfico 9, os valores de clorofila-a para o FBRC 1 ficaram mais constantes que os do primeiro teste, porém no FBRC 2 quase não houve presença de clorofila-a, a não ser, exclusivamente, no 18º dia de cultivo. Pode-se notar valores maiores de feofitina do que de clorofila-a no Gráfico 9, indicando que as microalgas estariam morrendo mais do que crescendo.

No sistema utilizando-se meio padrão WC modificado com glicerol, observou-se que a adição de glicerol proporcionou o crescimento de bactérias no meio e, tempos depois, o desenvolvimento de fungos, inibindo o crescimento das microalgas. A absorbância do efluente do sistema 2, nesse segundo teste, chegou a valores como 0,028 para  $\lambda$  de 665 e 685nm e 0,026 para  $\lambda$  de 750nm, indicando quase nenhuma presença da microalga nesse meio. Nas Figuras 13 e 14, pode-se observar a contaminação do sistema 2, pela imagem registrada após 23 dias de operação do segundo teste. Depois de 25 dias de cultivo, o sistema 2 precisou ser desligado e limpo antes do terceiro teste.



**Figura 13 - Foto do FBRC 2 no 23º dia de cultivo do segundo teste.**



**Figura 14 - Foto da primeira unidade do FBRC 2 no 23º dia de cultivo do segundo teste.**

### 5.1.3 Terceiro Teste

O FBRC 1 continuou operando com as mesmas variáveis do segundo teste, ou seja, vazão de 3,0 L.h<sup>-1</sup> e TDH de 3,5 dias. Como o sistema estava operando bem, resolveu-se, para o terceiro teste, retirar o inóculo do próprio FBRC 1. Assim, com as mesmas condições de inóculo, retirou-se 50% do volume de cada unidade do FBRC 1 e passou-se para a respectiva unidade do FBRC 2.



Figura 15 - Foto do dia zero do terceiro teste no FBRC 1.



Figura 16 - Foto do dia zero do terceiro teste no FBRC 2.

As Figuras 15 e 16 mostram as fotos do início do terceiro teste, assim que os dois FBRC foram inoculados e tiveram seu volume completado com meio padrão.

Os Gráficos 11 e 12 referem-se as análises de absorbância do terceiro teste. O primeiro sistema funcionou sem interrupções por 57 dias, porém, o FBRC 2 operou 14 dias com recirculação das unidades 4 para a 1 e mais 30 dias sem recirculação.

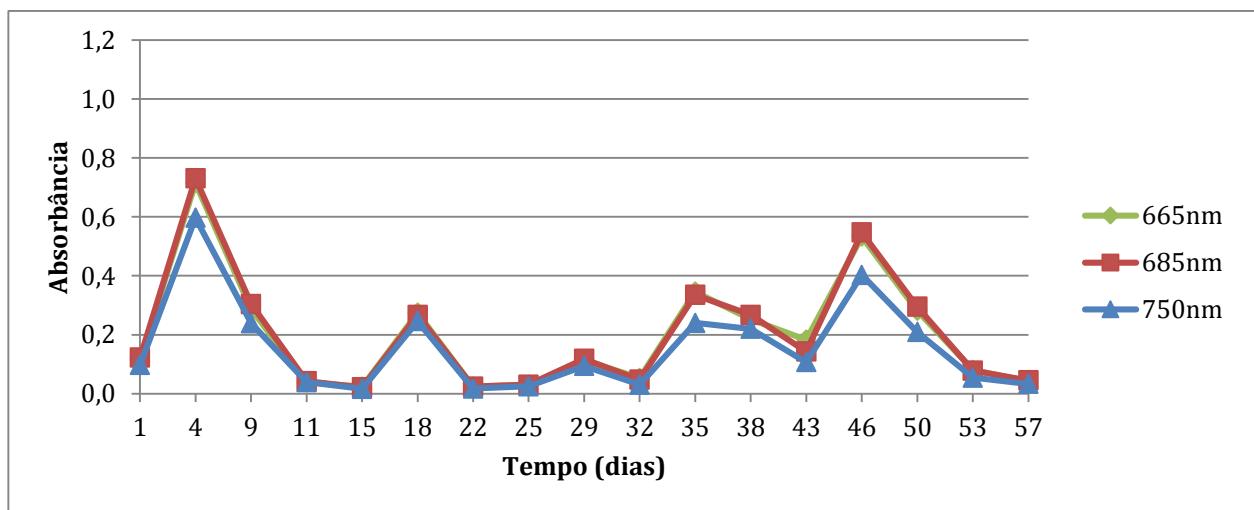


Gráfico 11. Absorbância (665, 685 e 750nm) do FBRC 1 no terceiro teste.

