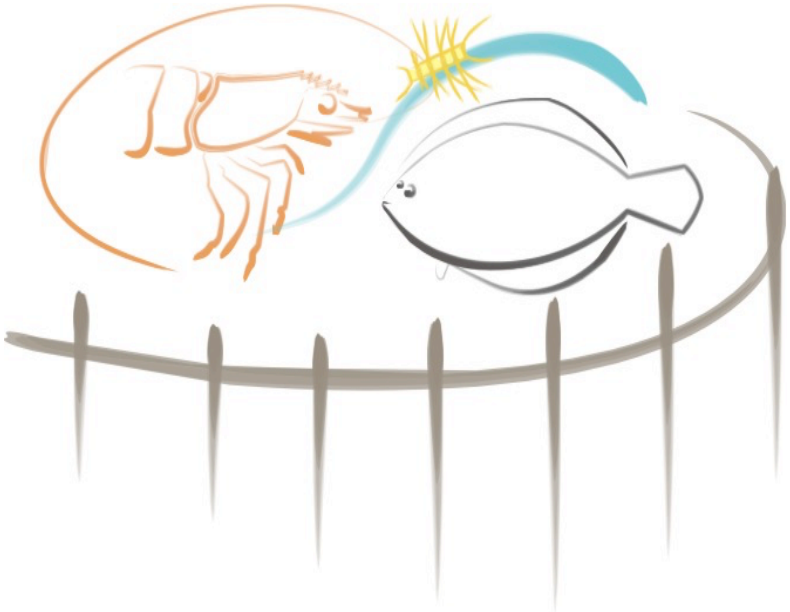
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



AUMENTO DA PRODUÇÃO E REDUÇÃO DO GASTO ENERGÉTICO DE TANQUES DE CULTIVO MASSIVOS DA MICROALGA MARINHA *NANNOCHLOROPSIS OCEANICA*

BRUNO GALLER KUBELKA

RIO GRANDE, RS

Abril de 2019

Universidade Federal do Rio Grande

Programa de Pós-Graduação em Aquicultura

AUMENTO DA PRODUÇÃO E REDUÇÃO DO GASTO ENERGÉTICO DE TANQUES DE CULTIVO MASSIVOS DA MICROALGA MARINHA *NANNOCHLOROPSIS OCEANICA*

BRUNO GALLER KUBELKA

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Aquicultura no Programa de Pós-Graduac□ão em Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande.

Orientador: Dr. Paulo Cesar Abreu

Co-orientador: Dr. Waldir Terra Pinto

Rio Grande, RS

Abril de 2019

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS vi

LISTA DE TABELAS ix

AGRADECIMENTOS xii

1. RESUMO GERAL 1

2. ABSTRACT 3

3. INTRODUÇÃO GERAL 4

3.1. *As Microalgas* 4

3.2. *Composição química das microalgas e bioprodutos com valor comercial* 6

3.3. *A produção de microalgas em larga escala* 9

3.4. *Os gargalos na produção em larga escala de Nannochloropsis* 10

3.5. *O uso de simulação numérica e tecnologia computacional na melhoria de sistemas de cultivo de microalgas* 14

4. OBJETIVO GERAL 15

4.1. *Objetivos específicos* 15

4.2. *Hipóteses* 16

5. ESTRUTURA DA TESE 16

REFERÊNCIAS 17

6. CAPÍTULO 1 – RESUMO EXPANDIDO: Desempenho hidrodinâmico de dois diâmetros de injetores de ar no cultivo massivo de microalgas: abordagem experimental e computacional 24

6.1. Introdução 25

6.2. Materiais e Métodos 26

6.3. Resultados e Discussões 27

6.4. Conclusões 28

Referências 28

7. CAPÍTULO 2 – RESUMO EXPANDIDO: A ação de bolhas de ar pequenas no aumento da exposição à irradiância e da produção em sistema de cultivo massivos da microalga marinha *Nannochloropsis oceanica* 29

7.1. Introdução 30

7.2. Materiais e Métodos 31

7.3. Resultados e Discussões 32

7.4. Conclusões 33

Referências 33

8. CAPÍTULO 3: Melhorias no controle da vazão de ar para economia de energia na produção da microalga marinha *Nannochloropsis oceanica* em fotobiorreatores de grande volume 34

RESUMO 35

ABSTRACT 36

1. INTRODUÇÃO 36

2. MATERIAIS E MÉTODOS 38

2.1. Simulações da otimização da vazão de ar 38

2.1.1. Geometria e malha computacional do tanque 38

2.1.2. Condições iniciais e de contorno 40

2.1.3. Melhorias e considerações hidrodinâmicas 41

2.2. Métodos de cultivo 41

2.2.1. Condições de cultura 41

2.2.2. Análises de crescimento 42

2.2.3. Análise estatística 43

2.3. Balanço energético 44

2.3.1. Energia aplicada para o sistema de mistura 44

2.3.2. Energia produzida por lipídeos de N. oceanica 44

2.3.3. Produção líquida de energia 45

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES 45

3.1. Simulações de desempenho hidrodinâmico 45

3.2. Produção de biomassa 46

3.3. Morte celular 49

3.4. Desempenho de economia de energia 51

4. CONCLUSÕES 54

REFERÊNCIAS 54

9. DISCUSSÃO GERAL 59

10. CONCLUSÕES GERAIS 64

11. TRABALHOS FUTUROS 66

ANEXO I - ARTIGO DO CAPÍTULO 1 - Hydrodynamic performance of two air nozzles diameters on the massive microalgae culture: Computational and experimental approaches. Kubelka, B.G., Pinto, W.T, Abreu, P.C. Algal Research 27 (2017), 318-324

..... 72

ANEXO II - ARTIGO DO CAPÍTULO 2 – The action of small bubbles in increasing light exposure and production of the marine microalga *Nannochloropsis oceanica* in

massive culture systems. Kubelka, B.G., Roselet, F., Pinto, W.T, Abreu, P.C. Algal Research. 35 (2018), 569-576. 80

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1: Fotos de alguns gêneros de microalgas cultivados para fins comerciais. A) *Spirulina* (Fonte: www.algaebase.org); B) *Chlorella* (Fonte: www.algaebase.org); C) *Dunaliella* (Fonte: www.cfb.unh.edu); D) *Haematococcus* (Fonte: www.algaebase.org); D) *Chaetoceros* (Fonte: www.algaebase.org); E) *Isochrysis* (Fonte: www.sustainableaquatics.com) **6**

Figura 2: Cultivo de *Nannochloropsis*. A) Sistema de cultivo em fotobiorreatores fechados cilíndricos (330 L) com sistema de mistura por coluna; B) Sistema de cultivo em tanques circulares abertos cilíndricos (1600 L) com sistema de mistura por coluna borbulhante; C) Imagem de microscópico das células de *Nannochloropsis* (Fonte: http://cfb.unh.edu). Nota-se que os dois sistemas de cultivos apresentados (A e B) são instalados em estufas agrícolas na Estação Marinha de Aquicultura - Universidade Federal do Rio Grande (Roselet et al., 2013) **8**

CAPÍTULO 3

Figura 1: Fotobiorreator de 330 L de coluna borbulhante utilizados no estudo de otimização da vazão de ar no Laboratório de Produção de Microalgas da Universidade Federal do Rio Grande, Brasil. A) configuração experimental; B) Geometria computacional/malha do tanque; C) Aproximação dos injetores de ar **39**

Figura 2: Média e desvio padrão da produção de biomassa durante os seis experimentos de crescimento com a microalga marinha *N. oceanica* em fotobiorreatores de coluna borbulhante de 330 L. Três vazões de ar foram avaliadas: *i*) baixa (*verde*) - 0,0012 vvm; *ii*) intermediário (*cinza*) - 0,0024 vvm; *iii*) alta (*azul*) - 0,017 vvm..... **47**

Figura 3: Resultados de contagem de células para os experimentos 4, 5 e 6 para avaliar a presença de células mortas e/ou detritos da microalga marinha *Nannochloropsis oceanica* em fotobiorreatores de coluna borbulhante de 330 L **50**

ANEXO I

Figura 1: Volumetric mesh for the simulation case of standard (1×3 mm) air nozzle (standard LPM). a) Full mesh transversal view; b) mesh approximation of the nozzle in a transversal view; c) mesh approximation of the nozzle in a superior view ...…...… **75**

Figura 2: Volumetric mesh for the simulation case of the optimized (9×1 mm) air nozzle (configuration proposed here). a) Full mesh transversal view; b) mesh approximation of the nozzle in a transversal view; c) approximation of the nozzle in a superior view … **75**

Figura 3: Mean turbulent kinetic energy field for both simulated cases: a) standard nozzle (3 mm); b) optimized nozzle (1 mm). Field averaged was done for one second of simulation ……...…….…… **77**

Figura 4: Mean and Standard Deviation of water optical density (750 nm) during growth experiments with the marine microalga *N. oceanica* in 300 L cylindrical photobioreactors with 1×3 mm and 9×1 mm air nozzle systems …….....… **78**

Figura 5: Mean and Standard Deviation of water optical density (750 nm) during growth experiments with the marine microalga *N. oceanica* in 1600 L open circular tanks with 1×3 mm and 9×1 mm air nozzle systems …….……...……. **78**

ANEXO II

Figura 1: *Nannochloropsis oceanica* biomass with two bubble sizes treatments over the cultivation time for three experiments. A) Experiment 1 in a vertical closed tubular photobioreactors; B) Experiment 2 in a vertical closed tubular photobioreactors; C) Experiment 3 in an open circular tank. Filled black dots connected by a black traced line represent the larger bubbles (9 mm) and squares connected by the gray solid line goes to the smaller bubbles (6.5 mm) treatment. Error bars corresponds to the standard deviations of the mean values …….……...…….…….. **84**

Figura 2: Three measured nutrient concentration for the two bubble sizes (treatment) during cultivation time. A) Total ammonium concentration in experiment 1; B) Total ammonium concentration in experiment 2; C) Total ammonium concentration in experiment 3; D) Nitrate concentration in experiment 1; E) Total ammonium concentration in experiment 2; F) Total ammonium concentration in experiment 3; G) Phosphate concentration in experiment 1; H) Phosphate concentration in experiment 2; I) Phosphate concentration in experiment 3. Filled black dots connected by a black traced line represent the larger bubbles (9 mm) and squares connected by the gray solid line goes to the smaller bubbles (6.5 mm) treatment. Error bars corresponds to the standard deviations of the mean values ……..……..... **85**

Figura 3: Irradiance measured at 5 cm of depth for the three experiments. A) Experiment 1 in the photobioreactors; B) Experiment 2 in the photobioreactors; C) Experiment 3 in the open circular tank. Filled black dots connected by a black traced line represent the larger bubbles (9 mm) and squares connected by the gray solid line goes to the smaller bubbles (6.5 mm) treatment. Error bars corresponds to the standard deviations of the mean values ……....……. **86**

Figura 4: Marine microalgae *Nannochloropsis oceanica* simulated trajectories for two air bubble sizes. A) Larger bubble treatment (9 mm); B) Smaller bubble treatment (6.5 mm). Plane section (beige color) just 5 cm below surface is the cut-off level between light and dark zones in the culture column …….……..… **87**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 3

Tabela 1: Resultados das simulações de CFD para todos os casos estudados. **Q** corresponde a vazão de ar, **U** é a velocidade de entrada do ar, correspondentes a **Q**, para as simulações, **DZ** é a porcentagem de Zonas Mortas e $\mathbf{P_{in}}$ é a demanda de energia do sistema de injeção de ar **40**

Tabela 2: Data, estação, média ± DP, valores mínimo e máximo de temperatura (**T - ° C**), salinidade (**S**), pH e Irradiância Superficial ($\mathbf{L_{Sup}}$) medidos durante experimentos de crescimento (**Exp.**) Com a microalga marinha *Nannochloropsis oceanica* em 330 L fotobiorreator cilíndrico fechado vertical (PBR) com a vazão de ar correspondente (tratamento) – **Q** **42**

Tabela 3: Resultados do peso seco medido em experimentos de crescimento com a microalga marinha *Nannochloropsis oceanica* em 330 L de fotobiorreator cilíndrico fechado vertical no primeiro dia de cultivo ($\mathbf{B_i}$) e no último ($\mathbf{B_f}$). Além disso, o rendimento ($\mathbf{B_y}$) foi determinado subtraindo final da biomassa inicial e o ganho/perda (% - $\mathbf{B_g}$) foi calculado comparando os rendimentos em todas as vazões de ar (**Q**). Os valores de perda são destacados em vermelho (negativo). NS significa diferenças não significativas na produção de biomassa **51**

Tabela 4: Resultados médios da produção líquida estimada de energia ($\mathbf{P_{net}}$) para o sistema de mistura utilizado para produzir *Nannochloropsis oceanica* em um fotobiorreator cilíndrico fechado vertical de 330 L. A energia líquida é calculada pela subtração de cada demanda de energia do fluxo de ar da produção de energia ($\mathbf{P_{in}}$) da produção lipídica de microalgas ($\mathbf{P_{out}}$). O ganho líquido de produção de energia (**P** -%) também é mostrado e o ganho médio de biomassa ($\mathbf{B_g}$) é apresentado para ajudar nas comparações **53**

ANEXO I

Tabela 1: Mesh characteristics and mesh diagnostics output parameters for each simulation case. **MSA** stands for the maximum skewness angle, **MVC** is the minimum volume change and **T** is the total time of simulation …… **75**

Tabela 2: Microalgae particle density (ρ_p), microalgae particle radius (r), settling velocity for the microalgae *Nannochloropsis oceanica* (v_s), and the Reynolds number (Re) resulting from the microalgae particle settling ……..…..…… **76**

