

Henrique Cesar Venâncio

**INFLUÊNCIA DA RELAÇÃO SUPERFÍCIE/VOLUME EM
CULTURAS DESENVOLVIDAS EM UM SISTEMA LAMINAR
DE CULTIVO DE MICROALGAS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Grau de mestre em Aquicultura.

Orientador: Prof. Roberto Bianchini Derner.

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Venâncio, Henrique Cesar

Influência da relação superfície/volume em culturas desenvolvidas em um sistema laminar de cultivo de microalgas / Henrique Cesar Venâncio ; orientador, Roberto Bianchini Derner, 2018.

58 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Cultivo superintensivo. 3. Sistema em camada fina. 4. Produtividade. 5. Biomassa. I. Derner, Roberto Bianchini. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

**Influência da relação superfície/volume em culturas desenvolvidas
em um sistema laminar de cultivo de microalgas**

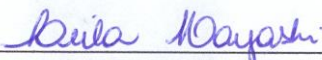
Por

HENRIQUE CESAR VENÂNCIO

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

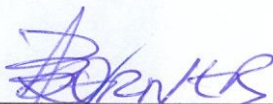
MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura.

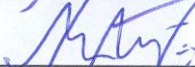


Profa. Leila Hayashi, Dra.
Coordenadora do PPG em Aquicultura

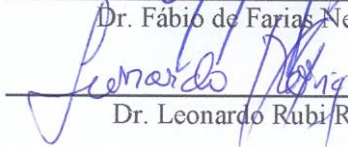
Banca Examinadora:



Dr. Roberto Bianchini Derner – *Orientador*



Dr. Fábio de Farias Neves - UDESC



Dr. Leonardo Rubi Rörig - UFSC

Este trabalho é dedicado aos meus
colegas de classe e a minha família.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe Alessandra Rossa.

À minha avó Terezinha Rossa e minha segunda avó Zeli Vieira.

Ao meu padrinho Edson Rossa.

Agradeço aos colegas de laboratório, Herculano, Tawane e Vinícius pelo auxílio nos experimentos.

Agradeço aos professores que desempenharam com dedicação as aulas ministradas.

Agradeço ao professor Roberto Bianchini Derner pela orientação, apoio e confiança nos trabalhos em que fui proposto a realizar.

Agradeço ao meu supervisor Rafael Garcia Lopes por todo seu conhecimento profissional.

Ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações - MCTIC e ao/ Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico - CNPq e Tecnológico no Projeto de Pesquisa “Produção de biomassa de microalgas em escala piloto para a obtenção de biodiesel” Processo: 407513/2013-2.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil - (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“- Quando eu cansei, eu dormi.
- Quando eu tinha fome, eu comi.
- Quando eu tinha que ir, você sabe, eu fui
- E foi assim que você chegou tão longe?
- Foi.”*

(Forrest Gump, 1986)

RESUMO

A biomassa de microalgas é fonte de uma vasta gama de compostos de elevado valor comercial: proteínas, carotenoides, lipídios e polissacarídeos, assim, as microalgas apresentam um grande potencial de aplicação em diversos processos biotecnológicos. O objetivo deste trabalho foi a determinação do efeito de diferentes razões entre a superfície iluminada e o volume de cultura (S/V) sobre os parâmetros de crescimento e do cultivo de *Scenedesmus obliquus* num Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas (SLCA). Foram empregadas duas razões S/V (80 m^{-1} e 60 m^{-1}), correspondentes a colunas d'água de 0,5 cm e 1,0 cm, respectivamente. As culturas foram comparadas quanto à biomassa máxima alcançada, à produtividade volumétrica e produtividade por área, à eficiência fotossintética, à conversão do CO_2 em biomassa e estimados os custos de produção da biomassa. Diariamente foram determinados os seguintes parâmetros: biomassa (g.L^{-1} , peso seco), nitrato (μM), oxigênio dissolvido (mg.L^{-1} , %), pH, temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e irradiância ($\mu\text{mol fótons.m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). A máxima biomassa alcançada foi $20,14 \text{ g.L}^{-1}$ nas culturas do tratamento S/V 80 enquanto no tratamento S/V 60 foi de $15,26 \text{ g.L}^{-1}$, gerando uma produtividade volumétrica máxima de 2,42 e $1,85 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectivamente. As culturas desenvolvidas com menor S/V foram mais eficientes em relação à conversão do CO_2 , chegando a alcançar 62% do carbono total ofertado, diferente às de maior S/V que atingiu 54%. Considerando o aproveitamento de energia incidente no período iluminado, as culturas com menor S/V resultaram numa eficiência fotossintética superior a 13%. Dessa forma o emprego do tratamento S/V 80 resultou maiores produtividades em volume e alcance máximo em biomassa, por outro lado as maiores eficiências de conversão do CO_2 e fotossintética são obtidas por uma relação S/V 60.

Palavras-chave: Aquicultura. Cultivo superintensivo. Sistema em camada fina. Produtividade. Biomassa.

ABSTRACT

Microalgae biomass is the source of a wide range of compounds of high commercial value: proteins, carotenoids, lipids and polysaccharides, thus, the microalgae present a great potential of application in several biotechnological processes. The objective of this work was the determination of the effect of different ratios between the illuminated surface and the volume of culture (S/V) on growth parameters and the *Scenedesmus obliquus* culture in a thin-layer system (SLCA). Two S/V ratios (80 m^{-1} and 60 m^{-1}) were used, corresponding to 0.5 cm and 1.0 cm water columns, respectively. Cultures were compared in terms of the maximum biomass reached, the volumetric productivity and productivity per area, photosynthetic efficiency, conversion of CO_2 into biomass and biomass production costs. The following parameters were determined daily: biomass (g L^{-1} , dry weight), nitrate (μM), dissolved oxygen (mg L^{-1}), pH, temperature ($^{\circ}\text{C}$) and irradiance ($\mu\text{mol photons s}^{-1}$). The maximum biomass reached was $20,14 \text{ g.L}^{-1}$ in S/V 80 cultures while in the S/V 60 treatment it was $15,26 \text{ g.L}^{-1}$, resulting a maximum volumetric productivity of 2,42 and $1,85 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectively. Cultures developed with lower S/V were more efficient in relation to CO_2 conversion, reaching 62% of the total carbon offered, different from those with higher S/V that reached 54%. Considering the energy utilization incident in the illuminated period, the cultures with lower S/V resulted in a photosynthetic efficiency higher than 13%. Thus, the use of the S/V 80 treatment resulted in higher yields in volume and maximum range in biomass; on the other hand, the higher CO_2 and photosynthetic conversion efficiencies are obtained by an S/V 60.

Keywords: Aquaculture. Mass culture. Thin layer cascade. Productivity. Biomass.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas: superfície de cultivo (A); coifa (B); reservatório (C), calha (D) e bombeamento (E). 32
- Figura 2 - Saturação do oxigênio dissolvido médio diário (%) (coluna cinza) correlacionados com a irradiância média diária (linha vermelha). 38
- Figura 3 – Concentração diária em biomassa (peso seco) dos cultivos. 40
- Figura 4 - Produtividade volumétrica diária..... 41
- Figura 5 - Razão de Eficiência Fotossintética (colunas) nos cultivos correlacionados com a irradiância média do dia (linha vermelha)..... 44
- Figura 6 – Carbono convertido em biomassa (coluna vermelha) e carbono total contido no CO₂ ofertado (coluna cinza)..... 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Especificações do Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas.....	34
Tabela 2 - Condições de Energia recebida nos cultivos outdoor desenvolvidos no Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas.....	37
Tabela 4 - Comparação de Sistemas Laminares de Cultivo de Microalgas em relação à S/V e produtividade por área.....	43
Tabela 5 – Quantidade em peso do carbono ofertado e convertido, a partir do carbono contido no CO ₂ total ofertado, em biomassa durante períodos de 1 a 10 e 11 a 15 dias e conversão média e máxima.	45
Tabela 6 – Dados de produção e custos de insumos e totais para produção de 1 quilograma de biomassa, considerando um período de 10 dias de cultivo.	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	MICROALGAS	21
1.2	SISTEMAS DE CULTIVO.....	23
1.2.1	Cultivo Fechado.....	24
1.2.2	Cultivo Aberto	24
1.2.3	Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas (SLCA)	25
1.3	OBJETIVO GERAL	27
1.3.1	Objetivos específicos	27
2	ARTIGO CIENTÍFICO	29
2.1	Introdução	30
2.2	Material e Métodos	31
2.2.1	Organismo e condições de cultivo do inóculo	31
2.2.2	Sistema Laminar de Cultivos de Microalgas	32
2.2.3	Delineamento experimental.....	33
2.2.4	Cálculos de Produtividade.....	34
2.2.5	Eficiência fotossintética	35
2.2.6	Conversão do CO₂ (gasoso) total ofertado.....	35
2.2.7	Estimativa do custo de produção de biomassa	36
2.3	Resultados e Discussão	36
2.3.1	Condições ambientais de cultivo	36
2.3.2	Produção de oxigênio dissolvido	37
2.3.3	Concentração em biomassa	39
2.3.4	Produtividade volumétrica.....	40
2.3.5	Produtividade por área.....	42
2.3.6	Eficiência fotossintética	43
2.3.7	Conversão do CO₂ (gasoso) total ofertado.....	45
2.3.8	Estimativa de custos da produção da biomassa.....	46

2.4	Conclusão	48
2.5	Agradecimentos	49
2.6	Referências	49
	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO.....	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 MICROALGAS

As microalgas têm sido foco de crescente atenção devido à grande diversidade de espécies e de suas aplicações em setores da indústria. A biomassa de microalgas é fonte de uma vasta gama de compostos de elevado valor: proteínas, carotenoides, lipídios, polissacarídeos etc., assim, as microalgas têm um grande potencial de aplicação em diversos processos biotecnológicos: produção de biocombustíveis, indústrias farmacêutica, de cosméticos, alimentícia e de rações animais, por exemplo (MARCHIN; ERPICUM; FRANCK, 2015).

Com o aumento pela demanda global de energia, devido à industrialização em larga escala e para os meios de transporte, gerou-se alta dependência por combustíveis fósseis, como o petróleo. Outros estudos relacionam a queima dos combustíveis fósseis com a geração de inúmeros problemas associados ao aquecimento global (MALCATA, 2011). Chen et al. (2011) relatam que o consumo de energia a partir de combustíveis fósseis representam 88% do consumo total de energia, enquanto a energia nuclear e hidrelétrica corresponde a 5 e 6% do total de energia primária, respectivamente. Ainda, a queima dos combustíveis fósseis é o maior contribuinte na formação dos Gases de Efeito Estufa na biosfera, não só contribuindo para o aquecimento global, mas também com outros impactos sobre o meio ambiente e a vida humana (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Esta situação levou à introdução de novas fontes alternativas de energia, com ênfase na busca por matérias-primas, como a biomassa, que pode ser convertida em biocombustíveis, estimando-se que a queima destes biocombustíveis possa emitir 40% menos CO₂ em relação aos combustíveis fósseis (PALOMINO, 2010).

Dentre as possíveis fontes renováveis de matéria-prima, a biomassa de microalgas tem sido considerada para diferentes tipos de biocombustíveis como: biodiesel - derivado dos lipídios de reserva, bioetanol - obtido através da fermentação dos carboidratos e metano - produzido a partir da digestão anaeróbia da biomassa (BRÁNYIKOVÁ et al., 2011, CHISTI, 2008).