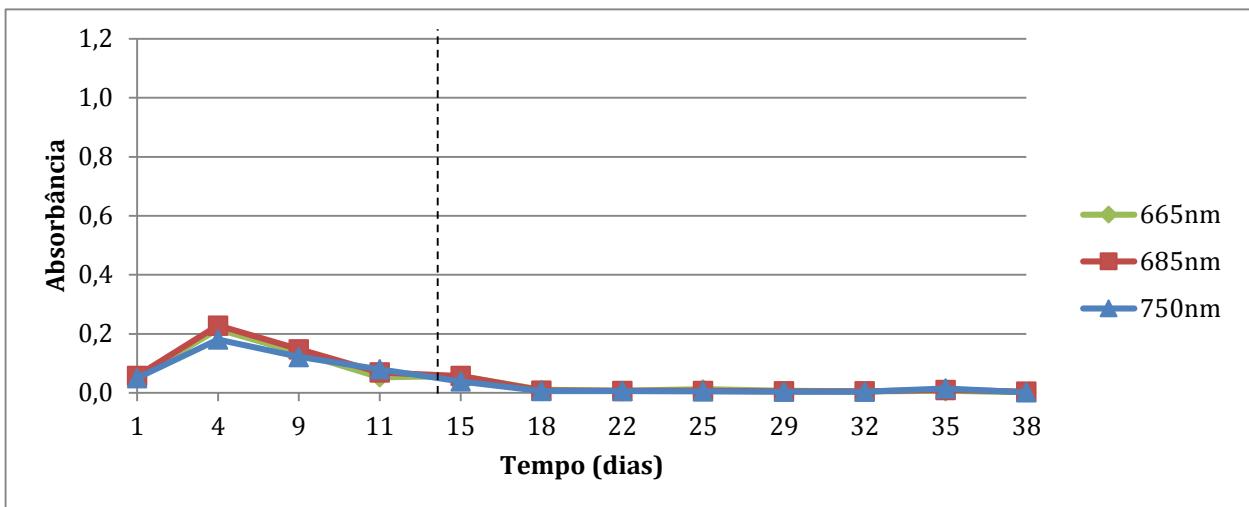


Gráfico 12. Absorbância (665, 685 e 750nm) do FBRC 2 no terceiro teste. A linha pontilhada vertical preta indica o dia que foi desligada a recirculação no FBRC 2.

O Gráfico 12 indica o momento que a recirculação foi desligada, no caso, 14 dias depois do início do cultivo do terceiro teste. Por esse gráfico, observa-se que com a recirculação a presença de microalgas não era representativo. No entanto, mesmo após a recirculação ser desligada na tentativa de recuperar o cultivo, a absorbância ainda assim aproximou-se de zero.

O Gráfico 13 e 14 mostram os valores de clorofila-a e feofitina para os dois FBRC no teste 3.

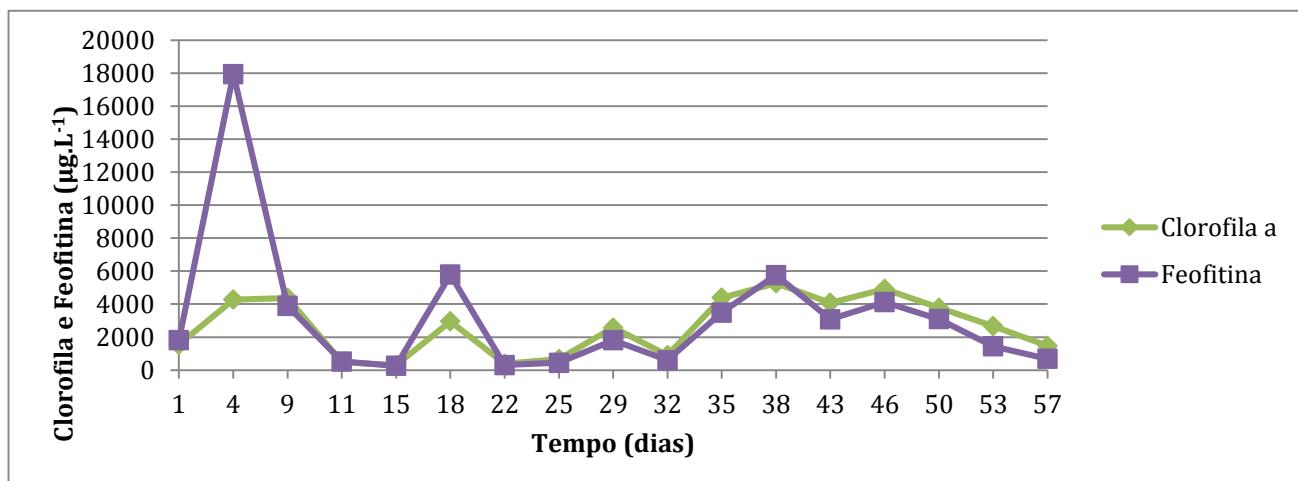


Gráfico 13. Clorofila-a e feofitina do FBRC 1 no terceiro teste.

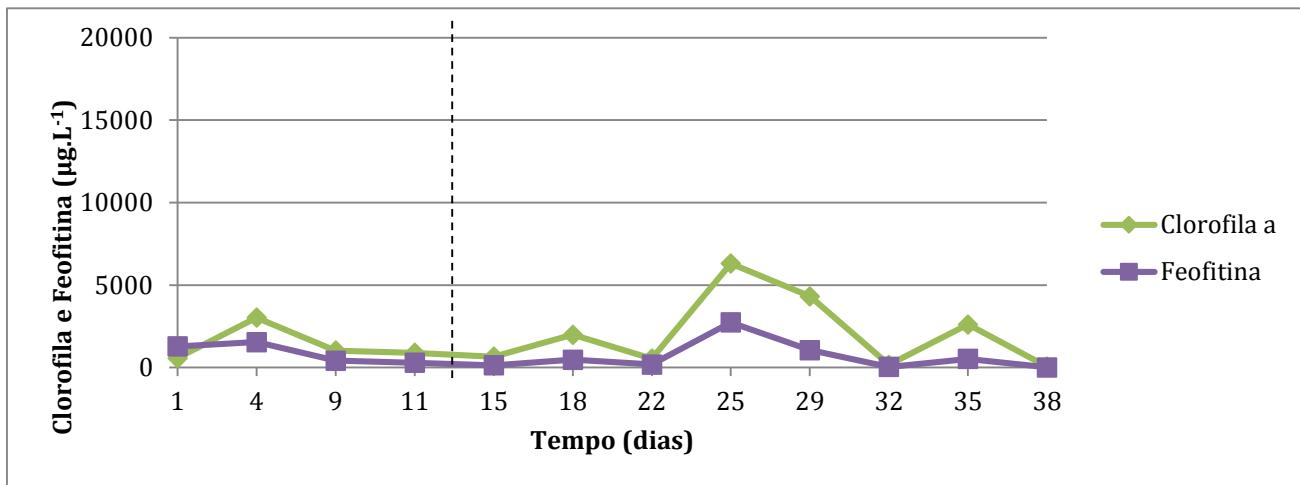


Gráfico 14. Clorofila-a e feofitina no FBRC 2 do terceiro teste. A linha vertical pontilhada preta indica o dia que foi tirada a recirculação.