Tabela 3: Date, season, mean ± SD, minimum and maximum values of temperature (**T - ºC**), salinity (**S**) and **pH** measured during growth experiments with the marine microalga *Nannochloropsis oceanica* in 300 L cylindrical photobioreactor (PBR) and 1,600 L open circular tanks (OCT) with 1x3 mm standard (**S**) and 9x1 mm optimized (**O**) air nozzle systems ……..……...…… **77**

Tabela 4: Table of results from ANOVA with repeated measures comparing Dead Zones (**DZ**) in 1x3 mm standard (**S**) and the case with 9x1 mm optimized (**O**) in 1 second of the simulated vertical water velocity ……...……. **77**

Tabela 5: Results of optical density measured in growth experiments with the marine microalga *Nannochloropsis oceanica* in 300 L cylindrical photobioreactor (PBR) and 1,600 L open circular tanks (OCT) in the first day of cultivation (**$OD_{initial}$**) and in the last (**OD_{final}**). Also, the Yield was determined subtracting final from initial biomass and the **Gain** (%) was calculated comparing the **Yields** in the 1x3 mm standard (**S**) and 9x1 mm optimized (**O**) air nozzle systems ……..… **78**

ANEXO II

Tabela 1: Date, season, mean ± SD, minimum and maximum values of temperature (**T - ºC**), salinity (**S**), **pH** and Irradiance (**I**) at tank surface measured during growth experiments with the marine microalga *Nannochloropsis oceanica* in 330 L cylindrical photobioreactor (PBR) and 1,600 L open circular tanks (OCT) with the larger (**L**) and smaller bubbles (**S**) ……..…. **82**

Tabela 2: Results of biomass measured in growth experiments with the marine microalga *Nannochloropsis oceanica* in 330 L cylindrical photobioreactor (PBR) and 1,600 L open circular tanks (OCT) in the first day of cultivation (**Initial B**) and in the

last (**Final B**). Also, the **Gain** was determined subtracting final from initial biomass and the Difference (***D* - %**) was calculated comparing the yields in the larger bubbles (**L**) and smaller bubbles (**S**) treatment ……..……...…..… **83**

Tabela 3: Lagrangian CFD simulations of the microalgae particle trajectory. Light and dark intervals were observed, and Light Exposure Frequency were determined for each treatment, larger bubbles and smaller bubbles ……..… **86**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, que abraçou um projeto diferente, cheio de desafios e nunca desanimou. Me ensinou a tentar ver resultados que poderiam ser resultados interessantes, mas aparentemente não eram "bons". Além de ter em mente sempre um próximo passo em qualquer circunstância. Esses foram apenas dois de diversos ensinamentos de como ser um ótimo pesquisador e professor que o Prof. Dr. Paulo Abreu me passou. Obrigado.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Waldir Pinto, que apesar de não serem tão frequentes como no mestrado as reuniões que tivemos sempre foram muito produtivas e com muita matemática também.

A minha companheira de altos e baixos, que soube lidar com a minha tensão durante cada etapa destes 4 anos, e vai me dar a felicidade de ter um filho (humano). Felinos e caninos temos vários, obrigado por eles também e por toda a vida que construímos juntos. Sou grato por cada momento de apoio durante o meu problema na cervical, sem a sua ajuda não teria conseguido superara-lo e conseguir chegar ao final deste ciclo. Obrigado por estar sempre do meu lado!

Ao meu pai, minha mãe e meu irmão, pois mesmo morando longe sempre estiveram do meu lado em qualquer decisão e passo que tomei. Não é fácil essa distância, mas sou agradecido por nunca desanimarem de vir me visitar. Obrigado por além de serem minha família, serem meu amigos preferidos!

Ao meu pai, Dr. Ricardo Galler, dou um agradecimento especial, pois mesmo não sendo da área sempre leu meus artigos, fez críticas construtivas e tivemos longas discussões sobre os trabalhos.

A minha vó e meu tio que faleceram durante o meu doutorado e foram duas pessoas que sempre gostei muito e infelizmente não estão mais aqui para compartilhar este momento.

A família Passos que se tornaram grandes amigos e companheiros da churrascada de domingo.

Ao Dr. Fabio Roselet por todas as discussões e despertar ainda mais em mim a vontade para realizar pesquisas. Afinal, ficávamos com frequência até mais tarde discutindo tarefas e planos para o Laboratório de Produção de Microalgas.

A todos do Laboratório de Produção de Microalgas, que sofreu algumas mudanças na equipe durante estes quatro anos, mas que sempre estiverem aptos a me ajudar no que fosse preciso. E a todos do Laboratório de Interação Fluido Estrutura.

Aos amigos do surfe, em especial ao Msc. Juliano Coletto, pela insistência de me levar para o surfe!

Agradeço a todos os amigos e as pessoas que diretamente ou indiretamente fizeram parte destes 4 anos de batalha. Incluindo funcionários da Estação Marinha de Aquicultura.

A banca examinadora, em especial, ao Prof. Dr Marcelo Farenzena que se deslocou para poder avaliar a tese. E aos outros membros, Prof. Dr. Dariano Krummenaur, Prof. Dr. Geraldo Foés e Prof. Dr. Danilo Giroldo.

A CAPES pelo auxílio financeiro e a Pós-graduação de Aquicultura, por todos os auxílios e recursos prontamente disponibilizados.

E, por fim, mas não menos importante agradeço ao mar por ser uma fonte inesgotável de trabalho e lazer.

1. RESUMO GERAL

Microalgas são organismos unicelulares, clorofilados que representam a base da cadeia alimentar na maioria dos ambientes aquáticos. Estes organismos têm composição bioquímica complexa, podendo fornecer importantes bioprodutos para consumo humano e animal. A demanda cada vez maior por alimentos e bioprodutos que garantam segurança nutricional e novos fármacos poderá ser obtido com a produção em larga escala de microalgas. Entretanto, para se atingir este patamar é necessário o desenvolvimento de tecnologias novas e mais produtivas de cultivo destes microorganismos. A produção massiva de microalgas é, ainda hoje, um processo custoso, que demanda um alto gasto de energia e uma infraestrutura relativamente grande, sendo atualmente economicamente viável apenas para produtos com valor agregado muito elevado, no entanto para a produção de elementos de baixo valor, como biocombustíveis, o sistema de produção atual é inviável. A viabilidade econômica de um sistema de cultivo de microalgas é atingida quando se obtêm altas densidades celulares no menor volume possível e com um gasto mínimo de energia, água e nutrientes. Cerca de um terço do custo de produção de biomassa de microalgas está relacionada à demanda energética do sistema de mistura/circulação dos tanques de cultivo. A eficiência na circulação da coluna de água pode evitar a sedimentação das células, aumentar sua exposição à luz incidente e maximizar o aporte de nutrientes para cada célula. Um sistema de mistura muito comum em tanques de cultivo de microalgas é a injeção de bolhas de ar, que transfere a energia das bolhas de ar para água, resultando na circulação (movimentação) da coluna de água. O principal objetivo desta Tese foi a otimização do sistema de coluna de bolhas em sistemas fechados (fotobiorreatores cilíndricos) e abertos (tanques circulares). Para isto, foram feitas análises do tamanho de bolhas e da taxa de vazão do ar. No estudo foram empregadas técnicas de simulação numérica, utilizando a ferramenta de Dinâmica Computacional de Fluidos (CFD) e abordagem experimental. Os resultados de nossas pesquisas são apresentados da seguinte forma: 1) No capítulo 1 desta Tese, foi estudado o efeito do tamanho das bolhas de ar, na mistura e produtividade de dois tanques de cultivo: *i)* fotobioreatores cilíndricos fechados e verticais com 330 L de volume útil; *ii)* tanques abertos circulares de 1600 L. A abordagem inicial foi feita aplicando-se programa de Dinâmica Computacional de Fluidos (CFD) que indicou uma maior eficiência de

bolhas menores para a redução das áreas de sedimentação (zonas mortas) e também para o aumento do desempenho hidrodinâmico do sistema. Posteriormente foram realizados experimentos em fotobiorreatores e tanques circulares. Sistemas de injeção de bolhas de ar formados por um conjunto de nove injetores de ar de 1 mm de diâmetro foram comparados a sistemas padrão, com um único injetor de 3 mm de diâmetro. Os sistemas com bolhas menores resultaram em ganhos de produção de até 36%, sem um acréscimo no custo energético. Durante os experimentos do primeiro capítulo se verificou que diferenças significativas de biomassa entre os sistemas com diferentes tamanhos de bolhas de ar ocorriam após 4 a 6 dias de experimento. 2) No capítulo 2 testamos as hipóteses de que tais diferenças poderiam ser causadas por *i*) maior absorção de nutrientes, ou *ii*) maior exposição das células à luz incidente. Através de experimentos a incidência de luz foi medida em várias profundidades dos tanques de cultivo. Da mesma forma, a concentração de nutrientes dissolvidos (amônia, nitrato e fosfato) foi determinada ao longo do cultivo. Os nutrientes não foram um fator limitante para o crescimento das células, mas a incidência de luz sim, pois esta diminui drasticamente abaixo da camada de 5 cm da superfície do tanque, passando a ser limitante a partir de 4 a 6 dias de cultivo. Foi sugerido que o sistema de mistura com bolhas menores era capaz de diminuir o tempo de permanência das células de microalgas em zonas sem luz dos tanques de cultivo. Este resultado foi apoiado por simulações com modelo lagrangiano, acompanhando as partículas de microalgas durante a circulação no interior do tanque utilizando a ferramenta CFD. 3) No terceiro capítulo diferentes vazões de ar foram testadas visando-se otimizar o novo sistema de mistura com bolhas menores. Através de experimentos com diferentes vazões de ar foi possível estimar a demanda de energia do sistema de injeção de bolhas de ar. Simulações numéricas prévias aos experimentos com cinco vazões diferentes apontaram 3 valores que apresentavam maior potencial para otimização experimental. Estas três vazões foram testadas em experimentos com fotobiorreatores de 330 L. As análises teórica de gasto de energia e experimental de produção de biomassa nos mostraram que o ajuste de uma vazão de ar de 0,024 L min^{-1} apresenta o melhor custo-benefício para os sistemas de produção aqui avaliados de produção de *N. oceanica*. Entretanto, comparações do gasto de energia para a produção de microalgas nas diferentes vazões e a energia contida no lipídeo produzido mostraram que os sistemas

apresentam um balanço negativo, necessitando maiores ajustes para incrementar a sua produção.

2. ABSTRACT

Microalgae are unicellular, chlorophyllous organisms that form the basis of the food chain in most aquatic environments. These organisms have complex biochemical composition, being able to provide important bioproducts for human and animal consumption. Increasing demand for food and bioproducts to ensure nutritional safety and new drugs can be achieved with the large-scale production of microalgae. However, in order to reach this level, it is necessary to develop new and more productive technologies for cultivating these microorganisms. The massive production of microalgae is still a costly process, which requires a high energy expenditure and a relatively large infrastructure, and is not currently economically viable, especially for the production of low value compounds such as biofuels. The economic viability of a microalgae cultivation system is achieved when high cell densities are obtained in the smallest possible volume and with a minimum energy, water and nutrient expenditure. About one-third of the cost of producing microalgae biomass is related to the energy demand of the mixing / circulation system of the culture tanks. Efficient water column circulation can prevent sedimentation of cells, increase their exposure to incident light, and maximize the nutrient supply for each cell. A very common mixing system in microalgae culture tanks is the injection of air bubbles, which transfers energy from the air bubbles to water, resulting in the circulation (movement) of the water column. The main objective of this thesis was the optimization of the bubbling system in closed systems (photobioreactors) and open (circular tanks). For this, analyzes of bubble size and air flow rate were performed. In the study, numerical modeling techniques were used, using the Computational Fluid Dynamics (CFD) tool and experimental approach. The results of our research are presented as follows: 1) In chapter 1 of this thesis, the effect of air bubble size on the mixing and productivity of two culture tanks was studied: *i*) closed and vertical cylindrical photobioreactors with 330 L of useful volume; *ii*) circular open tanks of 1600 L. The initial approach was carried out by applying Fluid Computation Dynamics (CFD) program, which indicated a higher efficiency of smaller

bubbles for the reduction of settling areas (dead zones) and also for the increase of the hydrodynamics of the system. Subsequently experiments were performed on photobioreactors and circular tanks. Air bubble injection systems consisting of a set of nine 1 mm diameter air injectors were compared to standard systems with a single 3 mm diameter injector. Systems with smaller bubbles resulted in production gains of up to 36%, without an increase in energy cost. During the experiments of the first chapter it was verified that significant differences of biomass between the systems with different sizes of air bubbles occurred after 4 to 6 days of experiment. 2) In Chapter 2 we tested the hypotheses that such differences could be caused by *i*) greater absorption of nutrients, or *ii*) greater exposure of cells to incident light. Through experiments the incidence of light was measured at various depths of the culture tanks. Likewise, the concentration of dissolved nutrients (ammonia, nitrate and phosphate) was determined throughout the culture. The nutrients were not a limiting factor for cell growth, but the light incidence did, as it decreased dramatically below the 5 cm layer of the tank surface, becoming limiting from 4 to 6 days of culture. It has been suggested that the blending system with smaller bubbles was able to decrease the residence time of the microalgae cells in areas without light of the culture tanks. This result was supported by simulations with lagrangian model, following the microalgae particles during the circulation inside the tank using the CFD tool. 3) In the third chapter different airflows were tested in order to optimize the new mixing system with smaller bubbles. Through experiments with different air flows it was possible to estimate the energy demand of the air bubble injection system. Numerical simulations prior to the experiments with five different flows indicated 3 values that presented the greatest potential for experimental optimization. These three air flow rates were tested in experiments with 330 L photobioreactors. The theoretical analyzes of energy expenditure and experimental biomass production showed that the adjustment of an air flow of 0,024 L min^{-1} presents the best cost-benefit for the production systems of *N. oceanica*. However, comparisons of the energy expenditure for the production of microalgae at the different air flows rates and the energy contained in the lipid produced showed that the systems present a negative balance, demanding more optimizations to increase their production.