Apesar do grande número de espécies, ainda há um abismo entre a quantidade de espécies de microalgas exploradas comercialmente e o real potencial biotecnológico deste grupo de micro-organismos (VONSHAK; RICHMOND, 1988; RICHMOND, 2000), principalmente

por que o cultivo em larga escala ainda é limitado pela engenharia aplicada aos sistemas de produção e pelo continuado estudo do efeito dos fatores biológicos nas culturas (JEREZ et al., 2014). Por exemplo, o uso eficiente da luz para alcançar elevada produtividade nos cultivos, o processo de separação da biomassa e o processamento da biomassa gerada devem ser melhorados para alcançar um eficiente uso de energia e de nutrientes (JEREZ et al., 2014).

Dentre diversos aspectos que devem ser considerados, para o desenvolvimento de um sistema eficiente de produção de biomassa de microalgas são necessários conhecimentos adequados da relação dos parâmetros ambientais com a fisiologia dos micro-organismos. Um dos maiores problemas, se não o maior, em processos de cultivo fotoautotróficos é a necessidade de luz como fonte de energia. Somente quando as culturas se encontram com baixas concentrações de biomassa a luz é distribuída adequadamente em toda a coluna d'água (JACOB; BUCHARSKY; GUENTERSCHELL, 2012). Segundo Masojídek et al. (2015), numa cultura, a irradiação média para cada célula microalgal é modulada não apenas pela radiação disponível no ambiente, mas também pela densidade da cultura, pela agitação do meio, pela profundidade da coluna d'água (trajeto de luz, ou passo óptico) que implica na frequência do ciclo de luz-escuro. Ainda, segundo os mesmos autores, a eficiência na utilização da luz é dependente da concepção da unidade de cultivo e da configuração espacial em relação à exposição ao sol.

Os principais critérios a serem considerados em relação à engenharia para o desenvolvimento de um sistema de cultivo eficiente incluem: disponibilidade de luz na coluna d'água, troca de gases do meio líquido para atmosfera e vice-versa e o correto dimensionamento da relação entre a superfície iluminada e o volume da cultura (DOUCHA; LÍVANSKÝ, 2006). Diversas soluções têm sido descritas na literatura, a maioria objetivando à melhoria no fornecimento de luz para as células microalgais. Exemplos de sistemas eficientes são os fotobiorreatores tubulares verticais e horizontais com diferentes configurações e os reatores de placas planas, com pequeno passo óptico (JACOB; BUCHARSKY; GUENTERSCHELL, 2012; BOROWITZKA, 1999). Doucha e Lívanský (1995), desenvolveram cultivos em sistemas operados com uma fina coluna d'água (sistema laminar ou *thin layer*) e relataram que uma camada (lâmina) com 0,7 cm permitiu uma muito eficiente utilização da luz solar, que, em geral, não pode ser alcançada por qualquer outro sistema de cultivo, seja aberto ou fechado.

Cultivos de *Scenedesmus* e *Chlorella* têm sido desenvolvidos em Sistemas Laminares e, devido ao melhor aproveitamento da luz – por conta da estreita coluna d'água e consequente diminuição do passo óptico –, nestes cultivos a utilização da luz é mais eficiente e permite que sejam alcançadas altas densidades microalgais com concentrações de biomassa entre 15-52 g.L⁻¹ (APEL et al., 2017; DOUCHA; LÍVANSKÝ, 2006; DOUCHA; STRAKA; LÍVANSKÝ, 2005; DOUSKOVA et al., 2009; JEREZ et al., 2014, 2016; MASOJÍDEK et al., 2011).

O conceito apresentado por Doucha e Livanský (2014) se trata de uma nova abordagem, onde o aumento da área de superfície do cultivo e a diminuição do volume da cultura visam contribuir para maior passagem de luz para as células (na zona iluminada), permitindo uma distribuição mais homogênea da luz e, consequentemente, uma melhor disponibilidade da energia luminosa pelas microalgas. Na busca por demonstrar este efeito, neste trabalho foi desenvolvido um Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas (SLCA, Figura 1), visando estudar o crescimento da microalga *Scenedesmus obliquus* em relação a fatores ambientais.

Embora a produção de microalgas em larga escala continue sendo um grande desafio, avanços nos campos da engenharia e da biologia pretendem desenvolver este processo de maneira ambientalmente amigável em poucos anos (WILLIAMS; LAURENS, 2010). No sentido de melhor eficiência na utilização da luz, uma quantidade considerável de pesquisas ainda deve ser gerada, com o desenvolvimento e experimentações a serem feitas para que a biomassa de microalgas possa ser produzida em uma escala suficientemente grande visando suprir à demanda.

1.2 SISTEMAS DE CULTIVO

A tecnologia de produção de microalgas em larga escala pode ser dividida em dois grandes grupos: sistemas de cultivo fechado e sistemas de cultivo aberto. Os sistemas de cultivo aberto quase sempre estão localizados no exterior (a céu aberto) e contam com luz natural para a iluminação das culturas, enquanto os sistemas fechados (no contexto de fotobiorreatores) podem estar localizados no exterior ou no interior (galpões e estufas) (BOROWITZKA, 1999). EXPOR COMO ESTA NA APRESENTAÇÃO.

1.2.1 Cultivo Fechado

Considerando exclusivamente o uso da luz, o objetivo primordial dos cultivos fechados ou fotobiorreatores é a maior exposição das células à iluminação, uma vez que, em sistemas com maior passo óptico (tanques, por exemplo) a luz pode se tornar intermitente, ou seja, as células estarão parte do tempo na zona iluminada e parte da zona escura da cultura (OJAMAE, 2011). Portanto, este assunto é essencial ao ser projetado um fotobiorreator, pois a melhora do regime de luz resulta em maior produção de biomassa (ZITTELLI et al., 2013).

Sistemas de cultivos fechados possuem algumas vantagens sobre os sistemas abertos convencionais, incluindo: baixo risco de contaminação, melhor controle de parâmetros de cultivo, como pH e temperatura, além de uma mistura uniforme do meio, permitindo que sejam alcançadas maior densidade celular e maior produtividade (UGWU; AOYAGI; UCHIYAMA, 2008). Em contrapartida, dependendo da transparência do material usado nas paredes dos fotobiorreatores associada à elevada densidade celular, pode existir uma baixa atividade fotossintética devido à diminuição da passagem da luz para o interior da cultura (DOUCHA; LÍVANSKÝ, 2014; KAREMORE, 2015). Pchara (2016) relatou que este fenômeno pode acarretar em até 100% de perda da luz incidente em apenas alguns centímetros de profundidade (passo óptico) do biorreator em culturas com biomassa de apenas 1,0 g.L⁻¹. Richmond (1999) reportou que, em fotobiorreatores planos com concentrações em biomassa acima de 10 g.L⁻¹ e, mesmo com baixo passo óptico e forte luz incidente, foi constatado que as maiores eficiências na produtividade fotossintética se davam até uma profundidade de 1,0 cm.

1.2.2 Cultivo Aberto

Os cultivos abertos são desenvolvidos em diversos tipos de tanques, sendo o *raceway* o mais comum. Os *raceways* são tanques longos, com uma parede divisória central, em torno da qual a cultura de microalgas circula impulsionada por meio de pás rotativas. São caracterizados por uma construção simples e custos relativamente baixos (MARCHIN; ERPICUM; FRANCK, 2015). Por outro lado, existem desvantagens deste tipo de sistema em relação à utilização da luz e à concentração da biomassa de microalgas, que não alcançam valores elevados (DOUCHA; LÍVANSKÝ, 2006). Essa concentração é considerada baixa nos cultivos de microalgas e aumenta risco de

contaminação das culturas por outras espécies de algas indesejáveis (DOUCHA; LÍVANSKÝ, 2006). Apesar do uso comum de raceways, o sistema tem muitos inconvenientes, resultando em produtividades baixas, dentre eles, alguns pontos podem ser destacados:

- O uso de uma coluna d'água alta, a concentração não deve ser superior a 600 mg. L⁻¹, cultivos com maiores concentrações, já testadas, a produtividade diminui acentuadamente (RICHMOND, 1988; GROBBELAAR; SOEDER; STENGEL, 1990; VONSHAK et al., 1996).

- A baixa velocidade do fluxo (10-30 cm.s⁻¹) da cultura pode resultar em fotoinibição das algas (em regiões tropicais) em intensificação de autossombreamento e no acúmulo de oxigênio na coluna d'água, aumentando assim a fotorrespiração e diminuindo a eficiência fotossintética e a produtividade (DEMIRBAS, 2010; PARK; CRAGGS; SHILTON, 2011);

- Devido ao grande volume dos cultivos, a energia térmica do sol acaba sendo acumulada durante o curso do dia, aumentando assim a temperatura da cultura, mantendo-se elevada até o período noturno onde se intensificasse a perda noturna da biomassa, pela respiração das células;

Recentemente, Liffman et al. (2013) avaliaram a velocidade de fluxo em raceways convencionais por Dinâmica de Fluido Computacional (DFC), mostrando que em situações de velocidade não homogênea em todo o sistema, existe a formações de zonas com baixo fluxo, onde ocorre distribuição heterogênea de nutrientes e CO₂.

1.2.3 Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas (SLCA)

Em sistemas laminares de cultivo (*thin layer*), a suspensão de microalgas é submetida ao escoamento sobre uma superfície plana exposta à radiação solar (SETLÍK; SUST; MÁLEK, 1970). Sistemas Laminares de Cultivo de Microalgas (SLCA) são caracterizados pela manutenção da cultura de microalgas em poucos milímetros de coluna d'água, geralmente sob céu aberto, em fluxo altamente turbulento, o que permite que seja alcançada elevada biomassa e conseqüentemente alta produtividade volumétrica e por área. A principal característica deste sistema é sua elevada razão entre a área de superfície exposta à iluminação e o volume total da cultura (S/V). A razão em torno de 100 m⁻¹, gera um aumento na área de cultivo (área fotossinteticamente ativa) e uma diminuição no volume total de cultivo em comparação com os tanques. Conforme Masojídek et al. (2011), unidades de cultivo com

relações S/V correspondentes a 100 m^{-1} proporcionam cultivos com concentrações 25-35 g.L^{-1} .

Estes sistemas acabam gerando vantagens em relação aos sistemas de cultivos abertos, como irradiância solar direta sobre a cultura, fácil perda de calor, fácil limpeza e manutenção e uma desgaseificação eficiente. Apesar de ser um sistema aberto, o sistema laminar apresenta características positivas encontradas nos sistemas fechados (operação em altas densidades de biomassa para alcançar alta produtividade volumétrica, MASOJÍDEK et al., 2015), sendo algumas desta esclarecidas:

- Em qualquer sistema de cultivo a temperatura é um parâmetro importante que deve ser adequado para cada espécie de microalga, não só para o crescimento eficaz de microalgas, mas também para promover o melhor metabolismo celular e a composição bioquímica adequada (JUNEJA; CEBALLOS; MURTHY, 2013).

- Alta turbulência da camada em suspensão fluindo a uma velocidade de $51\text{-}61 \text{ cm.s}^{-1}$ ao longo da superfície do sistema resulta numa elevada frequência de luz / escuro para as células microalgais individualmente, permitindo maior utilização da luz e reduzido efeito de fotoinibição (DOUCHA; LÍVANSKÝ, 2014).

- Em relação ao custo, o volume de cultura por unidade de área de cultivo é menor e a densidade de algas no momento da colheita mais elevada do que em sistemas tradicionais de cultivo, posteriormente reduzindo significativamente os custos de processamento (DOUCHA; LÍVANSKÝ, 2014).