Mesmo com alguns pontos fora da curva, o Gráfico 13 mostra a presença de microalgas no FBRC 1 no terceiro teste.

O Gráfico 14 indica que os valores de clorofila-a chegou a quase zero 11 dias depois do início do terceiro teste. Foi decidido retirar a recirculação e deixar o reator funcionando para ver se havia maior crescimento das microalgas. Depois de 14 dias com recirculação, a bomba foi desligada. Pode-se observar uma pequena melhora na presença de clorofila a 22 dias do início do cultivo. Porém, com a queda de clorofila-a depois do dia 29 e em seguida novamente no dia 38, o FBRC 2, operada por 30 dias sem recirculação, foi desligado. As Figuras 17 e 18 são as fotos do 38º dia de cultivo do terceiro teste, mesmo dia que o segundo sistema foi desligado. O FBRC 1 operou por 57 dias no terceiro teste e também foi desligado para estudo de alimentação das microalgas com vinhaça.



Figura 17 - Foto do 38º dia de cultivo do terceiro teste no FBRC 1.



Figura 18 - Foto do 38º e último dia de cultivo do terceiro teste do FBRC 2.

## 5.2 Utilização de vinhaça

### 5.2.1 Microfiltração

Para os estudos com a vinhaça, ela primeiro foi coagulada com 5mg.L<sup>-1</sup> de polímero catiônico e depois microfiltrada em filtro tipo Bag com 1,0µm de porosidade. A Tabela 6 apresenta os resultados das análises feitas com a vinhaça bruta e a microfiltrada.

**Tabela 6 - Análises feitas com vinhaça bruta, microfiltrada e a remoção durante o processo.**

Análise	Vinhaça Bruta	Vinhaça Microfiltrada	Remoção
pH	4,41	4,41	-
Cor Aparente (UC)	52700	42100	20%
Turbidez (NTU)	3887	3333	14%
Densidade óptica ( $\lambda = 254\text{nm}$ )	130,5	121,1	7%
DQO (mg.L <sup>-1</sup> )	35378	33351	6%
DBO (mg.L <sup>-1</sup> )	19264	17944	7%
Condutividade (ms.cm <sup>-1</sup> )	13,210	13,231	-
Tamanho médio das partículas (nm)	875,25	1059,5	-
ST (mg.L <sup>-1</sup> )	37487	36168	4%
SV (mg.L <sup>-1</sup> )	26859	25563	5%
SF (mg.L <sup>-1</sup> )	10628	10605	0%
SST (mg.L <sup>-1</sup> )	5108	4554	11%
SSV (mg.L <sup>-1</sup> )	4533	3881	14%
SSF (mg.L <sup>-1</sup> )	575	673	-

Continuação da Tabela 6.

Através da microfiltração tangencial realizada na vinhaça bruta, percebe-se que não houve mudança de pH. A cor aparente foi reduzida em 20%, a turbidez em 14% e a DQO em 6%. Depois do processo de coagulação os flocos não ficaram retidos nos poros do filtro, razão pela qual o tamanho médio das partículas não foi diminuído depois da microfiltração, ou seja, as partículas se reaglutinaram depois da microfiltração. Os sólidos suspensos voláteis foram reduzidos em 14%.

Quanto a remoção de metais e nutrientes após a microfiltração, observa-se a Tabela 7.

**Tabela 7 - Análise de metais e nutrientes da vinhaça bruta e microfiltrada.**

Análise	Vinhaça Bruta	Vinhaça Filtrada	Remoção
Alumínio (mg.L <sup>-1</sup> )	7,63	6,635	13%
Bário (mg.L <sup>-1</sup> )	3,73	2,94	21%
Cadmio (mg.L <sup>-1</sup> )	0,1415	0,135	5%
Cálcio (mg.L <sup>-1</sup> )	1847,5	1824	1%

<b>Chumbo (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	0,24	0,225	6%
<b>Cobalto (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	0,2425	0,2315	5%
<b>Cobre (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	0,3315	0,3035	8%
<b>Cromo (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	0,135	0,1235	9%
<b>Estrôncio (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	2,93	2,8315	3%
<b>Ferro (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	14,085	13,29	6%
<b>Fósforo (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	66,07	53,63	19%
<b>Fósforo Inorgânico (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	1,66	1,51	9%
<b>Magnésio (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	276,5	214,5	22%
<b>Manganês (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	5,11	4,975	3%
<b>Molibdênio (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<LD	<LD	-
<b>Níquel (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	0,2845	0,23	19%
<b>Nitrogênio (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	813,5	783	4%
<b>Nitrogênio Amoniacal (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	77	77	0%
<b>Potássio (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	4775	4590	4%
<b>Prata (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	0,0365	0,0335	8%
<b>Sódio (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	43,25	43,05	0%
<b>Zinco (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	0,481	0,4635	4%

Por esta tabela identifica-se que a remoção pelo processo de microfiltração não foi eficiente, sendo a maior remoção de 22% do magnésio.

### 5.2.2 Primeiro teste com vinhaça

Depois da caracterização da vinhaça utilizada nesta pesquisa, o primeiro teste foi estudar o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris* sem a esterilização da vinhaça e com TDH de 7 dias. Nas Figuras 19 e 20 podem ser observados os dois sistemas de FBRC no 10º dia de cultivo deste primeiro teste.



Figura 19 - Sistema FBRC 1 depois de 10 dias do início do primeiro teste.



Figura 20 - Foto após 10 dias de cultivo com destaque da primeira unidade do FBRC 1 e presença de fungos.

Na Figura 20 tem-se em detalhe a primeira unidade do FBRC 1. Observam-se vários flocos brancos no meio de cultivo, identificando a contaminação por fungos.