3. INTRODUÇÃO GERAL

3.1. As microalgas

As microalgas são organismos unicelulares clorofilados que realizam fotossíntese e formam a base da cadeia trófica em ambientes marinhos e dulcíaquicolas. O carbono orgânico sintetizado a partir do carbono inorgânico fixado pelas microalgas é a principal fonte de energia para níveis mais elevados da cadeia trófica. Esta redução no carbono assimilado pela microalga é realizada durante a fotossíntese, resultando na produção de biomassa (carbono orgânico) para manutenção metabólica e geração de novas células, que podem ser utilizadas por consumidores (Richmond, 2004). Portanto, os fluxos de energia e matéria em toda a biosfera são influenciados pela produção primária de microalgas (Reynolds, 2006).

Durante a fotossíntese, a energia luminosa é absorvida por pigmentos e transformada em energia química na forma de adenosina tri-fosfato (ATP) e adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (Richmond, 2004). Estas moléculas energéticas são utilizadas na fixação e redução do dióxido de carbono (CO_2) para sintetizar carboidratos e outros compostos orgânicos celulares (Chisti, 2007). A fotossíntese consiste em uma série de reações que envolvem a absorção de luz (fótons) e a injeção de energia para a redução de moléculas de água e liberação de oxigênio. A captura de elétrons liberados na síntese de compostos energéticos é utilizada no Ciclo de Calvin, na carboxilação do CO_2 e, por fim, formar hexose (Richmond, 2004).

Além do carbono e da luz, o crescimento das microalgas necessita de outros nutrientes, tais como o nitrogênio, que é necessário para a formação de proteínas. Este pode ser absorvido na forma de nitrato, amônia e nitrito, além de ureia e aminoácidos (Flynn e Butler, 1986). Outros nutrientes, tais como fósforo, enxofre e magnésio são absorvidos em quantidades menores, mas continuam sendo essenciais para o desenvolvimento das células. Por outro lado, elementos traços como ferro, zinco e cobre são importantes para o desenvolvimento celular (Andersen, 2005).

O termo microalga não possui valor taxonômico, englobando uma enorme variação de tamanhos e formas (Reynolds, 2006). Na ficologia o termo microalga se refere a organismos microscópicos (2-200 μm), autotróficos, unicelulares que podem formar colônias, ou viver de forma isolada. Nesta denominação enquadram-se as bactérias

oxigênicas fotossintéticas (cianobactérias – 0,2-2,0 μm) e algas de diferentes filos do Reino Protista (Richmond, 2004). Uma estimativa conservativa do número de espécies de microalgas aponta a existência de 72.500 espécies, sendo 44.000 já descritas em estudos publicado, e 33.248 já adicionados à plataforma digital *AlgaeBase* (Guiry, 2012). Muitas destas espécies já são cultivadas para uso comercial em indústrias de alimentos, fármacos e na própria aquicultura (Fig. 1).

3.2. Composição bioquímica das microalgas e bioprodutos com valor comercial

A grande variedade de espécies caracterizadas como microalga resulta também em uma grande diversidade de compostos produzidos por estes microrganismos (Ferreira e Sant`Anna, 2017). Várias espécies já são produzidas em sistemas de aquicultura para comercialização de biomassa e bioprodutos (Figura 1). Por exemplo, espécies de microalgas, como *Spirulina platensis* (Figura 1 a) e *Chlorella vulgaris* (Figura 1 b) apresentam alto teor de proteína, com 58-62% (El-Sayed e El-Sheekh, 2018) e 34-40% (Papapolymerou et al., 2018) de seu peso seco, respectivamente. Estas espécies de microalgas são amplamente cultivadas e comercializadas para a alimentação humana (Borowitzka e Moheimani, 2013). Além disso, a *Spirulina* apresenta altas concentrações de vitaminas importantes para a saúde humana, como a vitamina B12, enquanto que a *Chlorella* contém o composto β-1,3-glucan, que é um imunoestimulante ativo, eliminando radicais livres e reduzindo a quantidade de lipídeos no sangue (Spolaore et al., 2006).

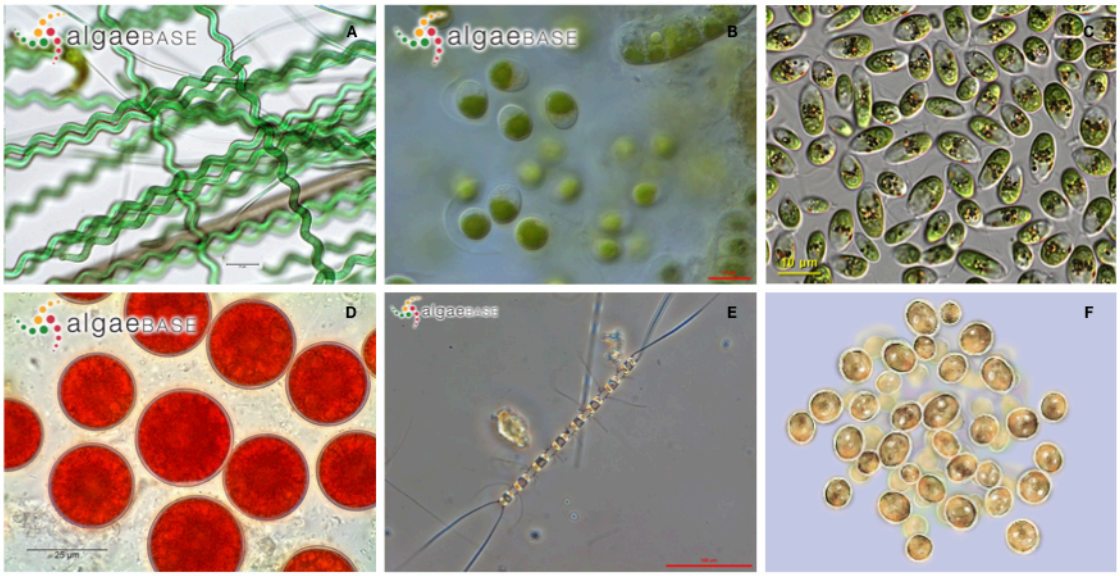


Figura 1: Fotos de alguns gêneros de microalgas cultivados para fins comerciais. A) *Spirulina* (Fonte: www.algaebase.org); B) *Chlorella* (Fonte: www.algaebase.org); C) *Dunaliella* (Fonte: www.cfb.unh.edu); D) *Haematococcus* (Fonte: www.algaebase.org); D) *Chaetoceros* (Fonte: www.algaebase.org); E) *Isochrysis* (Fonte: www.sustainableaquatics.com).

Outra espécie encontrada no mercado é a *Dunaniella salina* (Figura 1 c), cuja biomassa é utilizada na produção de ß-caroteno para comercialização, principalmente por indústrias farmacêuticas e alimentícias (Borowitzka e Moheimani, 2013). A produção de *Haematococcus pluvialis* (Figura 1 d) também merece destaque como fonte do pigmento Astaxantina, que possui um alto valor comercial devido à sua alta capacidade antioxidante. Esta espécie ainda possui pigmentos que, eventualmente, podem ser utilizados como corantes na indústria de produção de salmonídeos, por exemplo (Borowitzka e Moheimani, 2013).

Carboidratos em microalgas podem ser encontrados na forma simples como glucose e outros monossacarídeos, ou na forma complexa, como polissacarídeos (amido, celulose e outros). Sua digestibilidade geral é boa não havendo, portanto, limitação ao uso de biomassa de microalgas secas em alimentos ou rações (Richmond, 2004). Neste contexto, as microalgas podem ser empregadas como alimento durante um breve período do ciclo de vida do organismo cultivado, tal como na fase larval de organismos

aquáticos (Barbieri e Ostrensky, 2001; Sampaio et al., 2016), ou por todo o ciclo de vida de organismos filtradores e herbívoros (Pillay e Kutty, 2005). As microalgas também podem ser empregadas na produção do zooplâncton que servirá de alimento para larvas e pós-larvas de peixes e crustáceos (Barbieri e Ostrensky, 2001; Sampaio et al., 2016).

Mesmo que sejam necessárias apenas por um breve período, como na larvicultura, as microalgas são essenciais, pois determinam o sucesso da oferta de juvenis disponíveis para produção. Além disto, as microalgas também podem ser empregadas em rações, como substituto parcial de proteína (Lavens e Sorgeloos, 1996; Macias-Sancho et al., 2014), diminuindo a pressão sobre estoques de peixes pelágicos geralmente empregados para produção de farinha de peixe (Pauly, 2009). Além das espécies já mencionadas, outras como *Chaetoceros muelleri* (Figura 1 e) e *Isochrysis galbana* (Figura 1 f) também são amplamente produzidas para utilização da biomassa ou como alimento vivo na aquicultura (López-Elías et al., 2005; He et al., 2018).

Recentemente, microalgas do gênero *Nannochloropsis* (Eustigmatofícea) (Fig. 2 C) foi alvo de muitos estudos para a produção de lipídeos para uso como biocombustível (biodiesel) e consumo humano (Ma et al., 2014; Meng et al., 2015; Alves Sobrinho et al., 2015; Borges et al., 2016). O conteúdo lipídico das células deste gênero pode variar entre 37% e 60% do peso seco da célula (Ma et al., 2016). Os lipídeos apresentam ácidos graxos saturados e insaturados, sendo estes últimos formados por grandes cadeias (12 a 22 átomos de carbono) e com muitas duplas ligações (Borowitzka e Moheimani, 2013). Entre todos os ácidos graxos das microalgas, alguns das famílias ω-3 e ω-6 são de particular interesse como, por exemplo, o ácido eicosapentaenoico (EPA – C20:5) (Spolaore et al., 2006), que é um constituinte abundante do lipídeo produzido por *Nannochloropsis* (Ma et al., 2014; Borges et al., 2016; Faé Neto et al., 2018).

O EPA é crucial para atividades cerebrais e apresenta benefícios para a visão (Bazinet e Layé, 2014). Além disso, reduz o risco de ataques de coração e é altamente recomendado para mulheres grávidas ou em processo de amamentação (Calder, 2004; Krauss-Etschmann et al., 2007). Normalmente este composto é extraído de peixes (óleo de peixe), no entanto os peixes não sintetizam estes lipídeos. O ácido eicosapentaenoico é ingerido pelos peixes através da cadeia trófica que a origem é da

biomassa de microalgas na base da cadeia trófica. A pressão existente sobre estoques de peixes pelágicos geralmente empregados para produção de óleo de peixe (Pauly, 2009) aumenta a necessidade de novas fontes de EPA para a alimentação humana.

Além da utilização como alimento, o gênero *Nannochloropsis* vem ganhado destaque para a utilização do TAG (triacilglicerol), também presentes em altas concentrações na composição de sua biomassa (30 – 60%) (Borges et al., 2011; Ma et al., 2014; Borges et al., 2016;). Este produto pode ser utilizado para a fabricação de biocombustíveis, especialmente o biodiesel (Borowitzka e Moheimani, 2013), em sistemas de produção fechados (fotobiorreatores) (Fig. 2 A) ou abertos (tanques circulares) (Fig. 2B).

Figura 2: Cultivo de *Nannochloropsis*. A) Sistema de cultivo em fotobiorreatores fechados cilíndricos (330 L) com sistema de mistura por coluna; B) Sistema de cultivo em tanques circulares abertos cilíndricos (1600 L) com sistema de mistura por coluna borbulhante; C) Imagem de microscópico das células de *Nannochloropsis* (Fonte: http://cfb.unh.edu). Os dois sistemas de cultivos apresentados (A e B) são instalados em estufas agrícolas na Estação Marinha de Aquicultura - Universidade Federal do Rio Grande (Roselet et al., 2013).

3.3. A produção de microalgas em larga escala

A viabilidade de indústrias que utilizem os valiosos produtos das microalgas depende de um aumento na escala de produção (Borowitzka e Moheimani, 2013). A dificuldade no escalonamento de poucos litros de meio de cultura em condições controladas de laboratório para milhares de litros expostos a condições naturais de irradiância, temperatura e precipitação, é um obstáculo para o sucesso da atividade,

uma vez que ainda existem muitas dificuldades para a obtenção de altas produtividades em cultivos massivos (Slade e Bauen, 2013). Recentemente, melhorias na produção do cultivo de microalgas em larga escala tem sido alvo de inúmeros estudos, passando por melhorias genéticas das cepas, adaptação à condições mais rigorosas de cultivo visando o aumento da produção (Kaye et al., 2015; Naduthodi et al., 2018). De maneira geral, busca-se o desenvolvimento de tecnologias que aumentem a produção, com redução de custos (Gómez-Pérez et al., 2015; Chua e Schenk, 2017).