Sistemas Laminares de Cultivo retêm facilmente o calor recebido através da irradiação solar, mas, por outro lado, são também rapidamente resfriados pela evaporação de água do meio de cultura (MASOJÍDEK et al., 2011). Um sistema laminar proporciona um elevado efeito de resfriamento, mesmo sob elevadas temperaturas do ar e alta irradiância solar, evitando o aquecimento excessivo do cultivo (DOUCHA, LÍVANSKÝ, 2006, 2009). Devido a uma camada muito fina de cultura de algas e a um baixo volume de cultura, a temperatura ótima de crescimento é rapidamente alcançada após o início do dia (DOUCHA; LÍVANSKÝ, 2014) em regiões temperadas.

Previamente no LCA foi implantado um SLCA em escala-piloto, baseado e adequado de modelos europeus, com uma S/V de 45 m^{-1} . Os testes iniciais de cultivo neste sistema mostraram a possibilidade de ser alcançada biomassa superior àquela obtida em cultivos tradicionais de microalgas, entretanto, foram necessários estudos mais detalhados das condições de operação da unidade, visando alcançar elevada biomassa e

produtividade. Dessa forma, neste trabalho, foi proposta uma série de cultivos experimentais considerando duas relações S/V e os parâmetros de crescimento e de cultivo foram correlacionados com as condições ambientais (climáticas).

1.3 OBJETIVO GERAL

Determinação dos parâmetros de crescimento e do cultivo de microalgas num sistema laminar (SLCA), empregando diferentes razões entre a superfície e o volume de cultura.

1.3.1 Objetivos específicos

- Determinar a biomassa máxima alcançada nas culturas;
- Determinar a produtividade volumétrica e por área;
- Determinar a eficiência fotossintética;
- Determinar a eficiência de conversão do CO₂ em biomassa.
- Estimar o custo de produção da biomassa.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo formatado segundo às normas da revista *Algal Research* (ISSN: 2211-9264, IF: 3,994, Qualis A1, Área Zootecnia e Recursos Pesqueiros).

Influência da relação superfície/volume em culturas desenvolvidas em um sistema laminar de cultivo de microalgas

RESUMO

A biomassa de microalgas é fonte de uma vasta gama de compostos de elevado valor comercial: proteínas, carotenoides, lipídios e polissacarídeos, assim, as microalgas apresentam um grande potencial de aplicação em diversos processos biotecnológicos. O objetivo deste trabalho foi a determinação do efeito de diferentes razões entre a superfície iluminada e o volume de cultura (S/V) sobre os parâmetros de crescimento e do cultivo de *Scenedesmus obliquus* num Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas (SLCA). Foram empregadas duas razões S/V (80 m⁻¹ e 60 m⁻¹), correspondentes a colunas d'água de 0,5 cm e 1,0 cm, respectivamente. As culturas foram comparadas quanto à biomassa máxima alcançada, à produtividade volumétrica e produtividade por área, à eficiência fotossintética, à conversão do CO₂ em biomassa e estimados os custos de produção da biomassa. Diariamente foram determinados os seguintes parâmetros: biomassa (g.L⁻¹, peso seco), nitrato (μM), oxigênio dissolvido (mg. L⁻¹, %), pH, temperatura (°C) e irradiância (μmol fótons.m². s⁻¹). A máxima biomassa alcançada foi 20,14 g.L⁻¹ nas culturas do tratamento S/V 80 enquanto no tratamento S/V 60 foi de 15,26 g.L⁻¹. gerando uma produtividade volumétrica máxima de 2,42 e 1,85 g.L⁻¹.d⁻¹, respectivamente. As culturas desenvolvidas com menor S/V foram mais eficientes em relação à conversão do CO₂, chegando a alcançar 62% do carbono total ofertado, diferente às de maior S/V que atingiu 54%. Considerando o aproveitamento de energia incidente no período iluminado, as culturas com menor S/V resultaram numa eficiência fotossintética superior a 13%. Dessa forma o emprego do tratamento S/V 80 resultou maiores produtividades em volume e alcance máximo em biomassa, por outro lado as maiores eficiências de conversão do CO₂ e fotossintética são obtidas por uma relação S/V 60.

Palavras-chave: Cultivo superintensivo. Sistema em camada fina. Produtividade. Biomassa.

2.1 Introdução

As microalgas têm tido empregadas na alimentação humana e animal e, por produzir inúmeros compostos valiosos, também podem ser empregadas na geração de biocombustíveis e nas indústrias farmacêutica e cosmética [1]. Apesar do grande número de espécies, ainda há um abismo entre a quantidade de espécies de microalgas exploradas comercialmente e o real potencial biotecnológico deste grupo de micro-organismos [2,3], principalmente por que o cultivo em larga escala ainda é limitado pela engenharia aplicada e por fatores biológicos que estão sendo estudados [4]. Provavelmente, o maior problema em processos de cultivo fotoautotróficos é a baixa disponibilidade da luz em culturas devido a estas estarem geralmente sendo cultivadas em tanques profundos, desta forma, a luz que cada célula recebe é modulada não apenas pela radiação disponível no ambiente, mas também pela densidade da cultura, turbulência e profundidade da coluna d'água [5,6].

Os principais critérios a serem considerados em relação à engenharia para o desenvolvimento de um sistema de cultivo eficiente incluem: disponibilidade de luz na coluna d'água, troca de gases do meio líquido para atmosfera e vice-versa e o melhor dimensionamento da razão superfície e volume (S/V) [7]. Diversas soluções têm sido descritas na literatura, tendo a maioria o objetivo da melhoria no fornecimento de luz para as células microalgáceas. Doucha e Lívanský (2014) desenvolveram cultivos em sistemas operados com uma fina coluna d'água (sistema laminar) e relatam que uma lâmina de 0,7 cm permitiu uma máxima utilização da luz solar, sendo que, em geral, os sistemas tradicionais de cultivo apresentam baixa utilização da luz, sejam abertos ou fechados.

Os Sistemas Laminares de Cultivo de Microalgas (SLCA) são caracterizados pela manutenção de um fluxo turbulento da cultura em poucos milímetros de coluna d'água, o que permite alta produtividade volumétrica e por área. Importante característica deste sistema é sua elevada razão entre a área de superfície iluminada e o volume total da cultura (em torno de 100 m^{-1}), ou seja, quanto mais elevada for esta razão, maior será o volume fotossinteticamente ativo em relação ao volume total da cultura. Por conta da estreita coluna d'água e consequente diminuição do passo óptico, a disponibilidade da luz nestes cultivos é mais eficiente e permite que sejam alcançadas altas densidades celulares e concentrações de biomassa entre $15 - 52 \text{ g L}^{-1}$ [8–11], bastante superiores a aquelas alcançadas em outros sistemas tradicionais de cultivo, como por exemplo nos raceways, que atingem

entre 0,5 e 1,0 g L⁻¹, e fotobiorreatores tubulares que geralmente atingem um máximo de 4 g L⁻¹ [12].

Cultivos tradicionais, principalmente o cultivo (fotoautotrófico), de microalgas em maior escala é realizado em tanques de grande volume (10.000 L, por exemplo). De forma generalizada, estes tanques são operados com coluna d'água chegando a até 1 m, assim, por conta desta profundidade as culturas alcançam baixa biomassa e, conseqüentemente, reduzida produtividade volumétrica, além disto implicar num excessivo gasto de água. Este cenário ocorre devido à atenuação luminosa causada pelo autossombreamento, e assim delimita a penetração de luz a apenas alguns centímetros da coluna d'água [13,14], limitando a distribuição homogênea de fótons luminosos para todas as células da cultura. Desta forma, grande parte da cultura microalgal permanece sob condições limitadas de luz, com baixa atividade fotossintética, e como consequência há menor síntese de biomassa.

Previamente foi desenvolvido um SLCA em escala-piloto, baseado e adequado de modelos europeus. Os testes iniciais de cultivo mostraram a possibilidade de ser alcançada biomassa superior àquela obtida em cultivos tradicionais de microalgas, entretanto, foram necessários estudos mais detalhados das condições de operação deste sistema, visando alcançar elevada biomassa e maior produtividade. Dessa forma, neste trabalho, se propôs a operação do Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas aplicando diferentes S/V (80 e 60) em culturas no exterior, sob condições climáticas naturais, bem como, estabelecendo as relações entre a cultura e as condições ambientais.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Organismo e condições de cultivo do inóculo

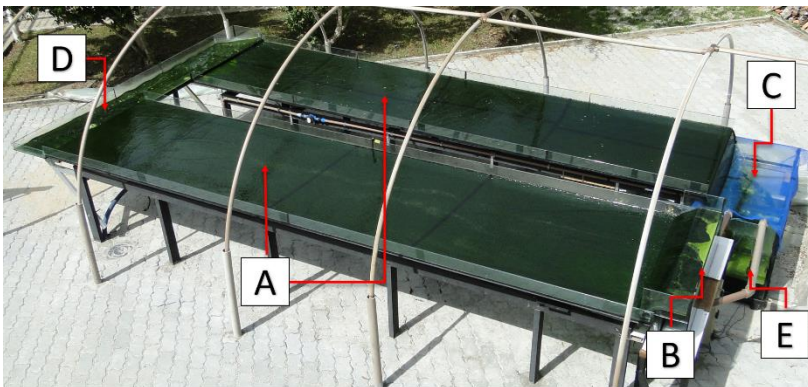
Nesse estudo foi utilizada uma cepa da microalga dulcícola *Scenedesmus obliquus* isolada e mantida no Banco de Cepas do Laboratório de Cultivo de Algas (LCA) da Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil. Para a produção dos inóculos foram desenvolvidas culturas utilizando Meio LCA-AD, baseado no Meio BBM, contendo quatro vezes a concentração de nitrato e reduzida três vezes a concentração de fosfato em relação ao Meio BBM original. Após o inóculo alcançar concentração de biomassa acima de 1,0 g.L⁻¹, foi então empregado ao Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas. As culturas no SLCA foram iniciadas com uma concentração mínima determinada visando à redução da possibilidade de ocorrer o efeito de saturação da luz, podendo causar fotoinibição, o que poderia levar ao

declínio na capacidade fotossintética e do crescimento das culturas [8,15–17]

2.2.2 Sistema Laminar de Cultivos de Microalgas

O SLCA empregado neste estudo consiste de cinco partes: superfície de cultivo, coifa, reservatório, calha e bombeamento, (Figura 1). Durante a operação do sistema a cultura foi permanentemente recirculada com auxílio de duas bombas hidráulicas. A coifa foi utilizada para diminuir a turbulência devido à alta vazão e elevada pressão na saída das bombas, a fim de manter a coluna d'água e velocidade desejada na superfície iluminada de cultivo. As superfícies de cultivo, coifa, reservatório e calha foram construídas empregando vidro e na estrutura foi instalada uma cobertura removível de lona plástica para cobrir as culturas no período noturno e em dias de chuva, para evitar a diluição das culturas). Para a circulação foram utilizadas duas bombas hidráulicas magnéticas submersas (Oceantech, Modelo AC20000, 200 W) com rotor aberto de plástico e inversor de frequência, afim de ajustar a rotação do rotor para obter diferentes vazões. Na Tabela 1 podem ser visualizadas as especificações do SLCA.

Figura 1 - Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas: superfície de cultivo (A); coifa (B); reservatório (C), calha (D) e bombeamento (E).



Para aumento da oferta de carbono, foi empregado CO_2 puro (100%) às culturas através de difusores de inox microperfurados. Cada difusor foi fixado na sucção das bombas hidráulicas para que as bolhas de CO_2 sofressem o efeito de cisalhamento (*shear effect*) resultando no aparecimento de microbolhas e aumentando o tempo de residência e a transferência de massa [7,11]. A vazão de entrada do gás foi mantida a 3

L.min⁻¹ e a dosagem do CO₂ gasoso foi subordinada pelo nível de pH do sistema determinado a operar em $8,5 \pm 0,2$. Para controlar a injeção do CO₂ e quantificar o volume empregado nas culturas foi utilizada uma unidade de monitoramento em tempo real (APEX Controller, Neptune Systems, USA). Além do dióxido de carbono, valores de pH, temperatura e irradiância foram monitorados diariamente e coletados a cada hora. As configurações do controlador foram definidas para manter o pH em $8,5 \pm 0,2$ nas culturas, durante o período diurno (08:00 – 18:00). Por conta da evaporação, foi realizado permanentemente o controle do nível de água no sistema, sendo adicionado quando necessário.