Nas Figuras 21 e 22 pode ser observado o sistema FBRC 2.



Figura 21 - Sistema FBRC 2 após 10 dias de cultivo do primeiro teste.



Figura 22 - Primeira unidade do FBRC 2 após 10 dias de cultivo e em detalhe a espuma formada no topo do reator.

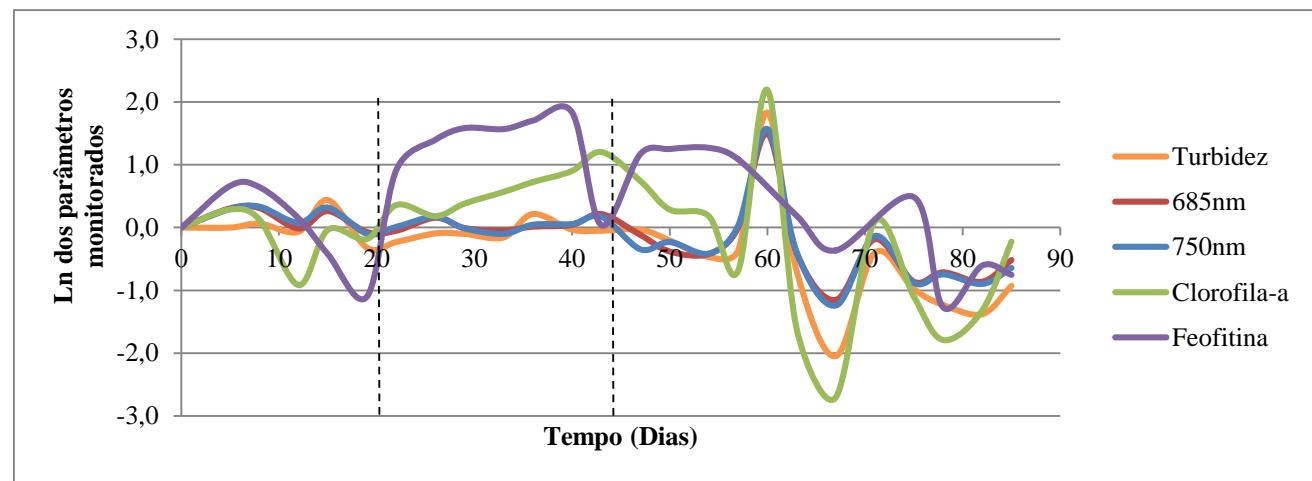
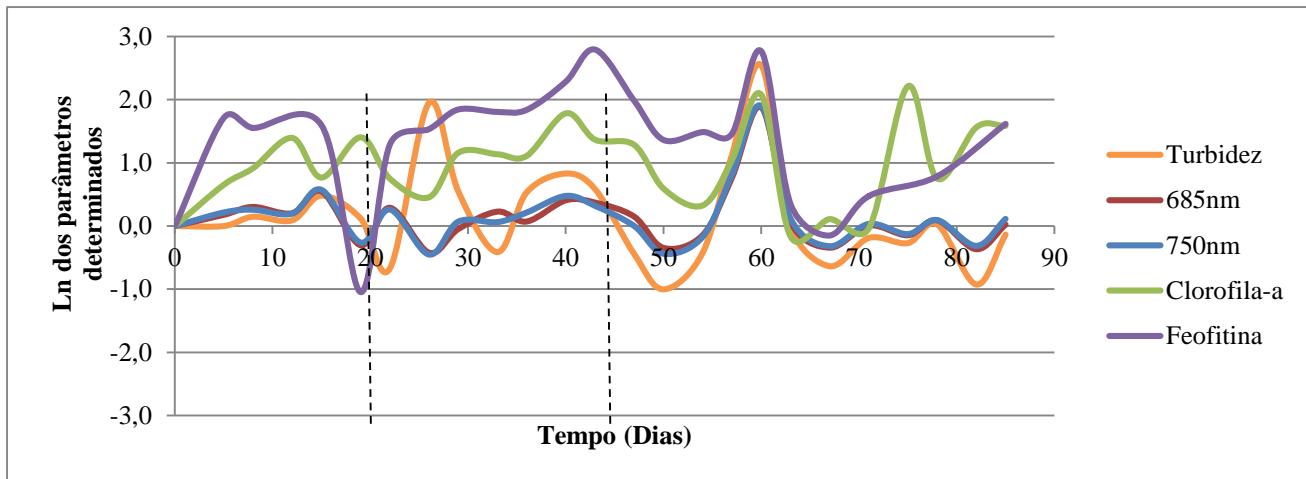
O sistema do FBRC 2 não apresentou contaminações por fungos, porém acumulou grande quantidade de espuma como pode ser visto em detalhe na Figura 22. A espuma, além de vazar do reator e causar perda de volume, também acaba arrastando microalgas para fora do meio de cultivo.

Devido a contaminação e forte presença de espuma logo no início do primeiro teste, não foram feitas análises e o mesmo foi encerrado para serem tomadas medidas corretivas.

### 5.2.3 Segundo teste com vinhaça

Por consequência dos resultados do primeiro teste, foi adotado a inclusão de antiespumante nos reservatórios de alimentação, além da esterilização da vinhaça para evitar contaminações.

Os Gráficos 15 e 16 apresentam as curvas normalizadas das análises de turbidez, densidade óptica 685 e 750nm, clorofila-a e feofitina. As análises são do efluente da quarta unidade de cada sistema FBRC. Deve-se notar que o dia zero dos gráficos representa o dia da primeira análise realizada (que foi feita dez dias depois da inoculação).



Nos Gráficos 15 e 16 está indicado por meio de linhas verticais pontilhadas pretas o dia em que foi adicionado inóculo de microalgas mantido em meio padrão nos FBRC.