Para a produção em larga escala, existem dois tipos de sistemas de produção normalmente empregados, i.e., *i*) os sistemas fechados (fotobioreatores) (Figura 2 A) e *ii*) sistemas abertos (tanques *raceway* e circular – Figura 2 B). Para ambos os sistemas existem vantagens e limitações, que são abordados em detalhes por Borowitzka (1999) e Narala et al. (2016). De maneira geral, os sistemas abertos são amplamente utilizados em extensas áreas de produção comercial e são caracterizados por custos menores de instalação, manutenção e operação (Stephenson et al., 2010). No entanto, estes apresentam maior suscetibilidade às contaminações, estão mais sujeitos às variações ambientais (Borowitzka e Moheimani, 2013) e maior exposição a variações de condições abióticas como, temperatura e precipitação (salinidade em cultivos com água salgada) (Roselet et al., 2013). Ao contrário, sistemas fechados são menos suscetíveis a contaminações e a variações de fatores abióticos (Borowitzka, 1999; Narala et al., 2016), mas apresentam elevado custo de instalação e manutenção (Stephenson et al., 2010). A produtividade é considerada maior para os sistemas fechados, pois possuem geometrias que aproveitam melhor a luz incidente em áreas menores construídas (Borowitzka e Moheimani, 2013).

3.4. Os gargalos na produção em larga escala de Nannochloropsis

As microalgas do gênero *Nannochloropsis* têm enorme potencial para a utilização na indústria de biocombustíveis (Borowitzka e Moheimani, 2013; Alves Sobrinho et al., 2015; Ashour et al., 2019), e de bioprodutos (Lubián et al., 2000; Milledge, 2011; Faé Neto et al., 2018). Estas microalgas apresentam valor nutricional que tornam a sua biomassa muito adequada a alimentação de organismos cultivados (peixes, camarões e moluscos), contendo altas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados (Ferreira et al., 2009; Borges et al., 2011; Ashour et al., 2019). Algumas características apontadas

como vantajosas na utilização das espécies de *Nannochloropsis* para fins comerciais são, por exemplo,: *i)* a alta eficiência fotossintética (Valdiveloo et al., 2016); *ii)* a alta produtividade lipídica (Ma et al., 2016); *iii*) composição rica em pigmentos (Faé Neto et al., 2018); *iv*) o pequeno tamanho de seu genoma (9000-12000 genes) (Poliner et al., 2015) *v*) a possibilidade de realizar seu cultivo com nutrientes aproveitados de efluentes descartados por outras atividades (Mitra et al., 2016).

No entanto, a implantação de fazendas de cultivos massivo de espécies do gênero *Nannochloropsis* ainda depende de aperfeiçoamentos nas condições de cultivo e no desenvolvimento de novas tecnologias em todos os elos da cadeia produtiva (Chua e Schenk, 2017). Ressalta-se que a viabilidade econômica de um sistema de cultivo de microalgas é favorecida quando se obtêm altas densidades celulares e com um gasto mínimo de energia e nutrientes (Borowitzka e Moheimani, 2013).

Neste contexto, uma boa mistura/circulação da coluna de água dos tanques de cultivo é imprescindível para se atingir uma alta produtividade desta e de outras espécies de microalgas (Ugwu e Aoyagi, 2012). A importância de uma boa mistura/circulação da água está no fato de que esta minimiza a sedimentação das células (Borowitzka e Moheimani, 2013), aumenta a frequência de exposição das mesmas à luz e a nutrientes (Ugwu e Aoyagi, 2012), especialmente quando a densidade de células começa a aumentar, como acontece nas fases finais de crescimento em cultivos massivos por batelada (Borowitzka e Moheimani, 2013). Além disso, a maior movimentação da água permite a manutenção de outros parâmetros abióticos como temperatura, salinidade, pH e taxa de transferência de gases em níveis ótimos e homogêneos em toda a coluna de água dos tanques de cultivo, propiciando um melhor crescimento das microalgas (Ugwu e Aoyagi, 2012).

Dois mecanismos típicos são empregados para produzir a circulação/mistura da coluna de água em tanques de cultivo. Primeiro, o uso de pás giratórias que, mecanicamente, criam velocidades horizontais na água, os quais já foram extensivamente otimizados e apresentam uma tecnologia estabelecida (Huang et al., 2015; Zhang et al., 2015; Fernández et al., 2016). O segundo mecanismo é a circulação da coluna de água vertical pela injeção de bolhas de ar no fundo do tanque. Este procedimento força o movimento da água em direção à superfície do tanque, sendo este

movimento gerado pelo gradiente de pressão formado pela transferência da energia das bolhas de ar para a coluna de água adjacente. A mistura por sistemas de coluna de bolhas, como este, possui uma área de superfície maior que sistemas abertos, ou seja, a coluna de água mais alta em fotobiorreatores de coluna borbulhante permite um maior tempo de contato das bolhas de ar com a coluna de água, resultando em um maior coeficiente de transferência e em um aumento de energia transferida a ser utilizada para mistura do tanque de cultivo (Kommareddy e Anderson, 2004).

De acordo com Acién et al. (2012), o sistema de mistura dos tanques de cultivo de microalgas é responsável pelo gasto de cerca de 27 % da energia de todo o ciclo produtivo de biomassa. Desta forma, a viabilidade econômica de um sistema de cultivo de *Nannochloropsis* só será alcançada ultrapassando-se as limitações dos sistemas de produção, de maneira que a produção de biomassa seja mantida em níveis que tornem o balanço produção/gasto positivo (Arudchelvam e Nirmalakhandan, 2012; Pegallapati et al., 2013).

Ajustes no sistema de injeção de ar podem resultar em mudanças significativas na demanda de energia para o sistema de cultivo e em um incremento na produção, resultando em melhores condições de cultivo das microalgas (Pegallapati et al., 2012; Norsker e Barbosa, 2012). Sistemas de mistura/circulação por coluna borbulhantes podem ser otimizados através de *i*) tamanho das bolhas de ar; *ii*) controle da vazão de ar; *iii*) distribuição/número de injetores de bolhas de ar no fundo do tanque de cultivo; *iv*) geometria do tanque (Kulkarni e Joshi, 2005). Em todas estas abordagens, a ideia é sempre aumentar o coeficiente de transferência de massa das bolhas de ar para a coluna de água (Rampure et al., 2007).

A otimização do sistema de injeção de ar vem sendo cada vez mais utilizada em busca de tecnologias de cultivo mais produtivas e mais eficientes energeticamente. Por exemplo, Bannari et al. (2011) conseguiram melhorar o desenho geométrico de um airlift de volume útil igual a 21 L, aumentando o coeficiente de transferência de massa e diminuindo tensões de cisalhamento. Yang et al. (2014) quantificaram a mistura turbulenta em um fotobioreator de placa-plana de 15,45 L com diferentes vazões de ar e distribuição de injetores de ar. Segundo os autores a turbulência em níveis ideais seria capaz de conectar de maneira eficaz a dinâmica de fluidos, a taxa fotossintética e o

metabolismo da célula de microalga para determinar o desempenho de um sistema de cultivo (Yang et al., 2014). Os autores determinaram condições de turbulência (mistura da coluna de água) mais adequadas ao crescimento da microalga *Scenedesmus dimorphus*. Yu et al. (2009) observaram o comportamento de parâmetros hidrodinâmicos como turbulência e porcentagem de zonas mortas de acordo com diferentes geometrias de um *airlift* de 15 L e após a otimização experimentos de crescimento da microalga *Isochrysis galbana* foram avaliados em escala maior (300 L) e provaram a maior eficiência para o sistema de injeção de ar otimizado. Bitog et al. (2014) avaliaram a porcentagem de zonas mortas, o tempo de circulação e a condição de turbulência em um fotobioreator de 30 L com diferentes diâmetros de injetores de ar, diferentes geometrias do fotobiorreator e diferentes vazões de ar. Os autores chegaram a um sistema de injeção de ar e de geometria do tanque otimizado que foi testado em experimentos de cultivo com a microalga *Chlorella vulgaris* e resultou em um aumento na produção de 214%.

O Laboratório de Produção de Microalgas (LPM), localizado na Estação Marinha de Aquicultura da Universidade Federal do Rio Grande, possui sistemas de mistura de coluna de água por borbulhamento instalados em tanques fechados e abertos. No primeiro caso, empregam-se fotobiorreatores cilíndricos fechados com volume útil máximo de 330 L e uma coluna de água de 1,25 m (Figura 2 A), e no segundo caso utilizam-se tanques circulares abertos de 1600 L, com uma coluna de água de 0,30 m (Figura 2 B). O sistema de injeção de bolhas de ar utilizado para os tanques cilíndricos e circulares são básicos e não passaram por nenhum processo de melhoria. Sendo assim, existe a necessidade de aprimoramentos destes tanques de cultivo, do LPM, para uma maior produção de *Nannochloropsis oceanica*.

Fotobiorreatores de coluna borbulhante, normalmente, apresentam menores produções se comparado a outras tecnologias (tanques) de cultivo de microalgas (Ugwu e Aoyagi, 2012). No entanto, a utilização destes apresenta algumas vantagens sobre a construção de sistemas mais complexos, como um *airlift*, uma biocerca tubular, um placa-plana e outros (Ugwu e Aoyagi, 2012). Fotobiorreatores de coluna borbulhante são simples em seu desenho não possuindo partes móveis, de fácil construção e operação (Bitog et al., 2011). Possuem boa capacidade em manter o calor (menor variação de temperatura que outros sistemas) (Bitog e Lee, 2017). Portanto, os custos

de construção e operação são menores. Do ponto de vista hidrodinâmico a sua produtividade não é muito boa, porém pode ser maximizada como foi realizada em outros estudos mencionados anteriormente, e potencialmente se tornar um sistema de viável de produção de biomassa de *N. oceanica*.

A grande diferença entre um fotobiorreator fechado e um tanque aberto circular, ambos com sistemas de mistura por coluna borbulhante é a altura da coluna de água. Uma menor coluna de água no tanque circular (0,30 m) contra o fotobiorreator (1,25 m) resulta em um menor gasto de energia para cada injetor de ar (Arudchelvam e Nirmalakhandan, 2012). Além disso, Perner et al. (2003) argumentam que tanques mais rasos (como o circular) apresentam menos gradientes de fatores abióticos, como temperatura, salinidade, pH e de nutrientes e gases (oxigênio e dióxido de carbono). Por outro lado, o número de injetores de ar é muito mais elevado devido ao maior diâmetro do tanque (circular – 2,90 m vs. fotobiorreator 0,55 m) em consequência disto, uma área muito maior de borbulhamento é necessária para manter uma boa mistura no tanque.

A otimização da circulação no interior de tanques de cultivo de microalgas pode ser realizada por experimentos em sistemas de larga escala e/ou em laboratório. A otimização de um sistema em laboratório muitas vezes pode não apresentar um comportamento igual quando escalonado para um volume maior (Bitog e Lee, 2017). No entanto, otimizar todas a configurações possíveis, em larga escala, como tamanho de bolhas de ar e vazão de ar injetado em tanques pode vir a ser muito custoso, necessitando de inúmeros experimentos para se atingir a configuração ideal. Além disso, os mecanismos para medições hidrodinâmicas no interior do tanque (velocidade de circulação, por exemplo) são pontuais e para se determinar toda a condição de mistura na coluna de água seria necessário um árduo e longo trabalho (Bitog et al., 2011).

A utilização da ferramentas numéricas como a Dinâmica Computacional de Fluidos (*Computational Fluid Dynamics* – CFD), pode minimizar o gasto de tempo e com materiais. A utilização desta ferramenta está se tornando mais acessível, uma vez que computadores de alta performance se tornaram mais baratos nos últimos tempos. A utilização do CFD permite, também, a avaliação da otimização de diversas

configurações dos tanques de cultivo em pouco tempo, se comparado as mesmas avaliações realizadas experimentalmente, pelo método de tentativa e erro, como é normalmente feito (Kommareddy e Anderson, 2004).

3.5. O uso de simulação numérica e tecnologia computacional na melhorias de sistemas de cultivo de microalgas

Os fatos apresentados anteriormente demonstram que há ainda muito o que fazer para o aprimoramento de sistemas de cultivo massivo de microalgas, principalmente para o cultivo de microalgas do gênero *Nannochloropsis*. A fim de se evitar um longo e custoso caminho de tentativas e erros até se conseguir se chegar a um padrão ótimo de sistemas de cultivo, empregamos neste estudo simulações numéricas do tipo Dinâmica Computacional de Fluidos (CFD) para projetar novos sistemas, avaliando-se diferentes componentes como tamanho de bolhas e vazão de ar. Estes afetam a dinâmica de flutuação/sedimentação das microalgas no meio de cultivo (Bitog et al., 2017) e os ciclos claro/escuro, aumentando a eficiência de fotossíntese (Wijffels e Barbosa, 2010).

A ferramenta numérica que resolve as equações matemáticas básicas da mecânica dos fluídos, conhecida como Dinâmica Computacional de Fluídos (CFD), está disponível no Laboratório de Interação Fluido Estrutura, da Escola de Engenharia da FURG, como o programa comercial de CFD, STAR-CMM+. Este programa resolve as equações que regem a hidrodinâmica/circulação no interior dos tanques de cultivo (Ferziger e Peric, 2002). Todas as equações matemáticas multifásicas que descrevem os fenômenos de injeção de bolhas de ar no fundo do tanque, a subida destas a superfície e a interação do ar com a coluna de água (transferência de energia) são resolvidas numericamente pelo STAR-CCM+ (Siemens, 2017). Algumas caraterísticas das bolhas de ar são necessárias com variáveis de entrada destas equações a serem resolvidas, como tamanho de bolha de ar e velocidade de subida das bolhas de ar (Neto et al., 2008). Uma série de estudos realizados com esta tecnologia estão descritos na revisão bibliográfica realizada por Bitog et al. (2011).