2.2.3 Delineamento experimental

Neste trabalho foram avaliados duas razões de superfície e volume 60 m⁻¹ e 80 m⁻¹, distribuídos em quatro cultivos sendo eles: T1-80, T2-80, T3-60 e T4-60. O valor da razão superfície e volume (S/V) foi obtido e calculado a partir da razão entre a área de superfície iluminada do cultivo (m²) e o volume total da cultura (m³). Para a obtenção das diferentes S/V foi necessário a alteração do volume total das culturas e variação na altura da coluna d'água de 1,0 cm aos cultivos do tratamento S/V 60 e 0,5 cm aos cultivos do tratamento S/V 80.

As culturas foram operadas em batelada alimentada, sendo reposto os nutrientes diariamente, pela manhã a partir do consumo de nitrato (NO₃) do meio LCA-AD. Foram retiradas amostras no início da manhã (08:00) para a realização de análises de nitrato (μM) e concentração de biomassa em peso seco (g.L⁻¹). Ao fim da tarde (18:00) foram novamente realizadas as análises para a determinação dos mesmos parâmetros da manhã. O valor de oxigênio dissolvido (% de saturação e mg. L⁻¹) foi determinado às 08:00, 10:00, 12:00, 14:00, 16:00 e 18:00, no início e final das superfícies iluminadas.

Tabela 1 - Especificações do Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas.

Parâmetro	Unidade	Valores			
		SV 60		SV 80	
Inclinação de rampa	m m ⁻¹	0,01		0,01	
Vazão	m ³ h ⁻¹	22		15	
Velocidade (calculada; medida)	m s ⁻¹	0,51; 0,50		0,33; 0,32	
Coluna d'água (calculada; medida)	cm	1,0; 1,1		0,5; 0,5	
Valor de Reynolds		6792		4395	
Área iluminada	m ²	14,5		14,5	
Razão Superfície Volume	m ⁻¹	60		82	
Volume das secções:		SV 60		SV 80	
Volume total de cultivo	L	241	100%	176	100%
Coifa ^b	L	37	15%	37	21%
Superfícies ^a	L	125	52%	62	35%
Calha ^a	L	38	16%	36	20%
Reservatório ^b	L	36	15%	36	20%
Tubulação ^b	L	5	2%	5	3%
Volume Iluminado ^a	L	163	68%	98	56%
Volume Escuro ^b	L	78	32%	78	44%

A concentração de nitrato foi determinada a partir do meio filtrado das amostras da cultura do SLCA, seguindo o método colorimétrico (HACH®). Para isso foi utilizado o reagente Permachem Reagent® NitraVer 5 e posteriormente lido em espectrofotômetro (410 nm). A concentração de biomassa (em peso seco) foi determinada por método gravimétrico [18].

2.2.4 Cálculos de Produtividade

Para obter valores de produtividade por área e volume foram utilizadas as equações 1 e 2, respectivamente.

$$P_{volume} = [CDW] \cdot T^{-1} \quad (1)$$

Onde a produtividade volumétrica (g.L⁻¹. d⁻¹) é a concentração da biomassa seca (CDW) em g.L⁻¹, pelo tempo de cultivo (dias).

$$P_{área} = (Pm \cdot V) \cdot A^{-1} \quad (2)$$

A produtividade por área ($\text{g.m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$) foi determinada pela produção (g) no volume total da cultura no dia, pela área de superfície total do cultivo (m^2).

A taxa de crescimento (T_x) foi calculada através da equação 3.

$$T_x = ([CDW_{dia}] \cdot [CDW_{cultivo}]^{-1}) \cdot 100 \quad (3)$$

Onde foi determinada pela razão entre a produtividade do dia (CDW_{dia}) pela concentração em biomassa do dia do cultivo ($CDW_{cultivo}$) multiplicados por 100.

2.2.5 Eficiência fotossintética

O cálculo de eficiência fotossintética (EF) foi feita baseada em metodologia já utilizada em SLCA na literatura [11], sendo calculada pela razão entre a quantidade de energia fixada (E_{fixada}) pela biomassa produzida no volume total da cultura ($V_{cultura}$), baseado num padrão de combustão energética para biomassa seca de microalgas, ΔH_C^0 de 20 kJ.g^{-1} [19] e a soma do PAR ofertado durante o dia ($E_{ofertada}$) em W.m^{-2} incidente na área (A_{reator}) do reator.

$$EF = E_{fixada} \cdot E_{ofertada}^{-1}$$

$$E_{fixada} = ((CDW_{t_2} - CDW_{t_1}) \cdot V_{cultura}) \cdot \Delta H_C^0 \quad (4)$$

$$E_{ofertada} = A_{reator} \cdot \int_{t_1}^{t_2} I_{PAR} dt$$

2.2.6 Conversão do CO_2 (gasoso) total ofertado

A fórmula para conversão do CO_2 ofertado foi baseada e adaptada em metodologia já utilizada na literatura [11]. Para determinar a eficiência da utilização de CO_2 (m_{CO_2}), relacionada a quantidade de carbono fixado em biomassa ($m_{(C, fixado)}$) pela quantidade de carbono contido no CO_2 (gasoso) total ofertado ($m_{(C, ofertado)}$) foi utilizada a seguinte equação:

$$m_{CO_2} = m_{(C, fixado)} \cdot m_{(C, ofertado)}^{-1}$$

$$m_{(C, fixado)} = 0,5 \cdot (CDW_{(t_2)} - CDW_{(t_1)}) \cdot V_{cultivo} \quad (5)$$

$$m_{(C, ofertado)} = ((F_{CO_2} \cdot T_{ON}) \cdot 22,47^{-1}) \cdot 12$$

Onde o conteúdo de carbono na biomassa para o cálculo de conversão foi considerado 50% [20]. A quantidade ofertada é calculada através do tempo (min) em que é injetado o CO_2 , proveniente de

cilindros pressurizados, durante o dia (T_{ON}) e o fluxo de CO_2 (F_{CO_2} , $L \cdot min^{-1}$). Para converter litros de CO_2 gasoso para gramas de carbono foi utilizada a Lei de Boyle-Mariotte, onde em condições de 1 atm e 25 °C, 22,47 L de CO_2 gasoso correspondem a 1 mol de dióxido de carbono. Cada mol de CO_2 possui 12 g de carbono, dessa forma foi possível obter os valores em massa do carbono ofertado.

2.2.7 Estimativa do custo de produção de biomassa

Os dados de custo de produção da biomassa foram determinados e normalizados pela produção de 1 kg de biomassa seca. Foram quantificados os gastos com energia elétrica, água, nutrientes e dióxido de carbono. O gasto do dióxido de carbono foi contabilizado a partir da coleta de dados na unidade controladora APEX, considerando o tempo de injeção e a vazão. No gasto de nutrientes foi contabilizado o volume de reposição diária nos cultivos, sendo o custo avaliado com base nos valores de mercado dos reagentes constados na composição do meio LCA-AD. Para o gasto com energia elétrica foi contabilizado o consumo da unidade de monitoramento e coleta de dados (APEX, 9 $W \cdot h^{-1}$) e de duas bombas hidráulicas com inversão de frequência alternando um consumo energético de 400 $W \cdot h^{-1}$ (S/V, 60) e 200 $W \cdot h^{-1}$ (S/V, 80). Os valores de custeio com água e energia elétrica, em ambos os experimentos, foram calculados com base nos valores cobrados pelas companhias responsáveis pela distribuição destes serviços para o estado de Santa Catarina, Brasil. Os valores de potência, preço de reagentes analíticos e CO_2 foram derivados de informações de fornecedores dos equipamentos elétricos, das empresas fornecedoras de reagentes e de dióxido de carbono.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Condições ambientais de cultivo

Conforme apresentado na tabela 2, o cultivo T1-80 recebeu o maior período em que o dia (08:00 – 16:00 h) se manteve uma radiação média acima de 1.000 $\mu mol \cdot fótons \cdot m^2 \cdot s^{-1}$, característica de dias ensolarados e céu aberto, de 84% dos dias totais de cultivo, seguidos por T4-60, T2-80 e T3-60 com período ensolarado de 76%, 69% e 47%, respectivamente. Dias de cultivo com valores de irradiância abaixo de 1.000 $\mu mol \cdot m^2 \cdot s^{-1}$, foram causados por dias nublados, chuvosos.

Tabela 2 - Condições de Energia recebida nos cultivos outdoor desenvolvidos no Sistema Laminar de Cultivo de Microalgas.

Itens	Unidade	T1-80	T2-80	T3-60	T4-60
Energia Total	MJ	3.058	1.793	1.998	2.377
Período > 1 mmol	%	84	76	47	69

Em relação a temperatura os cultivos alcançaram valores máximos oscilando entre 38 e 40 °C, e valores mínimos oscilando entre 20 e 24 °C. Neste estudo, a evaporação nos cultivos T1-80, T2-80, T3-60 e T4-60 foi de 5,5, 7,2, 6,5 e 6,0 L.m⁻². d⁻¹, respectivamente, sendo similar a valores reportados por Doucha e Lívanský (2009), Morales-Amaral et. al. (2015) e Apel et. al. (2017) de 6,0, 5,0 e 7,4 L.m⁻². d⁻¹ em sistemas laminares, respectivamente. Como já esperado em cultivos outdoor onde as culturas desenvolvidas receberam diferentes quantidades de energia, períodos distintos de céu aberto e condições climáticas específicas [1,8], as quais implicam diretamente nas respectivas produções, produtividades e eficiências [21]

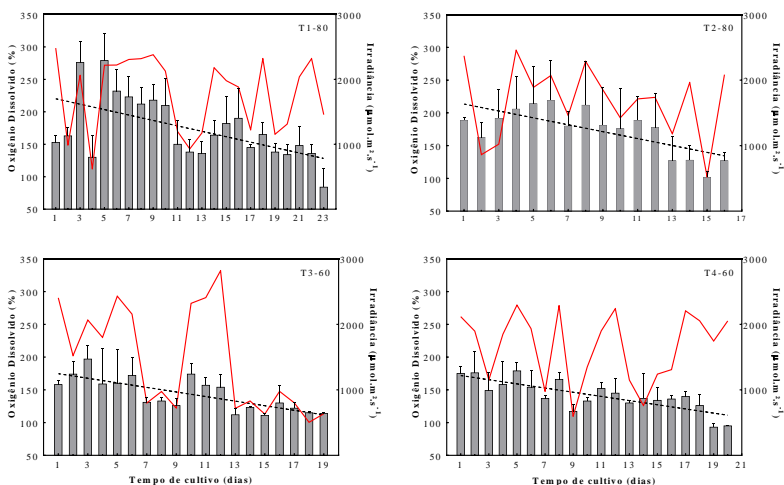
2.3.2 Produção de oxigênio dissolvido

Na figura 2 são apresentadas as concentrações de oxigênio dissolvido em saturação (%) observadas nas culturas T1-80, T2-80, T3-60, T4-60. Foi possível observar quanto as diferentes razões S/V que no tratamento S/V 80 (figura 2) resultou numa saturação média de 205 ± 50% e 192 ± 17% e valores máximos de 280% e 220% em dias iniciais nos cultivos T1-80 e T2-80, respectivamente, contrários aos observados no tratamento S/V 60 onde a média de saturação em dias iniciais foi de 158 ± 21% e 154 ± 20% e valores máximos de 172% e 175% nos cultivos T3-60 e T4-60, respectivamente. No tratamento S/V 80 há maior saturação de oxigênio dissolvido, médio e máximo na cultura, possivelmente devido a este expressar menor atenuação da luz incidente no início do cultivo, sendo que em apenas 0,5 cm de coluna d'água já possível haver 56 % de atenuação da luz ao fundo da cultura [10], podendo assim proporcionar maior atividade fotossintética à células suspensas em relação ao tratamento S/V 60.