No FBRC 1, no Gráfico 15, pode-se observar que há clorofila-a no sistema, embora todos os parâmetros analisados apresentem variações durante toda a operação. No Gráfico 16 faz-se a mesma observação, que os parâmetros não apresentam constância

em seus valores. Isso indica que as microalgas não se adaptaram ao meio e os dois FBRC não entraram em regime de operação.

O FBRC 2 não apresenta bons valores de clorofila-a como o sistema 1, embora os dois tenham sido operados nas mesmas condições e recebidos os mesmos inóculos, sem nenhuma diferença entre os sistemas, indicando a grande sensibilidade das microalgas em cultivo.

Os dois fotobioreatores contínuos foram desenvolvidos em série para que na primeira unidade predominasse o crescimento de microalgas mais jovens, na segunda e terceira aquelas já desenvolvidas e na quarta unidade as microalgas em fase de declínio. Assim, foram feitas análises de clorofila-a em todas as unidades dos dois FBRC para verificação do crescimento em escada, no caso de gráfico em forma de barras, como apresentado nos Gráficos 17 e 18.

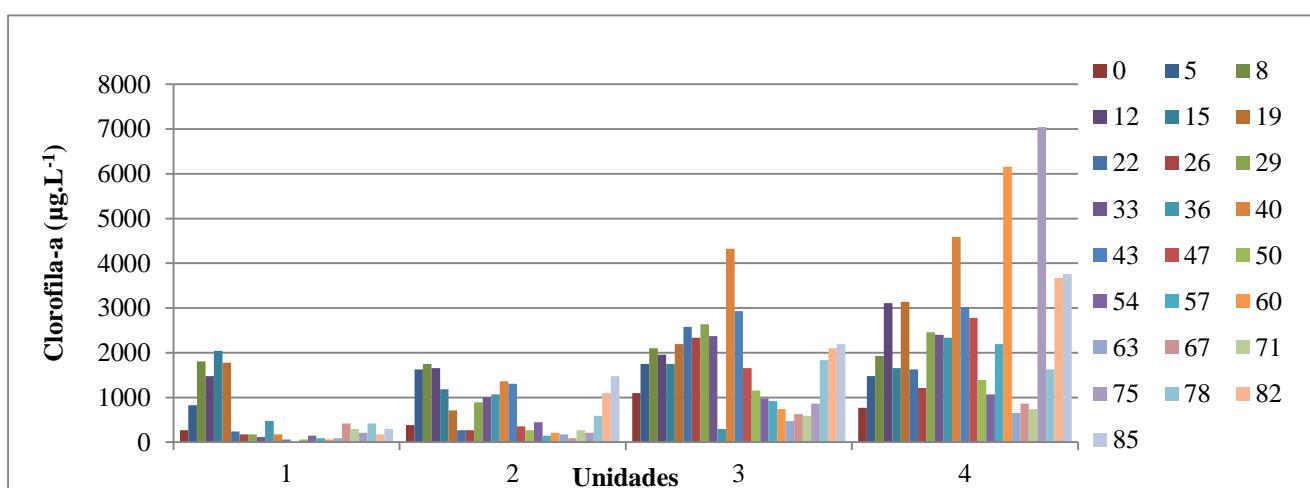


Gráfico 17. Análises de clorofila-a em todas as unidades do FBRC 1 no segundo teste com vinhaça.

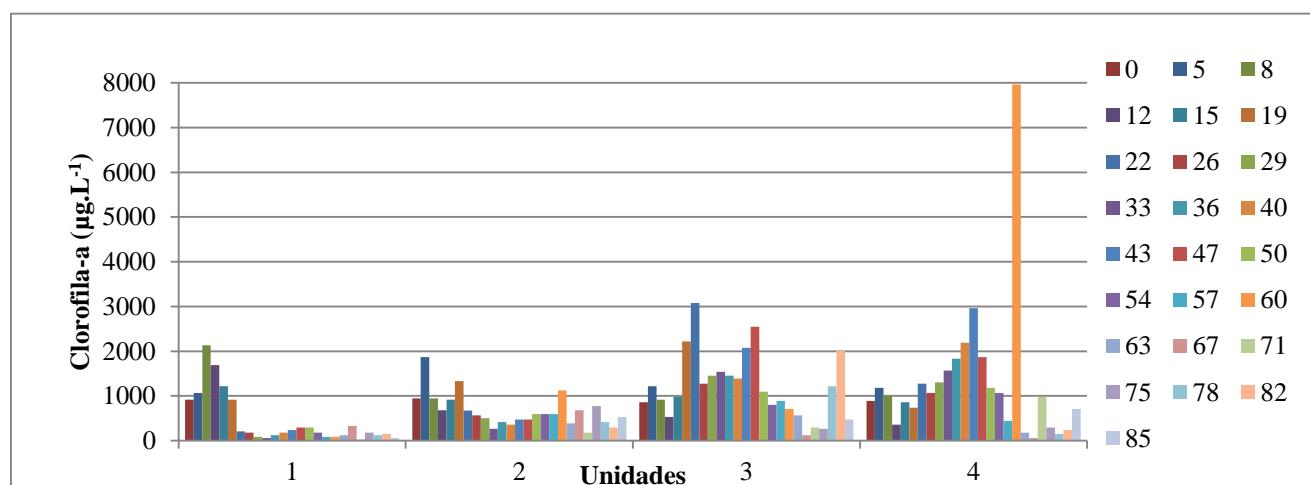


Gráfico 18. Análises de clorofila-a em todas as unidades do FBRC 2 no segundo teste com vinhaça.

Pelos resultados das análises de clorofila-a observa-se que os dois FBRC não apresentam crescimento escalonado, em escada, como era esperado para um FBRC em série. Além disso, as concentrações deveriam ser as mesmas, já que os dois sistemas foram operados nas mesmas condições e inóculo.

Foram feitas análises comparativas ao longo do ensaio sobre remoção de turbidez, absorbância em 254nm e DQO. Foi feita uma média das análises obtidas de 25 amostras dos reservatórios de alimentação e efluente da quarta unidade de cada FBRC. Os resultados são mostrados na Tabela 8.