Através das simulações numéricas as melhores condições de circulação da água foram analisadas para se evitar sedimentação e disponibilizar mais luz as células e, consequentemente, atingir um aumento de produtividade com minimização do gasto de

energia em sistemas de mistura por injeção de bolhas de ar em fotobiorreatores cilíndricos fechados de 330 L e em tanques circulares abertos de 1600 L utilizados no cultivo da microalga marinha *N. oceanica*.

O desafio de produção de biomassa de microalgas em larga escala com um sistema economicamente viável permanece necessitando soluções de baixo custo. Podendo ter suas respostas em abordagens multidisciplinares, que envolvam a utilização de ferramentas da engenharia (como CFD), visando uma alta produção em larga escala com um gasto mínimo de energia (Wijffels e Barbosa, 2010). Fatores que devem ser fortemente considerados neste desafio são a penetração e a distribuição da luz, a mistura e a distribuição de zonas mortas nos tanques de cultivo (Bitog e Lee, 2017). Esses fatores estão intimamente inter-relacionados entre si fazendo com que este desafio seja ainda mais complexo. É muito importante, ainda, que todas as melhorias resultantes do desenvolvimento de um sistema viável de cultivo leve em conta o gasto de energia deste sistema a ser otimizado (Wijffels e Barbosa, 2010). Aprimorar o sistema de mistura/circulação de um tanque de cultivo surtirá efeito em todos os fatores mencionados, tanto no aumento de produção quanto na economia de energia.

4. OBJETIVO GERAL

Aumentar a produção e diminuir o gasto de energia do cultivo massivo da microalga marinha *Nannochloropsis oceanica* através da melhoria do sistema de injeção de ar (mistura) em sistemas fechados (fotobiorreatores) e abertos (tanques circulares) de produção de microalgas.

4.1. Objetivos Específicos

- Determinar o diâmetro do injetor de bolhas de ar que melhor transfere energia para a coluna de água, minimizando zonas mortas e melhorando a mistura, sem um custo adicional de energia;
- Investigar o fator de gatilho para uma maior produção de biomassa resultado de um sistema de injeção de bolhas de ar menores;

- Desenvolver melhorias no sistema de produção de *N. oceanica* em fotobioreatores de coluna borbulhante através do controle da vazão de ar.

4.2. Hipóteses

- O sistema de injeção de bolhas menores é capaz de transferir mais energia para a coluna de água, resultando em uma redução de zonas mortas, maior mistura da coluna de água, e consequentemente uma maior produtividade;
- A disponibilidade de luz é um fator limitante quando a densidade de cultivo aumenta e esta limitação pode ser minimizada por uma mistura da coluna de água mais eficiente com o uso de bolhas menores;
- O ajuste da vazão de ar em um nível moderado resultará em um maior equilíbrio entre produção de biomassa e o custo do gasto de energia.

5. ESTRUTURA DA TESE

No capítulo 1 desta Tese, avaliamos a alteração dos diâmetros dos injetores de bolhas de ar responsáveis pela mistura de tanques de cultivo em dois sistemas de produção, fotobiorreatores de 300 L e tanques circulares de 1600 L, sem alterar o gasto de energia. Os resultados deste capítulo foram publicados no trabalho "Hydrodynamic performance of two air nozzles diameters on the massive microalgae culture: Computational and Experimental approaches" por B. Kubelka, W. Pinto e P.C. Abreu. 2017. Algal Research 27: 318-324. (Anexo I)

No capítulo 2, testamos as hipóteses que as células de microalgas seriam limitadas por luz, ou nutrientes e que esta limitação seria superada pelo emprego de bolhas menores. Os resultados deste capítulo foram publicados no trabalho "The action of small bubbles in increasing light exposure and production of the marine microalga Nannochloropsis oceânica in massive culture systems" por B. Kubelka, F. Roselet, W. Pinto e P.C. Abreu. 2018. Algal Research. 35: 569-576. (Anexo II)

No capítulo 3, foi realizada a avaliação de um balanço entre produção e o gasto de energia para determinação da condição ótima de vazão de ar. Trabalho a ser submetido para Algal Research.

REFERÊNCIAS

Acién, F.G., Fernández, J.M., Magán, J.J., Molina, E., 2012. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. Biotechnology Advances 30, n. 6, 1344-1353.

Alves Sobrinho, R.C.M., Vauchinski, L., De Moura, R.R., Primel, E.G., Abreu, P.C.V., D'oca, M.G.M., 2015. FAME production and fatty acid profiles from moist *Chlorella sp.* and *Nannochloropsis oculata* biomass. Journal of the American Oil Chemists' Society 92, n. 3, 423-430.

Andersen, R.A., 2005. Algal Culturing Techniques. 1ª ed. Elsevier Academic Press. ISBN 0-12-088426-7.

Arudchelvam, Y. e Nirmalakhandan, N., 2012. Optimizing net energy gain in algal cultivation for biodiesel production. Bioresource Technology 114, 294-302.

Ashour, M., Elshobary, M.E., El-Shenody, R., Kamil, A.W., Aabomohra, A.E.F., 2019. Evaluation of a native oleaginous marine microalga *Nannochloropsis oceanica* for dual use in biodiesel production and aquaculture feed. Biomass and Bioenergy 120, 439-447.

Bannari, R., Bannari, A., Selma, B., Proulx, P., 2011. Mass transfer and shear in an airlift bioreactor: Using a mathematical model to improve reactor design and performance. Chemical Engineering Science 66, n. 10, 2057-2067.

Barbieri, J.R.C. e Ostrensky, A., 2001. Camarões Marinhos - Reprodução, Maturação e Larvicultura. Aprenda Fácil Editora.

Bitog, J.P., Lee, I.B., Lee, C.G., Kim, K.S., Hwang, H.S., Hong, S.W., Seo, I.H., Kwon, K.S., Mostafa, E., 2011. Application of computational fluid dynamics for modeling and designing photobioreactors for microalgae production: A review. Computers and Electronics in Agriculture 76, n. 2, 131-147.

Bitog, J.P.P., Lee, I.B., Oh, H.M., Hong, S.W., Seo, I.H., Kwon, K., 2014. Optimized hydrodynamic parameters for the design of photobioreactors using computational fluid dynamics and experimental validation. Biosystems Engineering 122, 42-61.

Bitog, J.P. e Lee, I., 2017. Designing Photobioreactors using Computational Fluid Dynamics (CFD). Scholars' Press. ISBN 978-620-2-30434-4.

Borges, L., Morón-Villarreyes, J.A., D'oca, M.G.M., Abreu, P.C., 2011. Effects of flocculants on lipid extraction and fatty acid composition of the microalgae *Nannochloropsis oculata* and *Thalassiosira weissflogii*. Biomass and Bioenergy 35, n. 10, 4449-4454.

Borges, L., Caldas, S.; Montes D'oca, M.G., Abreu, P.C., 2016. Effect of harvesting processes on the lipid yield and fatty acid profile of the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. Aquaculture Reports 4, 164-168.

Borowitzka, M.A., 1999. Commercial production of microalgae□: ponds , tanks , tubes and fermenters. Journal of Biotechnology 70, 313-321.

Borowitzka, M.A., Moheimani, N.R., 2013. Algae for Biofuels and Energy. 1ª ed. Springer Netherlands, Dordrecht. ISBN 978-94-007-5478-2.

Chisti, Y., 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances 25, n. 3, 294-306.

Chua, E.T. e Schenk, P.M., 2017. A biorefinery for *Nannochloropsis*: Induction, harvesting, and extraction of EPA-rich oil and high-value protein. Bioresource Technology 244, 1416-1424.

El-Sayed, A. E.-K. e El-Sheekh, M., 2018 Outdoor cultivation of *Spirulina platensis* for mass production. Notulae Scientia Biologicae 10, n. 1, 38-44.

Faé Neto, W.A., Borges, C.R.M., Abreu, P.C., 2018. Carotenoid production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* in different low-cost culture media. Aquaculture Research 49, 2597-2535.

Fernández, I., Acién, F.G., Guzmán, J.L., Berenguel, M., Mendoza, J.L., 2016. Dynamic model of an industrial raceway reactor for microalgae production. Algal Research 17, 67-78.

Ferreira, M., Coutinho, P., Seixas, P., Fábregas, J., Otero, A., 2009. Enriching rotifers with "Premium" microalgae. *Nannochloropsis gaditana*. Marine Biotechnology 11, n. 5, 585-595.

Ferreira, V. D. S. e Sant'Anna, C., 2017. Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. World Journal of Microbiology and Biotechnology 33, 1-8.

Ferziger, J.e Peric, M., 2002. Computational Methods in Fluid Dynamics. Springer.

Flynn, K. e Butler, I., 1986. Nitrogen sources for the growth of marine microalgae: role of dissolved free amino acids. Marine Ecology - Progress Series 34, n. 1958, 281-304.

Gómez-Pérez, C.A., Espinosa, J., Montenegro Ruiz, L.C., Van Boxtel, A.J.B., 2015. CFD simulation for reduced energy costs in tubular photobioreactors using wall turbulence promoters. Algal Research 12, 1-9.

Guiry, M. D., 2012. How many species of algae are there? Journal of Phycology 48, n. 5, 1057-1063.

He, Y., Lin, G., Rao, X., Chen, L., Jian, H., Wang, M.; Guo, Z., Chen, B., 2018. Microalga *Isochrysis galbana* in feed for *Trachinotus ovatus*: effect on growth performance and fatty acid composition of fish fillet and liver. Aquaculture International 26, n. 5, 1261-1280.

Huang, J., Qu, X., Wan, M., Ying, J., Li, Y., Zhu, F., Wang, J., Shen, G., Chen, J., Li, W., 2015. Investigation on the performance of raceway ponds with internal structures by the means of CFD simulations and experiments. Algal Research 10, 64-71.

Kaye, Y., Grundman, O., Leu, S., Zarka, A., Zorin, B., Didi-Cohen, S., Khozin-Goldberg, I., Boussiba, S., 2015. Metabolic engineering toward enhanced LC-PUFA biosynthesis in *Nannochloropsis oceanica*: Overexpression of endogenous δ12 desaturase driven by stress-inducible promoter leads to enhanced deposition of polyunsaturated fatty acids in TAG. Algal Research 11, 387-398.

Kommareddy, A. e Anderson, G., 2004. Analysis of currents and mixing in a modified bubble column reactor. The Canadian Society for Engineering in Agricultural, Food, and Biological Systems, 4105-4114.

Kulkarni, A. e Joshi, J.B., 2005. Bubble Formation and Bubble Rise Velocity in Gas - Liquid Systems□: A Review. Industrial & Engineering Chemistry Research 44, 5873-5931.

Lavens, P. e Sorgeloos, P.E., 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture.

López-Elías, J.A., Voltolina, D., Enríquez-Ocaña, F., Gallegos-Simental, G., 2005. Indoor and outdoor mass production of the diatom *Chaetoceros muelleri* in a mexican commercial hatchery. Aquaculture Engineering 33, 181-191.

Lubián, L.M., Montero, O., Moreno-Garrido, I., Huertas, I.E., Sobrino, C., Gonz, M., Par, G. , 2000. *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. Journal of Applied Phycology 12, n. 3, 249-255.

Ma, Y., Wang, Z., Yu, C., Yin, Y., Zhou, G., 2014. Evaluation of the potential of 9 *Nannochloropsis* strains for biodiesel production. Bioresource Technology 167, 503-509.

Ma, X. N., Chen, T.P., Yang, B., Liu, J., Chen, F., 2016. Lipid production from *Nannochloropsis*. Marine Drugs 14, n. 4, 61-79.

Macias-Sancho, J., Poersch, L.H., Bauer, W., Romano, L.A., Wasiekesky, W., Tesser, M.B., 2014. Fishmeal substitution with Arthrospira (*Spirulina platensis*) in a practical diet for *Litopenaeus vannamei*: Effects on growth and immunological parameters. Aquaculture 426-427, 120-125.

Meng, Y., Jiang, J., Wang, H., Cao, X., Xue, S., Yang, Q., Wang, W., 2015. The characteristics of TAG and EPA accumulation in *Nannochloropsis oceanica* IMET1 under different nitrogen supply regimes. Bioresource Technology 179, 483-489.

Milledge, J.J., 2011. Commercial application of microalgae other than as biofuels: A brief review. Reviews in Environmental Science and Biotechnology 10, n. 1, 31-41.

Mitra, M., Shah, F., Bharadwaj, S.V.V., Patidar, S.K., Mishra, S., 2016. Cultivation of *Nannochloropsis oceanica* biomass rich in eicosapentaenoic acid utilizing wastewater as nutrient resource. Bioresource Technology 218, 1178-1186.

Naduthodi, M.I.S., Barbosa, M.J., Van Der Oost, J., 2018. Progress of CRISPR-Cas Based Genome Editing in Photosynthetic Microbes. Biotechnology Journal 13, n. 9, 1-9.

Narala, R.R., Garg, S., Sharma, K.K., Thomas-Hall, S.R., Deme, M., Li, Y., Schenk, P.M., 2016. Comparison of Microalgae Cultivation in Photobioreactor, Open Raceway Pond, and a Two-Stage Hybrid System. Frontiers in Energy Research 4 September.

Norsker, N. e Barbosa, M.J., 2012. On Energy Balance and Production Costs in Tubular and Flat Panel Photobioreactors. Technikfolgenabschätzung – Theorie und Praxi 21, 54-62.

Olofsson, M., Nilsson, E., Del Pino, V., Legrand, C., Uronen, P., Lamela, T., Bergé, J.P., 2012. Seasonal Variation of Lipids and Fatty Acids of the Microalgae *Nannochloropsis oculata* Grown in Outdoor Large-Scale Photobioreactors. Energies 5, n. 5, 1577-1592.