Observa-se na figura 2, uma tendência de maior saturação do oxigênio no período inicial dos cultivos, possivelmente relacionada com o momento de maior atividade fotossintética, motivada pela melhor distribuição da luz nas culturas devido à baixa concentração celular – menor autossombreamento [7]. Como apresentado na figura 2, no decorrer dos períodos de cultivo houve uma diminuição da saturação que podem estar associadas ao início de uma fase de transição do

crescimento exponencial para estacionário. Esta fase do cultivo inicia-se devido a uma limitação no crescimento derivado da ausência de alguma fonte precursora de fotossíntese, entretanto neste estudo estes insumos, como por exemplo nutrientes, água e CO_2 , são fornecidos diariamente e de forma automática pelo sistema não havendo limitação dos mesmos. Por outro lado, o fornecimento de luz acaba por ser um fator limitador no crescimento das microalgas justamente causado pelo aumento de concentração celular o qual implica no surgimento de um auto sombreamento das células e dessa forma a produtividade e consequentemente a produção de metabólitos é diminuída [1,7,10].

Figura 2 - Saturação do oxigênio dissolvido médio diário (%) (coluna cinza) correlacionados com a irradiância média diária (linha vermelha).



A produção de oxigênio da cultura é proveniente da atividade fotossintética, por outro lado, maiores concentrações de oxigênio observadas dentro da cultura não estariam totalmente ligadas a atividade fotossintética da microalga, mas sim da capacidade do sistema em manter trocas gasosas entre a cultura e o ar atmosférico, pois a metodologia deste estudo quanto a medição dos valores na produção de oxigênio se refere à concentração na cultura e não do metabolismo das células em si, essa discussão é interessante devido a alguns estudos atribuírem a maior transferência de massas de gases em cultivos com maior nível de turbulência do sistema [7,10,22–24], ou número de Reynolds, ou seja, os maiores níveis de oxigênio obtidos verificados na cultura dos cultivos T1-80 e T2-80 são atribuídos a baixa turbulência.

Nos cultivos T1-80 e T2-80 foram verificadas as maiores concentrações do OD, baixa troca gasosa com o ar, e turbulência gerada de apenas 4339_{Re} contra 7349_{Re} dos cultivos T3-60 e T4-60 onde o gradiente de oxigênio foi mantido baixo, ou seja, maior transferência de massa gasosa do sistema com o meio atmosférico ratificando as discussões dos demais autores.

2.3.3 Concentração em biomassa

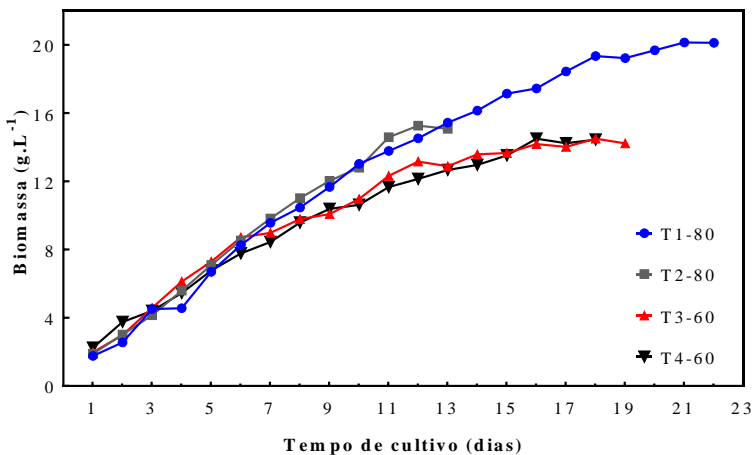
As curvas de crescimento em biomassa são apresentadas na figura 3, onde é possível observar que os quatro cultivos foram iniciados com biomassa similar, correspondente a $0,94 \pm 0,05 \text{ g.L}^{-1}$. No tratamento de maior razão S/V (80) foi alcançado biomassa máxima (peso seco) de $20,14 \text{ g.L}^{-1}$ e $15,26$ nos cultivos T1-80 e T2-80, respectivamente. Na menor razão S/V (60) foi alcançado $14,18$ e $14,60 \text{ g.L}^{-1}$ nos cultivos T3-60 e T4-60, respectivamente. Cultivos em Sistema Laminar são caracterizados por atingir grande concentrações em biomassa que variam de 42 até 52 g.L^{-1} [7,8,10,11]. Não foi possível alcançar concentrações em biomassa similar aos trabalhos citados provavelmente devido às diferenças de condições ambientais, a espécie da microalga, controle de parâmetros e até o tamanho em área dos sistemas laminares, por exemplo, trabalhos que alcançam concentrações maiores que 50 g.L^{-1} possuem controle maior de incidência e intensidade luminosa, temperatura e contam com sistemas de razão S/V de 160 [11].

Uma característica interessante foi a ausência da fase lag nas culturas, que é caracterizada por pequeno crescimento nos primeiros dias, devido à aclimação das células às novas condições de cultivo [11,16,25]. Possivelmente as culturas empregadas como inóculo já estavam aclimatadas àsquelas condições ambientais, além de que, os cultivos foram iniciados com biomassa elevada, permitindo o crescimento acelerado desde o início dos cultivos.

Como pode ser visto na Figura 2 a concentração máxima alcançada em biomassa foi similar nas culturas do tratamento S/V 60, inclusive o período de cultivo, por outro lado, as culturas da razão S/V 80 mantiveram um crescimento parelho até o 12º dia, onde no cultivo T2-80 ocorreu uma redução acentuada do crescimento enquanto no T1-80 foi mantido por mais 6 dias. Justamente no 12º dia de cultivo no tratamento T2-80 foi registrado uma diminuição abrupta da incidência luminosa e temperatura, interferindo na velocidade de crescimento do cultivo T2-80, possivelmente causando essa diferenciação na curva de crescimento entre os cultivos T1-80 e T2-80.

Entre tratamentos, a relação entre superfície e volume de 80 , com o cultivo T1-80, alcançou maior biomassa e concentrou 5 g.L⁻¹ a mais em relação aos cultivos de razão S/V 60, demonstrando que cultivos com maior S/V permitem maior concentração em biomassa em relação aos de menor S/V [8,10], provavelmente devido a maior disponibilidade de luz às células já que é operado com metade da coluna d'água (0,5 cm), permitindo que a produtividade e o alcance em biomassa não seja retardado pela ausência antecipada de luz na coluna d'água.

Figura 3 – Concentração diária em biomassa (peso seco) dos cultivos.



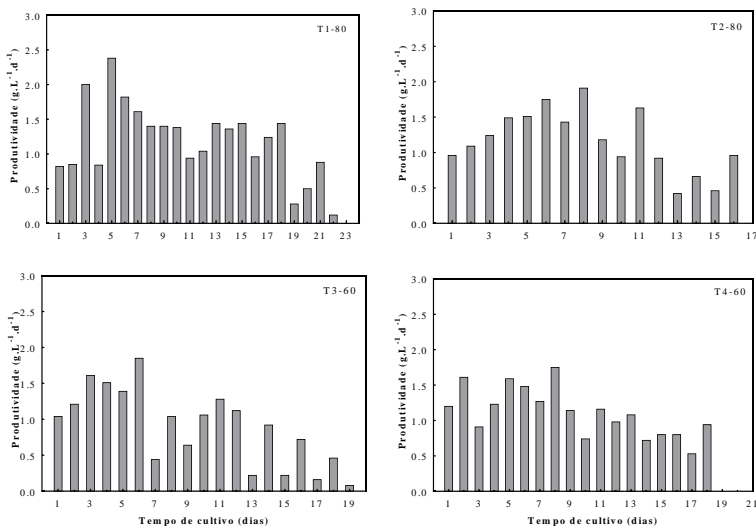
2.3.4 Produtividade volumétrica

Considerando o crescimento das culturas desde a inoculação até o início da fase estacionária, foram alcançadas produtividades médias de 1,19, 1,20, 0,97 e 0,95 g.L⁻¹. d⁻¹ nos cultivos T1-80, T2-80, T3-60 e T4-60, respectivamente. Valores obtidos de produtividade contabilizam o período de 10 dias, onde foram alcançadas taxas de crescimento similares, assim não tendo influência de diferentes períodos totais de cultivo pois a produtividade tende a se estabilizar conforme o aumento de biomassa [21,26], ou seja, quanto mais se prolonga um cultivo menor a produtividade volumétrica diária.

Os cultivos do tratamento S/V 80 atingiram valores máximos de 2,42 (T1-80) e 1,91 g. L⁻¹. d⁻¹ (T2-80) e 1,85 (T3-60) e 1,80 g.L⁻¹. d⁻¹ (T4-60), nos cultivos do tratamento S/V 60. Assim como foi verificado

em relação à biomassa, a produtividade diária nos cultivos de maior S/V resultaram em maiores valores [4,8,25,27]. Provavelmente, esta diferença ocorreu pelo fato de que em culturas com maior coluna d'água a luz que atravessa a cultura tenha sido atenuada e limitada ao chegar até o fundo. Culturas de *Chlorella* sp. em SLCA com apenas 0,6 cm de coluna d'água a uma concentração em biomassa de 2,0 g.L⁻¹ possuem atenuação em 52% da luz incidente [10]. Assim, estima-se que a atenuação de luz no tratamento S/V 60 seja maior do que ao tratamento S/V 80, onde possivelmente se manteve com ausência de uma região que limita a passagem de luz por um maior período em relação ao tratamento S/V 80. É possível constatar isto quando no tratamento S/V 80 com 0,5 cm de coluna d'água obteve produtividades acima de 1,0 g.L⁻¹.d⁻¹ durante 80% e 70% do período de cultivo, como observado na figura 4, e por outro lado, os cultivos com 1,0 cm de coluna d'água e de menores S/V (60) permaneceram durante 58% e 60% do tempo total de cultivo, mesmo com incidência luminosa acima de 1.000 μmol fótons.m².s⁻¹.

Figura 4 - Produtividade volumétrica diária.



Foi possível observar que os resultados de produtividade volumétrica média diária entre os tratamentos possuem uma diferença de 19% entre as diferentes colunas d'água. Na literatura foi observado menor diferença com cultivos de SLCA, diferenciando a coluna d'água

de 0,8 e 1,8 cm com produtividades 12% a mais em maior S/V [4]. Reconhecidamente, o aumento da S/V permite o alcance de maior produtividade devido a maior exposição de toda a cultura à luz por um maior período, entretanto, o fato de não ter ocorrido maior amplitude de produtividade média alcançada nas diferentes S/V pode estar relacionado à porcentagem do volume que se encontra iluminado em relação ao volume total de cultivo, como é demonstrado na Tabela 1. No tratamento S/V 80 operado no SLCA empregado neste estudo o volume que se encontra fotossinteticamente ativo é de 56%, ou seja, 44% do volume total se mantém concentrado em área não produtiva. No tratamento S/V 60, o volume maior se encontra na superfície iluminada por conta do dobro da coluna d'água, representando um volume ativo de 68% do volume total, dessa forma, a menor S/V proporcionou uma maior proximidade de produtividade média diária do tratamento S/V 80 possivelmente pela diferença entre o volume iluminado e o volume escuro.