**Tabela 8 - Média das análises de turbidez, absorbância (254nm) e DQO dissolvida de 25 amostras dos reservatórios de alimentação e efluente dos FBRC.**

	Turbidez	254nm	DQO dissolvida
<b>Alimentação 1</b>	217,36 ± 75,08	4,558 ± 0,169	930,35 ± 101,27
<b>Efluente FBRC 1</b>	173,35 ± 250,88	3,032 ± 0,135	237,4 ± 25,7
<b>Remoção1</b>	20%	33%	74%
<b>Alimentação 2</b>	260,00 ± 171,14	4,248 ± 0,215	878,42 ± 204,25
<b>Efluente FBRC 2</b>	123,29 ± 144,64	2,963 ± 0,138	240,8 ± 29,1
<b>Remoção2</b>	53%	30%	73%

Pelos dados apresentados observa-se grande diferença de remoção de turbidez entre os FBRC 1 e 2, o que não era esperado. Além disso, a remoção de turbidez não é um bom indicativo de tratamento de efluente, pois era esperado maior crescimento de microrganismos e, consequentemente, que a turbidez aumentasse em relação a vinhaça bruta. A absorbância em 254nm é o indicativo de presença de matéria orgânica dissolvida e houve uma remoção de 30% em relação a vinhaça pré-tratamento. A DQO dissolvida foi removida em 73%. Apesar da remoção de matéria orgânica dissolvida e DQO serem um bom indicativo, pela oscilação dos valores de clorofila-a, não é possível concluir se a remoção foi predominantemente causada por microalgas ou por bactérias.

No término da operação da pesquisa com vinhaça foram feitas análises extras de DQO bruta e dissolvida, cor aparente e verdadeira, pH, condutividade e SST. Foi analisada cada unidade dos FBRC, assim como a vinhaça nos reservatórios de alimentação.

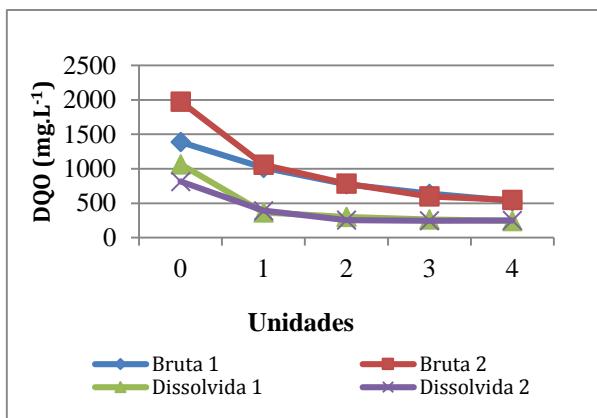


Gráfico 19. Análises de DQO bruta e dissolvida no último dia do segundo teste em todas unidades, sendo 0 o reservatório de alimentação, 1 o sistema FBRC 1 e 2 o sistema do FBRC 2.

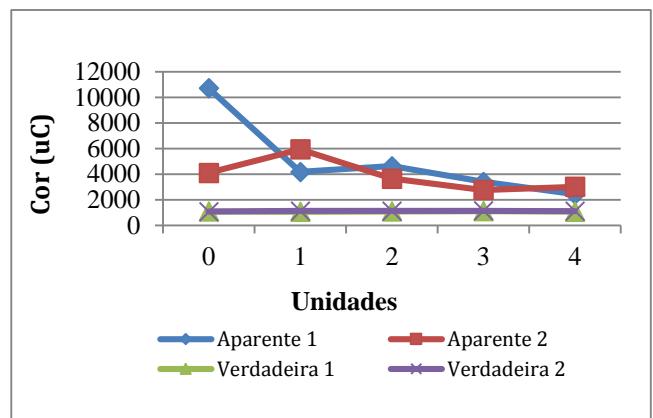


Gráfico 20. Análises de cor aparente e verdadeira no último dia do segundo teste em todas unidades, sendo 0 o reservatório de alimentação, 1 o sistema FBRC 1 e 2 o sistema do FBRC 2.

O Gráfico 19 refere-se a DQO bruta e dissolvida, sendo as amostras 1 (bruto e dissolvido) referente ao FBRC 1 e as amostras 2 (bruto e dissolvido) referente ao FBRC 2. Nota-se que houve remoção de DQO dissolvida ao longo da pesquisa comparando-se com a vinhaça antes de entrar no FBRC (unidade 0).

Já o Gráfico 20 mostra os valores de cor aparente e verdadeira. Os números nas legendas indicam a qual FBRC os valores representam. Não houve remoção de cor verdadeira nos reatores e as oscilações do gráfico referem-se a turbidez.

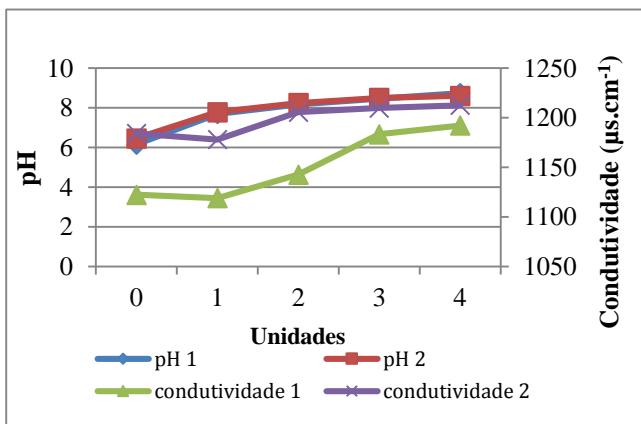


Gráfico 21. Análises de pH e condutividade no último dia do segundo teste em todas unidades, sendo 0 o reservatório de alimentação, 1 referente ao FBRC 1 e 2 referente ao FBRC 2.