Papapolymerou G., Karayannis V., Gougoulias N., Kantas D., Papadopoulos S., Spiliotis X., 2018. Growing *Chlorella vulgaris* into bioreactors set in solar greenhouse, towards biofuel: Nutrient composition. Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering 5, n. 2, 102-106.

Pauly, D., 2009. Beyond duplicity and ignorance in global fisheries. Scientia Marina 73, n. 2, 215-224.

Pegallapati, A.K., Arudchelvam, Y., Nirmalakhandan, N., 2013. Energetic Performance of Photobioreactors for Algal Cultivation. Environmental Science and Technology Letters, 2-7.

Pegallapati, A.K., Arudchelvam, Y., Nirmalakhandan, N., 2012. Energy-efficient photobioreactor configuration for algal biomass production. Bioresource Technology 126, 266-273.

Pillay, T.V. e Kutty, M., 2005. Aquaculture Principles and Practices. 1ª ed. Blackwell Science Ltd. ISBN 978-1-4051-0532-3.

Poliner, E., Panchy, N., Newton, L., Wu, G., Lapinsky, A., Bullard, B., Zienkiewicz, A., Benning, C., Shiu, S.H., Farré, E.M., 2015. Transcriptional coordination of physiological responses in *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779 under light/dark cycles. Plant Journal, 83, n. 6, 1097-1113.

Perner, I., Posten, C., Broneske, J., 2003. CFD Optimization of a Plate Photobioreactor Used for Cultivation of Microalgae. Engineering in Life Sciences 3, n. 7, 287-291.

Rampure, M.R., Kulkarni, A.A., Ranade, V.V., 2007. Hydrodynamics of bubble column reactors at high gas velocity: Experiments and computational fluid dynamics CFD simulations. Industrial and Engineering Chemistry Research 46, n. 25, 8431-8447.

Reynolds, C.S., 2006. The Ecology of Phytoplancton. 1ª ed. Cambridge University Press. ISBN 978-0-511-19094-0.

Richmond, A., 2004. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. 1ª ed. Blackwell Science Ltd. ISBN 0-632-05953-2.

Roselet, F., Maicá, P., Martins, T., Abreu, P.C., 2013. Comparison of open-air and semi-enclosed cultivation system for massive microalgae production in sub-tropical and temperate latitudes. Biomass and Bioenergy 59, 418-424.

Sampaio, L.A., Okamoto, M.H., Rodrigues, R.V., Tesser, M.B., 2016. Piscicultura Marinha: criação de bijupirá em sistemas de recirculação de água. Editora da FURG. ISBN 978-85-756-414-8.

Sandnes, J.M., Kallqvist, T., Wenner, D., Gislerod, H.R., 2005. Combined influence of light and temperature on growth rates of *Nannochloropsis oceanica*: linking cellular responses to large-scale biomass production. Journal of Applied Phycology 17, 515-525.

Siemens, 2017. User Guide STAR-CCM+ v12.02.

Slade, R. e Bauen, A., 2013. Microalgae cultivation for biofuels: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. Biomass and Bioenergy 53, 29–38.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering 101, n. 2, 87-96.

Stephenson, A.L., Kazamia, E., Dennis, J.S., Howe, C.J., Scott, S.A., Smith, A.G., 2010. Life-cycle assessment of potential algal biodiesel production in the united kingdom: A comparison of raceways and air-lift tubular bioreactors. Energy and Fuels 24, n. 7, 4062-4077.

Ugwu, C.U. e Aoyagi, H., 2012. Microalgal Culture Systems: An Insight into their Designs, Operations and Applications. Biotechnology 11, 127-132.

Vadiveloo, A., Moheimani, N.R., Kosterink, N.R., Cosgrove, J.J., Parlevliet, D., Gonzalez-Garcia, C., Lubián, L.M., 2016. Photosynthetic performance of two *Nannochloropsis spp*. under different filtered light spectra. Algal Research 19, 168-177.

Wijffels, R.H. e Barbosa, M.J., 2010. An Outlook on Microalgal Biofuels. Science 329, 796-799.

Yang, Z., Del Ninno, M., Wen, Z., Hu, H., 2014. An experimental investigation on the multiphase flows and turbulent mixing in a flat-panel photobioreactor for algae cultivation. Journal of Applied Phycology 26, 2097-2107.

Yu, G., Li, Y., Shen, G., Wang, W., Lin, C., Wu, H.; Chen, Z., 2009. A novel method using CFD to optimize the inner structure parameters of flat photobioreactors. Journal of Applied Phycology 21, n. 6, 719-727.

Zhang, Q., Xue, S., Yan, C., Wu, X., Wen, S., Cong, W., 2015. Installation of flow deflectors and wing baffles to reduce dead zone and enhance flashing light effect in an open raceway pond. Bioresource Technology 198, 150-156.

CAPÍTULO 1

Desempenho hidrodinâmico de dois diâmetros de injetores de ar no cultivo massivo de microalgas: abordagem experimental e computacional

Bruno Galler Kubelka[a,b], Waldir Terra Pinto[b], Paulo Cesar Abreu[a]

[a] Laboratório de Produção de Microalgas, Estação Marinha de Aquicultura, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande.

[b] Laboratório de Interação Fluido Estrutura, Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande.

Artigo publicado na revista Algal Research 27 (2017), 318-324.

Fator de Impacto 3,745

O Artigo completo encontra-se no Anexo I

6. CAPÍTULO 1 - RESUMO EXPANDIDO

O aumento da escala de sistemas de produção de microalgas passa pela minimização da sedimentação das células de *Nannochloropsis oceanica* pelo aumento da mistura da coluna de água. Uma maior mistura da coluna de água resulta em um aumento na produtividade, com maior exposição das células à luz e nutrientes. Neste estudo comparou-se o efeito de bolhas menores (6,5 mm), produzidas por nove dispersores de 1 mm de diâmetro, com bolhas maiores (9,0 mm) produzidas por um único dispersor de 3 mm de diâmetro. O uso de bolhas menores resultou no aumento da produção de até 36% da biomassa da microalga *N. oceanica* em fotobiorreatores cilíndrico fechado com volume de 300 L e tanques circulares aberto de 1600 L.

Palavras-chaves: Zonas mortas; Cultivo de microalgas; Escalonamento; Mistura da coluna de água.

6.1. Introdução

A transição de produção de microalgas em pequeno volume e condições controladas no laboratório para milhares de litros em tanques de cultivo expostos, sujeitos à oscilações naturais de temperatura, irradiância e precipitação é um obstáculo para atingir altas produtividades em fazendas comerciais. A busca de altas produtividades vem sendo tópico de diversos estudos na atualidade, principalmente através de melhorias pela engenharia genética ou pelo desenvolvimento de novas tecnologias que aumentem a produção e diminuam o custo de energia do sistema de cultivo (Borowitzka e Moheimani, 2013).

A criação de padrões de circulação no interior do tanque de cultivo pela transferência de energia para a coluna de água pode ser realizada pela injeção de bolhas de ar no fundo do tanque. A movimentação das bolhas em direção à superfície do tanque, resulta em uma movimentação na coluna de água adjacente (Borowitzka e Moheimani, 2013). A redução do tamanho de bolhas de ar resulta no aumento do coeficiente de transferência de massa e, como consequência, mais energia é transferida para a coluna de água (Kulkarni e Joshi, 2005). Como consequência ocorre uma redução no volume de zonas mortas e um aumento na turbulência. Este trabalho

avaliou, através de simulações de Dinâmica de Fluido Computacional (CFD) e experimentos, o volume de zonas mortas e a turbulência resultante de dois sistemas de injeção de bolhas de ar com diferentes tamanhos. Um sistema padrão de borbulhamento do Laboratório de Produção de Microalgas da Universidade Federal do Rio Grande, composto por um único injetor de 3 mm de diâmetro, foi comparado a outro sistema com um conjunto de nove injetores de 1 mm de diâmetro cada, perfazendo nos dois casos a mesma área. Após as análises numéricas, experimentos de crescimento foram realizados para comprovação dos resultados numéricos em sistemas de cultivo fotobiorreator cilíndrico fechado de 300 L e tanque circular aberto de 1600 L.

6.2. Materiais e Métodos

O programa comercial, STAR-CCM+, foi utilizado para realizar as simulações de CFD. Este programa inclui ferramentas de geração de geometria e malhas tridimensionais. Através destas, as duas configurações de injetores de ar foram desenhadas computacionalmente. A primeira reproduzindo o sistema padrão do Laboratório de Produção de Microalgas (LPM) da Universidade Federal do Rio Grande, um único injetor de 3,0 mm de diâmetro, que produz bolhas de 9,0 mm de diâmetro (Roselet et al., 2013). O outro sistema foi desenvolvido com um conjunto de nove injetores de bolhas de 1,0 mm de diâmetro cada, produzindo bolhas de 6,5 mm de diâmetro. A lei de Stokes foi aplicada na célula de microalga para calcular sua velocidade de sedimentação. Em seguida, a partir da velocidade vertical da coluna de água (parâmetro de saída das simulações). Com esta velocidade de sedimentação teórica é possível determinar o volume de zonas mortas do tanque de cultivo.

Os resultados numéricos foram verificados por quatro experimentos de cultivo da microalgas marinha *Nannochloropsis oceanica* em dois tanques de cultivo diferentes, fotobiorreator cilíndrico fechado de 300 L (dois experimentos) e tanque circular aberto de 1600 L (dois experimentos). O meio de cultura empregado utilizou fertilizantes comerciais de baixo custo, contendo sulfato de amônio (0,15 g L^{-1}), uréia (0,0074 g L^{-1}) e superfosfato de cálcio (0,025 g L^{-1}) (Faé Neto et al., 2018). Ambos os sistemas de cultivo foram submetidos à iluminação natural e tiveram a duração de 12 dias (fim da fase exponencial de crescimento). Medidas de crescimento (absorbância) e de fatores

abióticos (pH, temperatura e salinidade) foram realizados a cada dois dias logo acima (10 cm aproximadamente) do sistema de injeção de ar, mantendo uma homogeneidade na amostragem. O crescimento celular foi determinado pela absorbância em um comprimento de onda de 750 nm medidos com um espectrofotômetro FEMTO 600S. Para todos os dados analisados no presente trabalho, diferenças significativas (com 95% de intervalo de confiança) foram testadas por ANOVA com medidas repetidas.

6.3. Resultados e Discussões

Uma velocidade de sedimentação de $2{,}0E^{-6}$ m s^{-1} foi estimada através da Leis de Stokes. Esta velocidade corresponde ao valor da intensidade de circulação necessário para manter em suspensão uma célula de *N. oceanica*. Quando a velocidade de circulação no interior do tanque esteve abaixo desta, formaram-se zonas de sedimentação conhecidas como zonas mortas. Esta velocidade é muito mais baixa do que a citada na literatura como a velocidade de formação de zonas mortas (Yu et al., 2009; Gómez-Pérez et al., 2015). Isto pode resultar em economia de energia e ser crucial para se atingir produções viáveis em tanques de maior volume.

Nas simulações por CFD foi observado uma redução de três pontos percentuais na presença de zonas mortas no sistema de injeção de ar com bolhas menores (9x1 mm). As bolhas menores conseguem transferir mais energia para a coluna de água adjacente em comparação com o sistema padrão (1x3 mm), com bolhas maiores. Além disso, o sistema de injeção de ar melhorado apresentou uma dissipação mais homogênea da energia turbulenta na coluna de água. Sugerimos que ambas as análises poderiam justificar um aumento na produção do sistema de injeção de ar melhorado, com bolhas menores, sem um acréscimo no gasto de energia. Logo, esses resultados foram testados experimentalmente.

Nos experimentos dos fotobiorreatores cilíndricos fechados de 300 L o ganho de densidade do sistema otimizado sobre o sistema padrão do LPM foi de 16% no primeiro experimento e 36% no segundo. Para os tanques circulares aberto de 1600 L, foi observado um ganho de biomassa de 33% no terceiro experimento e de 7% no quarto experimento. Todos estes resultados de ganho foram calculados a partir de uma

densidade final dos experimentos de cultivo estatisticamente ($p<0,05$) maior do sistema de injeção de ar melhorado (bolhas menores).

6.4. Conclusões

As variáveis de desempenho hidrodinâmico aplicadas neste trabalho, obtidas a partir da saída das simulações de CFD, se mostraram bons indicadores para a seleção de sistemas de cultivo de microalgas mais produtivos. O sistema de injeção de bolhas de ar melhorado com bolhas menores resultou em um menor volume de zonas mortas e uma dissipação mais homogênea da energia de turbulência na coluna de água, sugerindo uma maior mistura da coluna de água sem acréscimo no gasto de energia. Os resultados numéricos se mostrara adequados para aplicação em estudos de melhorias de sistemas de cultivo, quando foi observado ganhos de densidade significativos em ambos os sistemas de cultivo, isto é, tanto fotobiorreatores cilíndricos fechados (300 L), como tanques circulares abertos (1600 L).

Referências

Borowitzka, M.A., Moheimani, N.R., 2013. Algae for Biofuels and Energy. 1ª ed. Springer Netherlands, Dordrecht. ISBN 978-94-007-5478-2.

Faé Neto, W.A., Borges, C.R.M., Abreu, P.C., 2018. Carotenoid production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* in different low-cost culture media. Aquaculture Research 49, 2597-2535.