2.3.5 Produtividade por área

Conforme pode ser visualizado na Tabela 4, a produtividade máxima por área foi de 22,70, 23,53, 31,85 e 30,13 $\text{g}\cdot\text{m}^2\cdot\text{d}^{-1}$ nos cultivos T1-80, T2-80, T3-60 e T4-60, respectivamente. Na comparação entre os tratamentos ficou evidente que as culturas com S/V 60 caracterizam-se por concentrar maior produção de biomassa por m^2 , isto devido ao volume por m^2 em S/V (80) ser de 5 L contra 10 L e S/V (60), devido a diferença de coluna d'água.

Podemos destacar que alguns sistemas [7,10,11,25,28,29] possuem uma S/V entre 35 e 63% maior do que os cultivos T3-60 e T4-60 e uma produtividade em área menor que varia de 6 a 112 % que o alcançado nos cultivos de S/V 60, isto demonstra que o SLCA neste estudo apresenta valores de produtividade maiores mesmo com menores razões de superfície e volume. Apenas os cultivos de Masojídék et al. [8] de S/V 102 e 138 apresentaram produtividades 12 % e 35 % maiores. A partir destas observações, o Sistema Laminar neste estudo atingiu valores de produtividade (biomassa) por área maior do que em sistemas com razões superfície e volume maiores, já concluídas anteriormente.

É importante salientar de que uma comparação direta entre os estudos não seria possível, pois o desempenho do processo depende da espécie, do design do reator, do período de cultivo e, o mais importante em cultivos *outdoor*, das condições climáticas da região [11,30].

Tabela 3 - Comparação de Sistemas Laminares de Cultivo de Microalgas em relação à S/V e produtividade por área.

Espécie	S/V	g.m ⁻² . d ⁻¹	Referência
<i>Chlorella</i> sp.	102	23,5	[7]
	102	30,0	[10]
	102	38,4	[8]
	133	52,1	[8]
	138	22,6	[28]
<i>Chlorella fusca</i>	120	27,0	[25]
<i>Nannochloropsis oculata</i>	160	25,0	[11]
<i>Scenedesmus obliquus</i>	88	15,0	[29]
	80	23,53	Neste estudo
	80	22,63	Neste estudo
	60	31,85	Neste estudo
	60	30,13	Neste estudo

2.3.6 Eficiência fotossintética

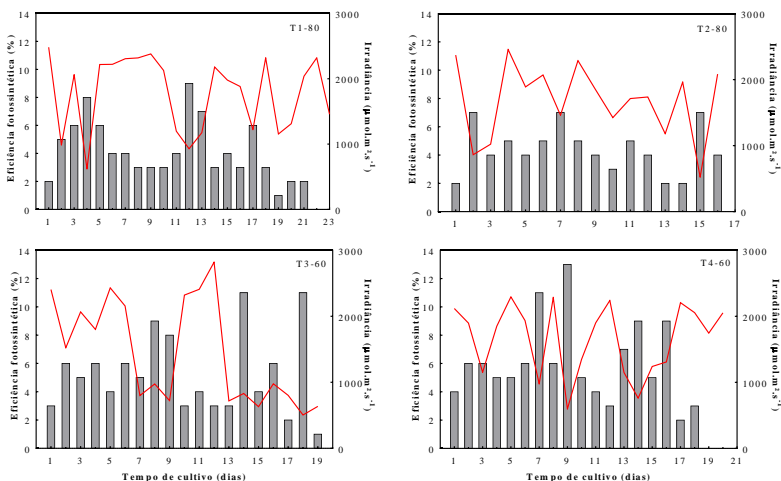
As médias da eficiência fotossintética (EF) alcançadas neste estudo foram de $4,26 \pm 2,07\%$, $4,44 \pm 1,56\%$, $5,18 \pm 2,78\%$ e $6,43 \pm 3,62\%$ em T1-80, T2-80, T3-60 e T4-60, respectivamente. Valores altos de desvio padrão são encontrados pelo fato de que, conforme a figura 10, há uma oscilação da eficiência fotossintética no decorrer do cultivo por conta das diferentes irradiâncias médias diárias. Por outro lado, foi possível obter valores de EF máximos de 9% e 7% nos cultivos do tratamento S/V 80 e 11 % e 14 % nos cultivos do tratamento S/V 60.

Conforme a figura 5, o tratamento S/V 60 levou a cultura a ter maior EF (valores acima de 5%) por 50% e 67% do período total de cultivo, contra 39% e 33% no tratamento S/V 80. A menor eficiência de conversão de luz em biomassa no tratamento S/V 80 pode estar ligado ao fato de que as células, devido menor coluna d'água, no qual expõe de modo excessivo à luz tenha causado efeitos de fotoinibição nas células [8,15–17,25,31,32]. Entretanto, não foi possível visualizar tal efeito, pois não houve queda na curva de crescimento em biomassa e ausência de uma fase lag (aclimação) como demonstrado na figura 2.

Por outro lado, o cálculo de eficiência fotossintética é definido como a fração da luz incidente que é armazenada como energia química pela biomassa presente no volume total do cultivo, assim, caso a cultura esteja com baixa concentração em biomassa, a energia solar ofertada

acaba por ser desperdiçada ou até mesmo sendo ofertada de forma excessiva, ou seja, energia de sobra para poucas células, permitindo que a luz atravessasse totalmente a coluna d'água não havendo absorção total dos fótons pelos pigmentos fotossintéticos [33]. Dessa forma, era esperado que nos cultivos com maior quantidade de células por volume, neste caso o tratamento S/V 60, tivesse maior eficiência de conversão de energia luminosa em energia química em comparação com o tratamento S/V 80.

Figura 5 - Razão de Eficiência Fotossintética (colunas) nos cultivos correlacionados com a irradiância média do dia (linha vermelha).



Ainda assim, foi possível superar valores de eficiência fotossintética já alcançados em outros cultivos outdoor em sistema laminar de 4,4% [25], 4,6% [11], 5,4 e 6,5% [7] e 9% [19]. Além de exceder os dados de EF relatados em *open ponds* de 1,5% [34], sistemas de cultivo em fotobiorreator tubular vertical de 4,2% [34], 2,5% [33], *raceways* com 5% [19] e 10% em cultivos de *Scenedesmus obliquus* em painéis verticais planos [35], mostrando que o emprego do SLCA deste estudo permitiu que fosse possível converter grande parte da energia luminosa em biomassa, em valores superiores a outros SLCA, bem como, a outros sistemas tradicionais de cultivo.

2.3.7 Conversão do CO₂ (gasoso) total ofertado

Na tabela 5 são apresentados os valores relativos à oferta de CO₂ em peso e conversão do carbono contido no CO₂ gasoso em biomassa. É possível visualizar que em relação à conversão da quantidade diária do CO₂ ofertado no sistema em carbono, os que resultaram numa menor razão de conversão média nos primeiros 10 dias foram os cultivos T1-80 ($30 \pm 6\%$) e o T3-60 ($29 \pm 13\%$). No cultivo T3-60 somente 29% do CO₂ ofertado foi convertido em biomassa, assim, 71% foram desperdiçados, possivelmente o alto desperdício tenha ocorrido devido a este cultivo operar durante 53% do período total de cultivo com dias nublados e baixa incidência de irradiação, como observado na Tabela 1, mantendo assim baixa conversão do carbono contido no CO₂ total ofertado, resultando em grande desperdício do carbono. Nos cultivos T2-80 e T4-60 foi mantida uma média de conversão do carbono similar de $45 \pm 10\%$ e $51 \pm 12\%$, dessa forma, não foi possível observar influência das diferentes S/V sobre a conversão do CO₂ total ofertado, entretanto, ambos cultivos são caracterizados por manter períodos de céu aberto e ensolarados durante maior parte dos dias de cultivo em relação às demais culturas.

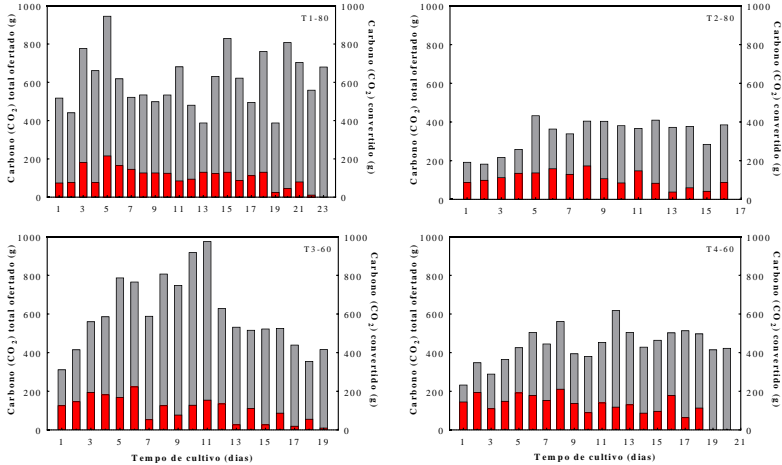
Tabela 4 – Quantidade em peso do carbono ofertado e convertido, a partir do carbono contido no CO₂ total ofertado, em biomassa durante períodos de 1 a 10 e 11 a 15 dias e conversão média e máxima.

Cultivo	Ofertado (g)		Convertido (g)		Conversão (%)		Máximo
	1 - 10 dias	11 - 15 dias	1 - 10 dias	11 - 15 dias	1 - 10 dias	11 - 15 dias	
T1-80	6047	3009	1312	562	22 ± 5	12 ± 8	33
T2-80	3173	1810	1221	370	41 ± 11	23 ± 11	54
T3-60	6484	3172	1420	453	24 ± 11	8 ± 8	40
T4-60	3944	2467	1556	571	41 ± 11	23 ± 12	62

Conforme Tabela 5, até o 10º dia de cultivo a média de conversão se mantém elevada em 22%, 41%, 24% e 41% e nos dias posteriores diminui-se para 20%, 23%, 8% e 23%, nos cultivos T1-80, T2-80, T3-60 e T4-60, respectivamente. Perfil similar à obtidos em sistemas laminares que mantêm conversões acima de 50% em dias iniciais diminuindo para valores menores de 15% ao final do período de cultivo [11] com exceção do cultivo T1-80 que se mantém com conversão acima de 20% após 10 dias de cultivo. Inclusive neste estudo foi

possível obter percentual de conversão de até 62%, próximo à trabalhos na literatura com sistemas laminares que alcançam conversões do carbono do CO₂ total ofertado de 76% [11] e 75% [7].

Figura 6 – Carbono convertido em biomassa (coluna vermelha) e carbono total contido no CO₂ ofertado (coluna cinza).



A partir do 11^o dia, conforme a Figura 6, ambos os tratamentos apresentaram baixa eficiência na conversão do CO₂ em relação ao que está sendo ofertado e se mantém gasto elevado do CO₂ no sistema. Provavelmente, o carbono ofertado a partir do CO₂ gasoso que não é utilizado pela fotossíntese, por se tratar de um gás ácido, esteja sendo fornecido apenas para a manutenção do pH, programado pelo sistema em manter um pH de $8,5 \pm 0,2$. Uma proposta interessante para evitar o desperdício do CO₂, seria a aplicação de um cultivo semi-contínuo no qual seria realizada a diluição da cultura quando a cultura alcançasse valores correspondentes a máxima eficiência de conversão do carbono contido no CO₂ total ofertado. Não seria aconselhável uma diminuição ou diluição da injeção do CO₂ gasoso, pois como se trata de um sistema superintensivo a atividade fotossintética em horários próximos ao meio-dia é elevada e resulta numa alta demanda de carbono para maior eficiência fotossintética da cultura garantindo maior produtividade [1].