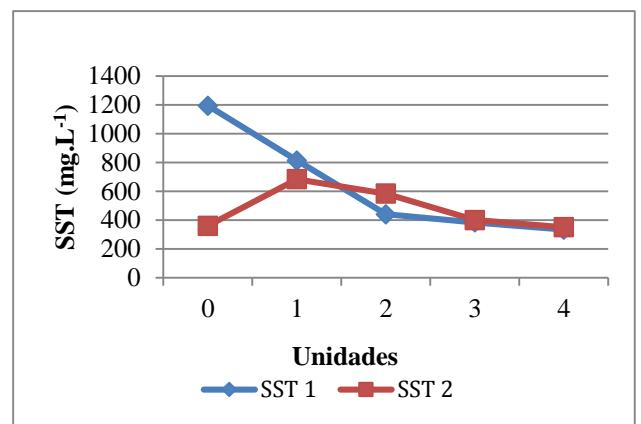


Gráfico 22. Análises de SST no último dia do segundo teste em todas unidades, sendo 0 o reservatório de alimentação, 1 referente ao FBRC 1 e 2 referente ao FBRC 2.

Pelo Gráfico 21 observa-se os valores de pH e condutividade dos FBRC, que seguiram a mesma tendência de crescimento quanto mais próximo da quarta unidade.

E o Gráfico 22 mostra as análises de SST nos dois sistemas, indicando grande diferença na unidade 0, ou seja, na fonte de alimentação, mesmo sendo duas fontes iguais. A diminuição da turbidez não era esperada, pois com o aumento do número de indivíduos, a turbidez deveria aumentar a cada unidade.

## 6. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos observa-se que a utilização de meio padrão WC modificado enriquecido com glicerol não foi indicada como fonte alternativa de carbono para os parâmetros utilizados, pois contribuiu para crescimento de bactérias e fungos e inibição das microalgas, contrariando a expectativa inicial dos estudos.

Dentre os testes realizados, a vazão de  $3\text{L.h}^{-1}$  e TDH de 3,5 dias obteve o melhor resultado para o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris*. No entanto, nessas mesmas condições e com recirculação de meio no sistema 2 de FBRC, caracterizado como terceiro teste, o crescimento da microalga não obteve melhores resultados.

Os ensaios com vinhaça demonstraram que é necessária a esterilização da mesma antes de ser usada como fonte de alimentação para microalgas. Apesar da DQO dissolvida ser positivamente reduzida por este método de tratamento não é possível determinar qual microrganismo foi responsável pela redução desta variável, uma vez que havia mais uma espécie de microalga além das bactérias. Entretanto, é importante destacar que é possível o crescimento da microalga em vinhaça.

Deve-se notar que a pesquisa foi realizada não somente com a microalga *Chlorella vulgaris*, mas em consórcio com alguma alga da espécie *Chlamidomonas*, ou seja, as condições adotadas nesta pesquisa não foram favoráveis a esse consórcio.

Uma sugestão seria esterilizar o meio padrão em autoclave, sendo uma forma de evitar que microrganismos como fungos e bactérias contaminassem o meio em estudo, entretanto agregando maior tempo e dificuldade para a pesquisa.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, Robert A. **Algal Culturing Techniques**. 589 p. Editora Elsevier. Oxford, UK, 2005.

BICHARA, Andressa. **Tratamento de vinhaça por processos físico-químicos de precipitação química, e flotação e sua utilização como meio de cultivo para a microalga de potencial energético, *Chlorella vulgaris***. 2014. 152 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014. Disponível em:<<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18138/tde-07012015-105855/pt-br.php>>. Acesso em: 14 set. 2015.

BIODIESELBR. Curitiba, 2006. Apresenta notícias relacionadas ao biodiesel. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/biodiesel/glicerina/biodiesel-glicerina.htm>>. Acesso em: 22 set. 2015.

BONINI, Mônica Albuquerque. **Cultivo heterotrófico de *Aphanothecace microscopica Nageli* e *Chlorella vulgaris* em diferentes fontes de carbono e em vinhaça**. 2012. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2012.

BRASIL. Decreto nº 76.593, de 14 de novembro de 1975. **Decreto Nº 76.593, de 14 de Novembro de 1975.** Disponível em: <<http://legis.senado.gov.br/legislacao/ListaPublicacoes.action?id=123069&tipoDocumento=DEC&tipoTexto=PUB>>. Acesso em: 15 set. 2015.

CENTURION, R. E. B, et. al. Destinação final da vinhaça produzida por destilarias de álcool. Revista DAE. n. 134, p. 107-112, 1983.

Coleção de culturas de microalgas do departamento de botânica, UFSCar, world data centre for microorganisms (WDCM 835), *Chlorella vulgaris* Beijerinck clone 097

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **P4.231: Vinhaça – Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola**. São Paulo, 2006. 12 p. Disponível em:

<[http://camarasambientais.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/49/2013/12/P4\\_231.pdf](http://camarasambientais.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/49/2013/12/P4_231.pdf)>. Acesso em: 21 set. 2015.

**FENG, Y.; LI, C.; ZHANG, D. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium.** *Bioresource Technology*, v. 102, p. 101-105, 2011.

**GRANATO, E. F.; SILVA, C. L. Geração de energia elétrica a partir do resíduo vinhaça.** In: ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL, 4.ed, 2002, Campinas. Disponível em:<[http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=MSC0000000022002000200006&lng=en&nrm=abn](http://www.proceedings.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=MSC0000000022002000200006&lng=en&nrm=abn)>. Acesso em: 22 set. 2015.

**GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. Yellow Green Algae with chlorophyllid-c. Journal of Psychology**, v.8, p.10-14, 1972 *apud* BONINI, M. A. Cultivo heterotrófico de *Aphanothecce microscópica Nagelie Chlorella vulgaris* em diferentes fontes de carbono e em vinhaça. 112 f. Dissertação - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2012.