Gómez-Pérez, C.A., Espinosa, J., Montenegro Ruiz, L.C., Van Boxtel, A.J.B., 2015. CFD simulation for reduced energy costs in tubular photobioreactors using wall turbulence promoters. Algal Research 12, 1-9.

Kulkarni, A. e Joshi, J.B., 2005. Bubble Formation and Bubble Rise Velocity in Gas - Liquid Systems□: A Review. Industrial & Engineering Chemistry Research 44, 5873-5931.

Roselet, F., Maicá, P., Martins, T., Abreu, P.C., 2013. Comparison of open-air and semi-enclosed cultivation system for massive microalgae production in sub-tropical and temperate latitudes. Biomass and Bioenergy 59, 418-424.

Yu, G., Li, Y., Shen, G., Wang, W., Lin, C., Wu, H.; Chen, Z., 2009. A novel method using CFD to optimize the inner structure parameters of flat photobioreactors. Journal of Applied Phycology 21, n. 6, 719-727.

CAPÍTULO 2

A ação de bolhas de ar pequenas no aumento da exposição à irradiância e da produção em sistema de cultivo massivos da microalga marinha *Nannochloropsis oceanica*

Bruno Galler Kubelka[a,b], Fabio Roselet[a], Waldir Terra Pinto[b], Paulo Cesar Abreu[a]

[a] Laboratório de Produção de Microalgas, Estação Marinha de Aquicultura, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande.

[b] Laboratório de Interação Fluido Estrutura, Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande.

Artigo publicado na revista Algal Research 35 (2018), 569-576.

Fator de Impacto 3,745

O Artigo completo encontra-se no Anexo II

7. CAPÍTULO 2 - RESUMO EXPANDIDO

O desenvolvimento de um sistema de produção economicamente viável depende de um cultivo altamente denso com um gasto mínimo de energia. Estudos anteriores mostraram que a redução do tamanho de bolhas de ar (9,0 mm para 6,5 mm) resultou em ganho de biomassa de *Nannochloropsis oceanica* sem um gasto extra de energia. No entanto, diferenças na produção foram verificadas somente a partir do quarto dia de cultivo. Hipotetizamos que tais diferenças devem resultar de uma maior exposição das células à luz incidente ou, alternativamente, a uma maior absorção de nutrientes inorgânicos dissolvidos (N e P). Para testar estas hipótese, a concentração de nutrientes e irradiância foram medidas durante 10 dias de cultivo em fotobiorreatores cilíndricos de 330 L e tanques abertos circulares de 1600 L. Os resultados mostraram que a concentração de nutrientes não foi estatisticamente diferente entre os tratamentos. No entanto, as diferenças entre produção de biomassa começaram a aparecer somente quando a densidade de cultivo chegou a certo limiar e a intensidade de luz a 5,0 cm de profundidade foi consideravelmente reduzida, indicando que a luz é o fator limitante e que o sistema de borbulhamento otimizado, expõe as células mais frequentemente a luz. Estes resultados foram confirmados também por simulações Lagrangianas por modelo de Dinâmica Computacional de Fluidos (CFD).

Palavras-chaves: Melhorias na mistura; Concentração de nutrientes; Limitação do crescimento microalgal; disponibilidade de luz; Dinâmica de Fluidos Computacional.

7.1. Introdução

A interação entre a fisiologia da célula e uma mistura da coluna de água eficiente é uma abordagem chave para aperfeiçoar sistemas de cultivo de microalgas (Tredici, 2010). Uma mistura eficiente poderá fornecer nutrientes para a células de forma mais eficiente (Andersen, 2005) e/ou gerar maior exposição das microalgas a luz incidente (Carvalho et al., 2011). A demanda energética do sistema de mistura deve manter estas condições ótimas com gasto mínimo, maximizando a produção e minimizando os custos (Borowitzka e Moheimani, 2013). Kubelka et al. (2017) mostraram que o uso de bolhas menores gera um ganho de biomassa observado de 7,0 até 36,0 % em relação a condições com bolhas maiores, sem gasto extra de energia. Entretanto, estes autores

observaram que diferenças de biomassa somente ocorriam após quatro a seis dias de cultivo em fotobiorreatores cilíndricos fechados (330 L) e em tanques circulares abertos (1600 L). Porém, a causa especifica deste padrão repetitivo de diferença entre a produção dos diferentes tamanhos de injetores de bolhas de ar com diferentes diâmetros permaneceu incerta (9x1,0 mm vs. 1x3,0 mm).

Durante o crescimento de um cultivo por batelada de microalgas, a densidade do cultivo aumenta no decorrer do cultivo até o final da fase exponencial. Nas fases posteriores de crescimento (estacionária e senescente) a penetração da luz é reduzida e a concentração de nutrientes decresce (Borowitzka e Moheimani, 2013). Neste estudo, testamos a hipótese de que a disponibilidade de luz e/ou nutrientes seriam fatores limitantes para o crescimento da microalga marinha *Nannochloropsis oceanica*, sendo que o sistema de borbulhamento melhorado minimizou uma destas limitações. Para testar esta hipótese, foram realizados experimentos com tratamentos de diferentes tamanhos de bolhas de ar em diferentes tanques de cultivo (fotobiorreatores cilíndricos fechados e em tanques circulares abertos), como descrito em Kubelka et al., (2017). Para isto, medidas de nutrientes e irradiância foram realizadas simultaneamente com as medidas de produção de biomassa durante 10 dias de cultivo. Adicionalmente, simulações com um modelo Lagrangiano foram realizadas pelo programa comercial de Dinâmica de Fluidos Computacional, STAR-CCM+, com o objetivo de comparar a frequência de exposição das células de microalgas a luz incidente nos dois tamanhos diferentes injetores de bolhas de ar.

7.2. Materiais e Métodos

Os experimentos de crescimento da microalga marinha *N. oceanica* seguiu a mesma metodologia que o trabalho anterior. Porém, agora as medições de crescimento foram realizadas pelo método de peso seco por filtros de fibra de vidro de 0,7 µm previamente secos. O filtrado foi usado para medir as concentrações dos seguintes nutrientes: *i*) nitrogênio amoniacal ($N\text{-}NH_4^+$); *ii*) nitrato ($N\text{-}NO_3^-$); *iii*) fosfato ($P\text{-}PO_4^{-3}$). Além disso, medições de irradiância a 5,0 cm de profundidade foram realizadas pelo sensor da LICOR, modelo 192. A ANOVA de medidas repetidas foi aplicada e não mostrou diferenças significativas no valores iniciais de concentração de nutrientes e biomassa.

Valores similares de irradiância (entre os tratamentos) foram medidos na superfície de cada tanque durante todos os dias de experimentos. As amostragens foram realizadas a cada dois dias.

Os tanques computacionais e suas malhas foram os mesmos que nas simulações do trabalho anterior. Porém neste trabalho, além de simular a movimentação de ar e água, uma terceira fase foi adicionada, as partículas de *N. oceanica*. Características como o diâmetro da célula (4,0 μm) e a densidade de cultivo (1050 kg m^{-3}) foram inseridas como entrada do modelo. Assim, um modelo Lagrangiano no programa comercial, STAR-CMM+, foi utilizado para simular a trajetória da partícula/célula de microalga no interior de um fotobiorreator cilíndrico fechado de 330 L.

7.3. Resultados e Discussões

Assim como no Capítulo anterior, os sistemas de injeção de bolhas de ar menores (injetores de 9x1 mm de diâmetro; bolhas de 6,5 mm de diâmetro) apresentaram ganhos significativos de biomassa ao final do período de cultivo. Nos experimentos 1 e 2, com o fotobiorreator, os ganhos foram de 22% e 24%, respectivamente e no experimento 3, com o tanque circular, o ganho de biomassa foi de 43%. A diferença na produção da biomassa ficou evidente mais uma vez após quatro a seis dias de cultivo, em ambos os sistemas de cultivo. Neste período de cultivo a concentração de nutrientes não foi diferente entre os tratamentos, indicando que nutrientes inorgânicos dissolvidos não foram limitantes ao crescimento das microalgas nos três experimentos. Mais precisamente, a concentração de nutriente permaneceu elevada do início ao fim do período de cultivo avaliado.

Por outro lado, no período de 4-6 dias de cultivo houve uma queda brusca (de 200 para menos que 50 μmol photons m^{-2} s^{-2}) na irradiância incidente a 5,0 cm de profundidade para todos os experimentos (fotobiorreatores e tanque circular), o que indica que a luz é um fator limitante devido, provavelmente, ao auto-sombreamento das células no cultivo. Sugerimos também que condições de maior turbulência (mistura da coluna de água) no sistema de injeção de bolhas de ar menores (9x1 mm) resultou um melhor aproveitamento da pouca disponibilidade de luz, incrementando a produção do cultivo.

As simulações de acompanhamento das trajetórias das células no interior do fotobiorreator mostraram que o sistema de injeção de bolhas de ar menores (9x1,0 mm) resultaram em uma aumento de uma ordem de grandeza na frequência de exposição a luz, se comparado ao sistema com bolhas maiores.

7.4. Conclusões

Os dados experimentais aqui avaliados mostram que as concentrações de nutrientes não foram afetadas pelo tratamento com bolhas de ar menores. No entanto, as medidas de irradiância mostraram que no período de quatro e seis dias de cultivo, a luz no tanque foi reduzida significativamente como consequência do crescimento celular. Neste ponto, a luz se torna um fator limitante para o crescimento de microalgas. Entretanto, uma condição de mistura melhorada, resultante das bolhas menores, minimizou essa limitação. Portanto, um ganho significativo de biomassa foi observado no sistema com bolhas menores se comparado ao com bolhas maiores. Os resultados numéricos corroboraram essas observações experimentais, mostrando que a distribuição ótima de turbulência e a transferência de movimento de ar para cultura resultam em maior frequência de exposição à luz e menor tempo de permanência em áreas escuras do tanque de cultivo.

Referências

Andersen, R.A., 2005. Algal Culturing Techniques. 1ª ed. Elsevier Academic Press. ISBN 0-12-088426-7.

Borowitzka, M.A., Moheimani, N.R., 2013. Algae for Biofuels and Energy. 1ª ed. Springer Netherlands, Dordrecht. ISBN 978-94-007-5478-2.

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

Kubelka, B.G., Pinto, W.T.; Abreu, P.C., 2017. Hydrodynamic performance of two air nozzles diameters on the massive microalgae culture: Computational and experimental approaches. Algal Research 27, 318-324.

Tredici, M.R., 2010. Photobiology of microalgae mass cultures: understanding the tools for the next green revolution, Biofuels 1, 143-162.

CAPÍTULO 3

Melhorias no controle da vazão de ar para economia de energia na produção da microalga marinha *Nannochloropsis oceanica* em fotobiorreatores de grande volume

Bruno Galler Kubelka[a,b], Eduardo Prietsch[a], Roberta Figueiró[a], Fabio Roselet[a], Waldir Terra Pinto[b], Paulo Cesar Abreu[a]

[a] Laboratório de Produção de Microalgas, Estação Marinha de Aquicultura, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande.

[b] Laboratório de Interação Fluido Estrutura, Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande.

Artigo a ser submetido a revista Algal Research.

Fator de Impacto 3,745

8. CAPÍTULO 3

RESUMO

O alto conteúdo lipídico, juntamente com características de alta produtividade e rusticidade da microalga marinha *Nannochloropsis oceanica*, faz com que seu cultivo massivo tenha um alto potencial de uso como fonte lipídica para biocombustíveis e bioprodutos. Entretanto, o custo de produção da biomassa de microalgas é ainda muito elevado para que estas atividades comerciais prosperem. A injeção de bolhas de ar é uma etapa essencial do dispendioso processo de cultivo de microalgas, impedindo a sedimentação das células e aumentando a exposição destas à luz e nutrientes, sendo necessário melhorar este sistema para se aumentar a mistura/circulação da coluna de água de fotobiorreatores de colunas borbulhantes. O controle da vazão de ar que entra no tanque é uma maneira eficaz de reduzir a demanda de energia e, consequentemente, os custos da produção da biomassa. Com auxílio da ferramenta *Computational Fluid Dynamics*, a eficiência de cinco vazões de ar foi avaliada. Dentre estes testes, três casos de simulação foram selecionados para realização de experimentos de crescimento em fotobiorreatores cilíndricos fechados com volume de 330 L. Estas vazões foram escolhidas por apresentar como resultados menor percentual de zonas mortas e menor demanda de energia. Nos experimentos, a energia líquida resultante foi calculada considerando a demanda de energia do sistema de injeção de ar e a estimativa da energia extraída do lipídio produzido pelas microalgas com estas vazões de ar. O melhor desempenho ocorreu no caso 2 (0,0024 vvm), mesmo apresentando uma energia líquida negativa (-2,65 ± 0,51 W m^{-3}). Entretanto, este resultado pode ser melhorado com melhorias adicionais do sistema de injeção de ar para o fotobiorreator de coluna borbulhante com volume de 330 L, que serão determinados em futuras simulações numéricas.