2.3.8 Estimativa de custos da produção da biomassa

Cada cultivo alcançou diferentes produtividades e concentrações em biomassa em períodos distintos encerrados em 23, 16, 19 e 20 dias,

no qual acaba influenciando na comparação entre os valores obtidos, pois a produtividade diminui no decorrer do aumento de biomassa [21,26]. Dessa forma, determinou-se um período fixo, na fase exponencial, entre os cultivos onde a taxa de crescimento foi similar em relação a biomassa total, sendo este o 10º dia onde todos os cultivos possuem taxa de crescimento de 10 ± 1 %. Inclusive, muitos processos de cultivo de microalgas superintensivos e de larga escala são operados em uma concentração de peso seco fixas em um processo contínuo ou semi-contínuo, onde a taxa de crescimento e produtividade diária são parâmetros decisivos na avaliação econômica.

Conforme a Tabela 6, em relação ao custo a reposição d'água doce causado pela evaporação representou valores menores dentre demais insumos, entre US\$ 1,11 e US\$ 3,32 com representatividade similar em ambos os tratamentos de $2,50 \pm 0,50\%$. A energia elétrica obteve custo de US\$ 11,83 e US\$ 18,59 nas culturas da S/V 80 e S/V 60, respectivamente. Esta diferença está relacionada à variação do consumo energético das bombas hidráulicas para a manutenção das vazões correspondentes aos tratamentos. Entretanto, por conta de se tratar de custo fixo e os demais custos estarem em função da eficiência do sistema a representatividade da energia elétrica sobre o custo final foi de 13%, 18%, 19% e 24% nos cultivos T1-80, T2-80, T3-60 e T4-60, respectivamente. Assim como a evaporação, a reposição diária de nutrientes resultou custo similar entre os tratamentos US\$ 27,64, US\$ 25,23, US\$ 26,79 e US\$ 26,19, contribuindo como o segundo maior custo de produção.

O insumo de maior custo foi o dióxido de carbono, representando 51,62%, 28,01%, 50,19% e 32,13% nos cultivos T1-80, T2-80, T3-60 e T4-60, respectivamente, do custo total. Em T1-80 e T3-60 foram obtidas menores conversões de CO₂, no qual acabou refletindo nos custos de produção chegando a uma diferença de até 23% sob os cultivos T2-80 e T4-60. Comparando os valores finais do custo por quilograma de biomassa, os cultivos T1-80 e T2-80 geraram valores de US\$ 44,12 e US\$ 29,90, respectivamente, seguidos por T2-80 e T4-60 com US\$ 28,46 e US\$ 26,84, respectivamente. A diferença nos custos de produção da biomassa podem ser atribuídas a diversos fatores, dentre eles a variação na conversão do CO₂, em biomassa que neste estudo representou maior peso nos resultados finais de custo operacionais de um SLCA [11,36].

Tabela 5 – Dados de produção e custos de insumos e totais para produção de 1 quilograma de biomassa, considerando um período de 10 dias de cultivo.

Itens	T1-80	T2-80	T3-60	T4-60
Concentração (g. L ⁻¹)	11,67	12,03	10,08	10,38
Volume do cultivo (L)	181	181	241	241
Produção (kg)	2,11	2,18	2,43	2,50
Custos (\$)				
Energia elétrica	11,83	11,83	18,59	18,59
Dióxido de carbono (CO ₂)	51,69	27,01	50,19	32,13
Nutrientes (meio de cultura)	27,64	25,23	26,79	26,19
Água doce (evaporação)	1,93	1,11	3,32	1,47
Custos totais (US\$)	93,09	67,18	98,89	78,39
Custos finais (US\$.kg ⁻¹)	44,12	31,90	40,70	31,35

Na decisão para a obtenção de biomassa com menor custo, na avaliação da tabela 6, o cultivo T4-60 resultou num menor valor, porém com diferença de apenas \$ 0,55 com o cultivo T2-80, sendo que este teve um volume de 60 L a menos e, possivelmente, nos bioprocessos seguintes como a separação por centrifugação, o tempo de operação do equipamento possa ser menor, refletindo no tempo de uso e resultando em menor custo.

2.4 Conclusão

Os resultados demonstraram que foi obtida maior biomassa com o emprego da maior S/V, sendo que no cultivo T1-80 foi alcançado 20,14 g.L⁻¹ em relação aos demais cultivos. De fato, a produtividade volumétrica diária média no tratamento S/V80 foi 25% superior e alcançou concentração em biomassa 5 g.L⁻¹ a mais em relação ao tratamento S/V 60, demonstrando que maior S/V proporcionou maior resultado sob os parâmetros de produção. Por outro lado, a produtividade por área foi maior no tratamento S/V 60, por conta do maior volume. Foi verificada maior eficiência fotossintética nos cultivos de menor S/V. O SLCA empregado neste estudo permitiu que fosse alcançada eficiência fotossintética similar a demais SLCAs na literatura. A conversão de CO₂ foi menor nos cultivos T1-80, T3-60 e maior nos cultivos T2-80 e T4-60, não sendo possível determinar a influência da das diferentes relações entre a superfície e o volume, neste parâmetro. Em relação aos custos por quilograma de biomassa produzida, o cultivo T2-80 resultou no menor custo \$ 29,90, similar ao T4-60 com \$ 31,35.

2.5 Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos à nível mestrado. Ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações – MCTIC/CGTS/SETEC, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e à Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP.

2.6 Referências

- [1] T. de Marchin, M. Erpicum, F. Franck, Photosynthesis of *Scenedesmus obliquus* in outdoor open thin-layer cascade system in high and low CO₂ in Belgium, *J. Biotechnol.* 215 (2015) 2–12. doi:10.1016/j.jbiotec.2015.06.429.
- [2] A. Vonshak, A. Richmond, Mass production of the blue-green alga *Spirulina*: An overview, *Biomass.* 15 (1988) 233–247. doi:10.1016/0144-4565(88)90059-5.
- [3] S.. A. Singh S.; Richmond, A., Extracellular polysaccharide production in outdoor mass cultures of *Porphyridium* sp in flat plate glass reactors, *J. Appl. Phycol.* 12 (2000) 269–275. doi:10.1023/A:1008177002226.
- [4] C.G. Jerez, E. Navarro, I. Malpartida, R.M. Rico, J. Masojídek, R. Abdala, F.L. Figueroa, Hydrodynamics and photosynthesis performance of *Chlorella fusca* (Chlorophyta) grown in a thin-layer cascade (TLC) system, *Aquat. Biol.* 22 (2014) 111–122. doi:10.3354/ab00603.
- [5] A. Prokop, R. K.Bajpai, M.E. Zappi, *Algal Biorefineries : Volume 2 : Products and Refinery Design* - Google Books microalgae bio oil, Springer International Publishing, 2017.
- [6] A. Richmond, Q. Hu, *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition*, John Wiley & Sons, Ltd, Oxford, UK, 2013. doi:10.1002/9781118567166.
- [7] J. Doucha, K. Lívanský, Productivity, CO₂/O₂ exchange and hydraulics in outdoor open high density microalgal (*Chlorella* sp.) photobioreactors operated in a Middle and Southern European climate, *J. Appl. Phycol.* 18 (2006) 811–826. doi:10.1007/s10811-006-9100-4.
- [8] J. Masojídek, J. Kopecký, L. Giannelli, G. Torzillo, Productivity correlated to photobiochemical performance of *Chlorella* mass cultures grown outdoors in thin-layer cascades, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38 (2011) 307–317. doi:10.1007/s10295-010-0774-x.
- [9] G. Torzillo, L. Giannelli, A.J. Martínez-Roldan, N. Verdone, P. De Filippis, M. Scarsella, M. Bravi, Microalgae culturing in thin-layer

- photobioreactors, *Chem. Eng. Trans.* 20 (2010) 265–270. doi:10.3303/CET1020045.
- [10] J. Doucha, K. Lívanský, Outdoor open thin-layer microalgal photobioreactor: Potential productivity, *J. Appl. Phycol.* 21 (2009) 111–117. doi:10.1007/s10811-008-9336-2.
- [11] A.C. Apel, C.E. Pfaffinger, N. Basedahl, N. Mittwollen, J. Göbel, J. Sauter, T. Brück, D. Weuster-Botz, Open thin-layer cascade reactors for saline microalgae production evaluated in a physically simulated Mediterranean summer climate, *Algal Res.* 25 (2017) 381–390. doi:10.1016/j.algal.2017.06.004.
- [12] A. Richmond, *Handbook of Microalgal Culture*, Orton.Catie.Ac.Cr. (2003) 472. doi:10.1002/9780470995280.
- [13] N. Zou, A. Richmond, Effect of light-path length in outdoor flat plate reactors on output rate of cell mass and of EPA in *Nannochloropsis* sp., *J. Biotechnol.* 70 (1999) 351–356. doi:https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00087-5.
- [14] F.R. da F. Pchara, Estudo da transferência de CO₂ por borbulhamento para o cultivo de microalgas em laboratório, (2016) 62.
- [15] E.R. Mattos, M. Singh, M.L. Cabrera, K.C. Das, Enhancement of biomass production in *Scenedesmus bijuga* high-density culture using weakly absorbed green light, *Biomass and Bioenergy.* 81 (2015) 473–478. doi:10.1016/j.biombioe.2015.07.029.
- [16] J. Masojídek, Š. Papáček, M. Sergejevová, V. Jirka, J. Červený, J. Kunc, J. Korečko, O. Verbovikova, J. Kopecký, D. Štys, G. Torzillo, A closed solar photobioreactor for cultivation of microalgae under supra-high irradiance: Basic design and performance, *J. Appl. Phycol.* 15 (2003) 239–248. doi:10.1023/A:1023849117102.
- [17] S. Hindersin, M. Leupold, M. Kerner, D. Hanelt, Irradiance optimization of outdoor microalgal cultures using solar tracked photobioreactors, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 36 (2013) 345–355. doi:10.1007/s00449-012-0790-5.
- [18] APHA, American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20thed. (2011) 1085.
- [19] M. del M. Morales-Amaral, C. Gímez-Serrano, F.G. Acién, J.M. Fernández-Sevilla, E. Molina-Grima, Outdoor production of *Scenedesmus* sp. in thin-layer and raceway reactors using centrate from anaerobic digestion as the sole nutrient source, *Algal Res.* 12 (2015) 99–108. doi:10.1016/j.algal.2015.08.020.
- [20] D. Tang, W. Han, P. Li, X. Miao, J. Zhong, CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels, *Bioresour.*