**JUNIOR, S. O. N.; JUNIOR, S. N. M.; SEBASTIEN, N. Y.; COLDEBELLA, P. F.; TREVISAN, E.; AGUIAR, D. R. Potencial de crescimento de *Chlorella vulgaris*, em efluentes suínos para produção de biodiesel.** UNIOESTE. *Revista Brasileira de Energias Renováveis*, v.2, p. 23-33. Curitiba, 2013.

**LAIME, E. M. O.; FERNANDES, P. D.; OLIVEIRA, D. C. S.; FREIRE, E. A. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão.** *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas*, v.5, n.3, 29 p., 2011.

**LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos.** Química Nova, vol. 32, n. 6, p. 1596-1608. Salvador, 2009.

**MARINHO, Y. F.; SANTOS, A. P. F.; SANTOS, L. B. G.; VASCONCELOS, R. F. L.; KALAZANS, N. K. F.; NASCIMENTO, R. D. M.; DANTAS, D. M. M.; GÁLVEZ, A. O. Avaliação do crescimento da *Chlorella vulgaris* em diferentes pH objetivando sua inserção na matéria-prima do biodiesel.** Universidade Federal Rural de Pernambuco. IX Jornada de ensino, pesquisa e extensão. Pernambuco, 2009. Disponível em: <

<http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/r0160-2.pdf> Acesso em 21 set 2015.

NEDERLANDSE NORM. NEM 6520. Netherlands. 1981.

NUSH, E. A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment. *Arch. Hydrobiolol. Bech. Stuttgart.* v. 14, p. 14-36, 1980.

OLIVEIRA, H. T.; CÁCERES, O. **Resultados preliminares sobre o uso de vinhoto como meio de cultura para 8 espécies de microalgas de água doce.** *Acta Limnologica Brasiliensis*, v.1, p. 601-610, 1986.

PEQUENO, M.A.G.; SOARES, A.T.; SASSI, K.K.B.; SILVA, D.D.; SOUZA, A.G. **Avaliação do potencial do óleo da microalga cultivada *Chlorella sp.* por cromatografia gasosa.** *Revista Analytica.* n. 57. São Paulo, 2012.

PEREIRA, M. C.; ALQUINI, F.; GÜNTHER, W. M. R.; **Fertirrigação com vinhaça, aspectos técnicos, ambientais e normativos.** Departamento de Geografia, FFLCH, Universidade de São Paulo. XVIII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos. Campo Grande, 2009.

PÉREZ, Homero E. Bañados. **Biodiesel de microalgas.** Parte 1. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN). São Paulo. 2007.

RIPKA, R. et al. **Generic Assignments Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria.** *Journal of General Microbiology*, v.111, p. 1-61, 1979 **apud** BONINI, M. A. Cultivo heterotrófico de *Aphanothecace microscopica Nageli* e *Chlorella vulgaris* sem diferentes fontes de carbono e em vinhaça. 112 f. Dissertação - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2012.

SACCHI, G. D. **Flotação por ar dissolvido aplicado à separação de microalgas cultivadas em fotobioreator, alimentado com vinhaça pré-tratada físico-quimicamente, com vistas à exploração de seu potencial bioenergético.** Tese (Doutorado) a ser defendida – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

SAMSON, R., LEDUY, A. **Multistage Continuous of Blue-Green Alga *Spirulina maxima* in the Flat Tank Photobioreactors with Recycle.** Laval University. The Canadian Journal of Chemical Engineering, v. 63. Québec. 1985

SANTOS, L.B.G.; CALAZANS, N.K.F.; MARINHO, Y.F.; DOS SANTOS, A.P.F.; NASCIMENTO, R.D.M.; VASCONCELOS, R.F.L.; DÂNTAS, D.M.M.; GÁLVEZ, A.O. **Influência do fotoperíodo no crescimento da *Chlorella vulgaris* (Chloropyceae) visando produção de biodiesel.** Universidade Federal Rural de Pernambuco. Pernambuco. 2009.

TAM, N. F. Y.; WONG, J. P. K.; WONG, Y. S.; Repeated use of two *Chlorella* species, *C. vulgaris* and *WWI* for cyclic nickel biosorption. Environmental Pollution, v. 114, p. 85-92, 2001 **apud** BONINI, Mônica Albuquerque. **Cultivo heterotrófico de *Aphanothecce microscopica Nageli* e *Chlorella vulgaris* em diferentes fontes de carbono e em vinhaça.** 2012. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2012.

TEIXEIRA, Cláudia Maria. **Microalga como matéria-prima para produção de biodiesel.** Instituto Nacional de Tecnologia. Rio de Janeiro. 2006.

ÚNICA – União das indústrias de cana-de-açúcar. **Produção e uso do etanol combustível no Brasil.** São Paulo. 2007. Disponível em: <[http://www.ambiente.sp.gov.br/wp-content/uploads/publicacoes/etanol/producao\\_etanol\\_unica.pdf](http://www.ambiente.sp.gov.br/wp-content/uploads/publicacoes/etanol/producao_etanol_unica.pdf)> Acesso em: 21 set. 2015.

VASCONCELOS, R. F. L.; SANTOS, A. P. F.; MARINHO, Y. F.; SANTOS, L. B. G.; CALAZANS, N.K.F.; NASCIMENTO, R.D.M.; DÂNTAS, D.M.M.; GÁLVEZ, A.O. **Avaliação do crescimento de três microalgas: *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros calcitrans* e *Chlorella vulgaris*, visando à utilização como biocombustíveis.** Universidade Federal Rural de Pernambuco. IX Jornada de ensino, pesquisa e extensão. Recife, 2009. Disponível em: <<http://www.eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0160-1.pdf>> Acesso em: 21 set. 2015.

VIEIRA, D. B. **Fertirrigação sistemática da cana-de-açúcar com vinhaça.** Álcool e Açúcar, v. 6, n. 28. São Paulo, 1986.