- Technol. 102 (2011) 3071–3076.
doi:10.1016/j.biortech.2010.10.047.
- [21] M.A. Borowitzka, Limits to Growth, in: Y.-S. Wong, N.F.Y. Tam (Eds.), *Wastewater Treat. with Algae*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1998: pp. 203–226. doi:10.1007/978-3-662-10863-5_12.
- [22] J.U. Grobbelaar, Turbulence in mass algal cultures and the role of light/dark fluctuations, *J. Appl. Phycol.* 6 (1994) 331–335. doi:10.1007/BF02181947.
- [23] J.U. Grobbelaar, Factors governing algal growth in photobioreactors: The “open” versus “closed” debate, *J. Appl. Phycol.* 21 (2009) 489–492. doi:10.1007/s10811-008-9365-x.
- [24] J.U. Grobbelaar, The influence of light/dark cycles in mixed algal cultures on their productivity, *Bioresour. Technol.* 38 (1991) 189–194. doi:10.1016/0960-8524(91)90153-B.
- [25] C.G. Jerez, J.R. Malapascua, M. Sergejevoa, J. Masojedek, F.L. Figueroa, *Chlorella fusca* (Chlorophyta) grown in thin-layer cascades: Estimation of biomass productivity by in-vivo chlorophyll a fluorescence monitoring, *Algal Res.* 17 (2016) 21–30. doi:10.1016/j.algal.2016.04.010.
- [26] M.D. Ooms, P.J. Graham, B. Nguyen, E.H. Sargent, D. Sinton, Light dilution via wavelength management for efficient high-density photobioreactors, *Biotechnol. Bioeng.* 114 (2017) 1160–1169. doi:10.1002/bit.26261.
- [27] Y.K. Lee, Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential, *J. Appl. Phycol.* 13 (2001) 307–315. doi:10.1023/A:1017560006941.
- [28] J. Doucha, F. Straka, K. Livansky, Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (*Chlorella* sp.) in an outdoor open thin-layer photobioreactor, *J. Appl. Phycol.* 17 (2005) 403–412. doi:10.1007/s10811-005-8701-7.
- [29] J.U. Grobbelaar, L. Nedbal, L. Tichy, L. Setlik, Variation in some photosynthetic characteristics of microalgae cultured in outdoor thin-layered sloping reactors, *J. Appl. Phycol.* 7 (1995) 175–184. doi:10.1007/BF00693065.
- [30] K.L. Terry, L.P. Raymond, System design for the autotrophic production of microalgae, *Enzyme Microb. Technol.* 7 (1985) 474–487. doi:10.1016/0141-0229(85)90148-6.
- [31] A.P. Carvalho, S.O. Silva, J.M. Baptista, F.X. Malcata, Light requirements in microalgal photobioreactors: An overview of biophotonic aspects, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89 (2011) 1275–1288. doi:10.1007/s00253-010-3047-8.
- [32] K. Ojamae, Growth physiology and photosynthetic performance of

green microalgae mass culture grown in a thin-layer cascade
University of Tartu Department of Botany Karin Ojamäe Growth
physiology and photosynthetic performance of green microalgae
mass culture grown in, (2016) 47.

- [33] C.J. Hulatt, D.N. Thomas, Energy efficiency of an outdoor microalgal photobioreactor sited at mid-temperate latitude, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 6687–6695. doi:10.1016/j.biortech.2011.03.098.
- [34] J.H. de Vree, R. Bosma, M. Janssen, M.J. Barbosa, R.H. Wijffels, Comparison of four outdoor pilot-scale photobioreactors, *Biotechnol. Biofuels.* 8 (2015) 215. doi:10.1186/s13068-015-0400-2.
- [35] S. Hindersin, M. Leupold, M. Kerner, D. Hanelt, Key parameters for outdoor biomass production of *Scenedesmus obliquus* in solar tracked photobioreactors, *J. Appl. Phycol.* 26 (2014) 2315–2325. doi:10.1007/s10811-014-0261-2.
- [36] A.C. Hristop. Apel, D. Weuster-Botz, Engineering solutions for open microalgae mass cultivation and realistic indoor simulation of outdoor environments, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38 (2015) 995–1008. doi:10.1007/s00449-015-1363-1.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

APEL, A.c. et al. Open thin-layer cascade reactors for saline microalgae production evaluated in a physically simulated Mediterranean summer climate. **Algal Research**, v. 25, p.381-390, jul. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.06.004>.

BOROWITZKA, Michael A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v. 70, n. 1-3, p.313-321, abr. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656\(99\)00083-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656(99)00083-8).

BRÁNYIKOVÁ, Irena et al. Microalgae-novel highly efficient starch producers. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 4, p.766-776, 15 dez. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.23016>.

CHEN, Chun-yen et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p.71-81, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>.

CHISTI, Yusuf. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 3, p.126-131, mar. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.12.002>.

MARCHIN, Thomas de; ERPICUM, Michel; FRANCK, Fabrice. Photosynthesis of *Scenedesmus obliquus* in outdoor open thin-layer cascade system in high and low CO₂ in Belgium. **Journal of Biotechnology**, v. 215, p.2-12, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.06.429>.

DEMIRBAS, Ayhan. Use of algae as biofuel sources. **Energy Conversion and Management**, v. 51, n. 12, p.2738-2749, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2010.06.010>.

DOUCHA, J.; LÍVANSKÝ, K. Novel outdoor thin-layer high density microalgal culture system: Productivity and operational parameters. **Algological Studies**, v. 76, n. February, p. 129–147, 1995.

DOUCHA, J.; LÍVANSKÝ, K. Productivity, CO₂/O₂ exchange and hydraulics in outdoor open high density microalgal (*Chlorella* sp.)

photobioreactors operated in a Middle and Southern European climate. **Journal of Applied Phycology**, v. 18, n. 6, p.811-826, 1 nov. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-006-9100-4>.

DOUCHA, Jiří; LÍVANSKÝ, Karel. High Density Outdoor Microalgal Culture. **Algal Biorefineries**, p.147-173, 28 set. 2013. Springer Netherlands. http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-7494-0_6.

DOUCHA, Jiří; STRAKA, František; LÍVANSKÝ, Karel. Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (*Chlorella* sp.) in an outdoor open thin-layer photobioreactor. **Journal of Applied Phycology**, v. 17, n. 5, p.403-412, out. 2005. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-005-8701-7>.

DOUSKOVA, I. et al. Simultaneous flue gas bioremediation and reduction of microalgal biomass production costs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 1, p.179-185, 19 dez. 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-008-1811-9>.

GROBBELAAR, Johan U. et al. Variation in some photosynthetic characteristics of microalgae cultured in outdoor thin-layered sloping reactors. **Journal of Applied Phycology**, v. 7, n. 2, p.175-184, abr. 1995. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf00693065>.

GROBBELAAR, Johan U.; SOEDER, Carl J.; STENGEL, Eberhard. Modeling algal productivity in large outdoor cultures and waste treatment systems. **Biomass**, v. 21, n. 4, p.297-314, jan. 1990. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0144-4565\(90\)90079-y](http://dx.doi.org/10.1016/0144-4565(90)90079-y).

JACOB, Anna; BUCHARSKY, Ethel Claudia; GUENTERSCHELL, Karl. The Application of Transparent Glass Sponge for Improvement of Light Distribution in Photobioreactors. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 02, n. 01, p.1-8, 2012. OMICS Publishing Group. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9821.1000113>.

JEREZ, Cg et al. Hydrodynamics and photosynthesis performance of *Chlorella fusca* (Chlorophyta) grown in a thin-layer cascade (TLC) system. **Aquatic Biology**, v. 22, p.111-122, 20 nov. 2014. Inter-Research Science Center. <http://dx.doi.org/10.3354/ab00603>.

JEREZ, Celia G. et al. *Chlorella fusca* (Chlorophyta) grown in thin-layer cascades: Estimation of biomass productivity by in-vivo chlorophyll a fluorescence monitoring. **Algal Research**, v. 17, p.21-30, jul. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2016.04.010>.

JUNEJA, Ankita; CEBALLOS, Ruben; MURTHY, Ganti. Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. **Energies**, v. 6, n. 9, p.4607-4638, 3 set. 2013. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/en6094607>.

KAREMORE, Ankush et al. Photobioreactors for Improved Algal Biomass Production: Analysis and Design Considerations. **Algal Biorefinery: An Integrated Approach**, p.103-124, 2015. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-22813-6_5.

LIFFMAN, Kurt et al. Comparing the energy efficiency of different high rate algal raceway pond designs using computational fluid dynamics. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 91, n. 2, p.221-226, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cherd.2012.08.007>.

MASOJÍDEK, Jiří et al. Productivity correlated to photobiochemical performance of *Chlorella* mass cultures grown outdoors in thin-layer cascades. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 2, p.307-317, 21 jul. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-010-0774-x>.

MASOJÍDEK, Jiří et al. Thin-Layer Systems for Mass Cultivation of Microalgae: Flat Panels and Sloping Cascades. **Algal Biorefineries**, p.237-261, 2015. Springer International Publishing. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-20200-6_7.

MATA, Teresa M.; MARTINS, António A.; CAETANO, Nidia. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p.217-232, jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>.

MIRANDA, J.r.; PASSARINHO, P.c.; GOUVEIA, L. Pre-treatment optimization of *Scenedesmus obliquus* microalga for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 104, p.342-348, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.059>.

OJAMAE, K. Growth physiology and photosynthetic performance of green microalgae mass culture grown in a thin-layer cascade University of Tartu Department of Botany Karin Ojamäe Growth physiology and photosynthetic performance of green microalgae mass culture grown. November, p. 47, 2016.

PALOMINO, M.; ESTRADA, F.C.; LÓPEZ, G.J., Microalgas: potencial para la producción de biodiesel. In: Congresso brasileiro de mamona, 4 & simpósio internacional de oleaginosas energéticas, 4., 2010, João Pessoa. **Anais**: Embrapa, 2010. v. 1, p. 149 - 157. Disponível em:

<<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/18289/1/BID-07.pdf>>. Acesso em: 15 abr. 2017

PARK, J.b.k.; CRAGGS, R.j.; SHILTON, A.n. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p.35-42, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.158>.

PCHARA, Francisco Rodrigues da Fonseca. **Estudo da transferência de CO₂ por borbulhamento para o cultivo de microalgas em laboratório**. 2016. 62 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Aquicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/174156/344618.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 3 fev. 2018.

PULZ, Otto; SCHEIBENBOGEN, Karl. Photobioreactors: Design and performance with respect to light energy input. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, p.123-152, 1998. Springer Berlin Heidelberg. <http://dx.doi.org/10.1007/bfb0102298>.

SETLÍK, Ivan; SUST, Vladimír; MÁLEK, Ivan. Dual Purpose Open Circulation Units for Large Scale Culture of Algae in Temperate Zones: Basic Design Considerations and Scheme of a Pilot Plant. **Algological Studies**, v. 1, p.111-164, 1 Jan. 1970.

SINGH, Surendra; ARAD, Shoshana (malis); RICHMOND, Amos. Extracellular polysaccharide production in outdoor mass cultures of *Porphyridium* sp in flat plate glass reactors. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3/5, p.269-275, 2000. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1023/a:1008177002226>.

TREDICI, Mario R. Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. **Handbook of Microalgal Culture**, p.178-214, 2007. Blackwell Publishing Ltd. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470995280.ch9>.

UGWU, C.u.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 10, p.4021-4028, jul. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.046>.

VONSHAK, Avigad et al. Light and oxygen stress in *Spirulina platensis* (cyanobacteria) grown outdoors in tubular reactors. **Physiologia Plantarum**, v. 97, n. 1, p.175-179, maio 1996. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3054.1996.tb00494.x>.

VONSHAK, Avigad; RICHMOND, Amos. Mass production of the blue-green alga *Spirulina*: An overview. **Biomass**, v. 15, n. 4, p.233-247, jan. 1988. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0144-4565\(88\)90059-5](http://dx.doi.org/10.1016/0144-4565(88)90059-5).

WILLIAMS, Peter J. Le B.; LAURENS, Lieve M. L. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. **Energy & Environmental Science**, v. 3, n. 5, p.554-590, 2010. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/b924978h>.

ZITTELLI, Graziella C. et al. Photobioreactors for Mass Production of Microalgae. **Handbook of Microalgal Culture**, p.225-266, 12 abr. 2013. John Wiley & Sons, Ltd. <http://dx.doi.org/10.1002/9781118567166.ch13>.

ZOU, Ning; RICHMOND, Amos. Effect of light-path length in outdoor flat plate reactors on output rate of cell mass and of EPA in *Nannochloropsis* sp. **Journal of Biotechnology**, v. 70, n. 1-3, p.351-

356, abr. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656\(99\)00087-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1656(99)00087-5).