ABSTRACT

The high lipid content, along with other environmentally friendly characteristics of the production of marine microalgae *Nannochloropsis oceanica*, makes its biomass a high potential of use as a lipid source for biofuels and bioproducts. However, the cost of producing microalgae biomass is still too high for these commercial activities to thrive. The injection of air bubbles is an essential and expensive process of microalgae cultivation, preventing the cells to settle and increasing their exposure to light and nutrients, and it is necessary to improve this system to increase the mixing/circulation of the water column of bubble column photobioreactors. Controlling the air flow rate entering the tank is an effective way to reduce the energy demand and, consequently, the costs of biomass production. With the help of the Computational Fluid Dynamics tool, the efficiency of five airflow rates was evaluated in closed cylindrical photobioreactors of 330 L. Among these tests, three simulation cases were selected for growth experiments. These air flow rates were chosen due to the lower percentage of dead zones and lower energy demand. The resulting net energy was calculated considering the energy demand of the air injection system and the estimated energy extracted from the lipids produced by the microalgae with these airflows. The best performance occurred in case 2 (0.0024 vvm), even with a negative net energy (-2.65 ± 0.51 W m^{-3}). However, this result can be improved with additional improvements of the air injection system for the 330 L bubble column photobioreactor, which will be determined in the future with numerical simulations that will allow to balance the energy use with the achieved productivity.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, houve um número crescente de pesquisas voltadas ao cultivo massivo de microalgas marinhas do gênero *Nannochloropsis* (Borowitzka, 1999; Narala et al., 2016). Isto está, em parte, relacionado ao potencial destas microalgas em produzir grandes quantidades de lipídeos e ácidos graxos poli-insaturados de elevado valor comercial (Alves Sobrinho et al., 2015; Borges et al., 2016). Em algumas espécies do gênero *Nannochloropsis* o conteúdo de lipídeos pode representar até 60% da biomassa seca (Rodolfi et al., 2009). O alto conteúdo lipídico, juntamente a

possibilidade de utilizar como meio de cultura nutrientes (Nitrogênio e Fósforo) aproveitados de efluentes descartados por outras atividades (Mitra et al., 2016), bem como neutralização de gases do efeito estufa, especialmente o dióxido de carbono (Borowitzka e Moheimani, 2013), fazem com que o desenvolvimento de um sistema de produção de *Nannochloropsis* de baixo custo e de alta rentabilidade comercial seja de particular interesse (Chua e Schenk, 2017).

A viabilidade econômica de um sistema de cultivo de microalgas depende de cultivos altamente densos com um gasto energético mínimo (Acién et al., 2012). Ou seja, a produção da microalga precisa apresentar ganhos líquidos no balanço energético entre o gasto de sua produção e a energia que pode ser extraída de sua biomassa (Arudchelvam e Nirmalakhandan, 2012; Pegallapati et al., 2013) ou, pelo menos, de valores do balanço de energia líquidos neutros (zero). Um balanço positivo pode ser conseguido ultrapassando as limitações como a alta demanda de energia para misturar e circular as células de microalgas no interior de tanques de cultivo (Norsker e Barbosa, 2012). De toda a cadeia de produção de biomassa de microalgas, aproximadamente 27% do custo total deve-se ao consumo de energia do sistema de mistura de tanques de cultura (Acién et al., 2012). Entretanto, ajustes no sistema de injeção de ar são de simples execução e podem resultar em mudanças significativas, reduzindo a demanda de energia do sistema de cultivo (Bitog et al, 2011).

Controlar a vazão de ar dos sistemas de mistura é uma forma eficaz de melhorar o balanço energético de um reator de produção de microalgas (Pegallapati et al., 2013). No entanto, se a vazão de ar injetada no tanque de cultivo for reduzida, a velocidade superficial do gás dentro do tanque também será reduzida (Kulkarni e Joshi, 2005). Isso pode resultar no aumento da sedimentação das células de microalgas formando as chamadas zonas mortas (Kubelka et al., 2017; Yang et al., 2014), diminuindo sua produtividade (Kubelka et al., 2018). Para se obter máxima produção com menor custo, deve-se encontrar uma vazão de ar ótima, que permita máxima circulação da água e produção da microalga (Sierra et al., 2008). Calculando a energia líquida decorrente da diferença entre a energia gasta para se produzir a microalga e a energia que se pode extrair desta biomassa produzida permite uma estimativa do balanço energético que pode ser utilizado para melhorias nas vazões utilizadas nos tanques de cultivo. Neste estudo a determinação da energia líquida foi determinada pela diferença entre a energia

gasta no sistema de injeção de bolhas de ar e a energia estimada através da extração de lipídios da biomassa das microalgas produzidas (Arudchelvam e Nirmalakhandan, 2012; Pegallapati et al., 2013).

Alguns trabalhos foram realizados para encontrar vazões de ar ótimas em tanques de cultivo de microalgas. Por exemplo, Norsker et al. (2012) estudaram a relação das vazões de ar e o balanço energético líquido em reatores de placa-plana e evidenciaram a forte influência da hidrodinâmica do sistema de injeção de ar na economia da biomassa de microalgas. Modificações na velocidade de entrada de ar de fotobiorreatores tubulares foram feitas por Zhang et al. (2013), observando a relação de produtividade e consumo de energia, os autores descobriram que a maior velocidade de entrada causava dano celular em microalgas de água doce *Chlorella sp.* e a velocidade intermediária foi escolhida como a mais benéfica para a produção e a economia do sistema.

O fotobiorreator de 330 L (PBR) do Laboratório de Produção de Microalgas na Universidade Federal do Rio Grande (FURG) é usado para cultivar a microalga marinha *Nannochloropsis oceanica*. Desde 2013 vários estudos foram realizados para desenvolver um sistema de produção de baixo custo e economicamente viável (Roselet et al., 2013; Kubelka et al., 2017; Kubelka et al., 2018), de modo que os altos valores nutricionais e conteúdos lipídios desta microalga possam ser produzidos em larga escala em instalações comerciais (Borges et al., 2016; Faé Neto et al., 2018). Os sistemas de injeção de ar dos PBR já foram otimizados em relação ao tamanho da bolha (Kubelka et al., 2017; Kubelka et al., 2018). Neste estudo pretendemos determinar a vazão de ar mais adequada para o sistema de cultivo em questão, levando em conta a produção final de biomassa de *Nannochloropsis oceanica* e o balanço líquido de energia gasto para atingir essa produção final. O programa de Dinâmica dos Fluidos Computacional (CFD) foi utilizado para se testar *in silico* as melhores vazões de ar para a produção máxima da microalga *N. oceanica*. A partir destas simulações que avaliaram a porcentagem de zonas mortas, foram selecionadas algumas vazões para serem testadas experimentalmente em fotobiorreatores cilíndricos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Simulações da otimização da vazão de ar

2.1.1. Geometria e malha computacional do tanque

A geometria do tanque é uma reprodução computacional de um arranjo experimental no Laboratório de Produção de Microalgas da Universidade Federal do Rio Grande. A Figura 1 mostra os dois tanques, representação numérica e configuração experimental. O volume de uso regular para o fotobiorreator de cultura é de 330 L (0,33 m^{-3}) com uma altura de coluna de água de 1,25 m. Testes de seleção de malha foram executados (Kubelka et al., 2017) e os diagnósticos de malha foram avaliados (Siemens, 2017), ambos os procedimentos garantiram alta qualidade de malha para as simulações atuais.

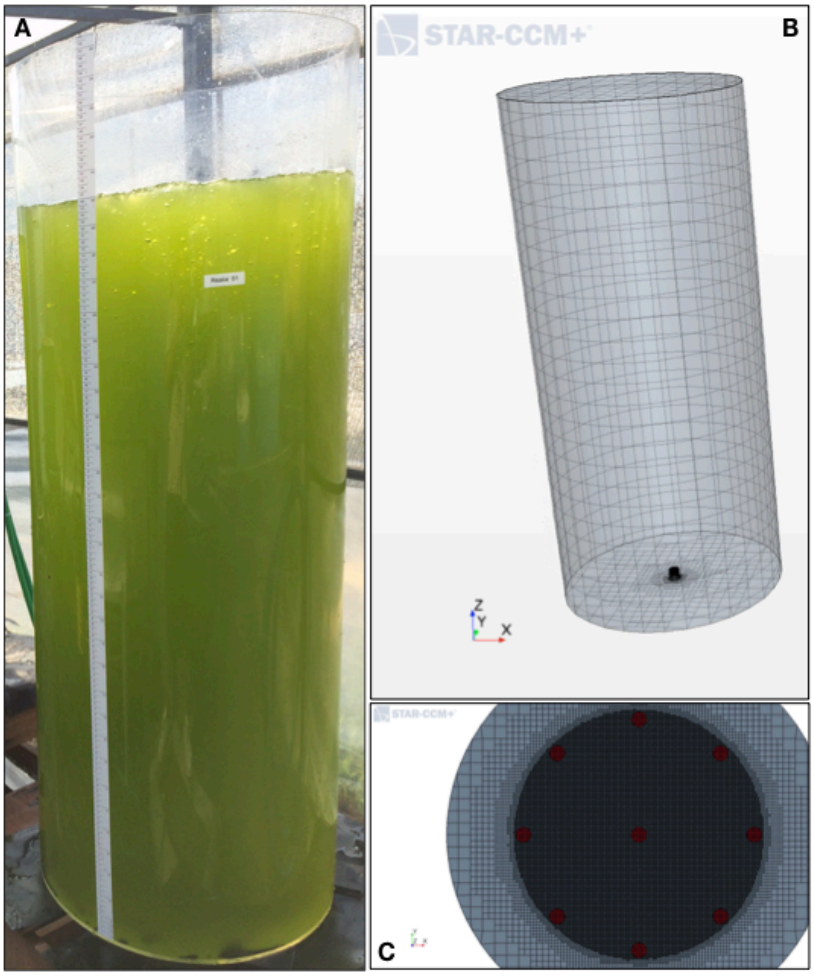


Figura 1: Fotobiorreator de 330 L de coluna borbulhante utilizados no estudo de otimização da vazão de ar no Laboratório de Produção de Microalgas da Universidade

Federal do Rio Grande, Brasil. A) configuração experimental; B) Geometria computacional/malha do tanque; C) Aproximação dos injetores de ar.

2.1.2. Condições iniciais e de contorno

Na medida em que as simulações são executadas, o ar entra pelo fundo do tanque através de um bocal de ar composto por nove injetores de ar de 1 mm (Kubelka et al., 2017) (Figura 1C). Uma condição de desgaseificação (saída de ar) foi ajustada para a parede superior do fotobiorreator (PBR). As paredes do tanque não permitem a saída de ar nem de água. O ajuste da vazão de ar (Q) foi controlado numericamente pela velocidade inicial do ar (U), a qual é calculada pela Equação 1 e os cálculos das condições iniciais de velocidade são mostrados na Tabela 1.

$$U = \frac{Q}{A} \qquad \text{Equação 1}$$

Onde A é a área de injeção das bolhas de ar.

Outras condições iniciais aplicadas nas simulações multifásicas são a densidade de partículas de microalgas (1050 kg m^{-3}), tamanho médio de bolha (6,5 mm), velocidade média de subida da bolha (0,72 m s^{-1}) e diâmetro de partículas/microalgas (4,0 μm). Estes são parâmetros essenciais de entrada e são descritos em detalhes por Kubelka et al. (2017) e Neto et al. (2008).

Tabela 1: Resultados das simulações de CFD para todos os casos estudados. **Q** corresponde a vazão de ar, **U** é a velocidade de entrada do ar, correspondentes a **Q**, para as simulações, **DZ** é a porcentagem de Zonas Mortas e $\mathbf{P_{in}}$ é a demanda de energia do sistema de injeção de ar.

Caso	**Q** (vvm)	**U** (m s^{-1})	**DZ** (%)	$\mathbf{P_{in}}$ (W m^{-3})
1	0,0012	0,105	86,25	3,03
2	0,0024	0,210	77,49	6,06

3	0,0082	0,720	75,55	21,00
4	0,0170	1,470	74,12	42,00
5	0,0242	2,100	73,82	63,00

2.1.3. Melhorias e considerações hidrodinâmicas

Os fotobiorreatores do Laboratório de Produção de Microalgas possuem um sistema de mistura por coluna borbulhante, onde o ar entra no fundo e no centro do tanque e as bolhas de ar sobem para a superfície da água. Zonas mortas são criadas onde uma velocidade mínima na água não ultrapassa a velocidade de sedimentação característica da espécie. As zonas mortas de *Nannochloropsis oceanica* podem ser evitadas por velocidades verticais acima de $2{,}06E^{-6}$ m s^{-1} (Kubelka et al., 2017). A velocidade de sedimentação de *N. oceanica* foi comparada, para um segundo de simulação, com velocidades médias para todo o volume do tanque. Em cada caso analisado, foi determinada uma porcentagem de zonas mortas (DZ). DZ foi utilizado como variável de melhoria para selecionar os casos a serem testados experimentalmente (Kubelka et al., 2017).

2.2. Métodos de cultivo

2.2.1. Condições da cultura

A espécie utilizada nos experimentos de cultivo, *N. oceanica* (Eustigmatophyceae), foi cultivada em água do mar natural (a salinidade variou de acordo com a época do ano e o clima - Tabela 2) e filtrada através de filtros de polipropileno de 1,0 µm. Após a filtração, hipoclorito de sódio a 12% (0,15 mL L^{-1}) foi adicionado e após 24 horas foi neutralizado com ácido ascórbico (30 mg L^{-1}) (Andersen, 2005). Um meio à base de fertilizante foi adicionado no início do experimento e foi composto por sulfato de amônio (150,0 mg L^{-1}), ureia (7,5 mg L^{-1}) e superfosfato de cálcio (25,0 mg L^{-1}) (Faé Neto et al, 2018). Os tanques foram colocados em estufas externas, de modo que a irradiância e o fotoperíodo foram naturais. O posicionamento dos fotobiorreatores foi idealizado para mitigar o sombreamento entre os tanques, assim a luz incidente foi igual para cada tanque (Tabela 2). Temperatura e pH não foram controlados, mas foram

medidos todos os dias como mostrado na Tabela 2. Amostras de todas as variáveis analisadas foram coletadas 10,0 cm acima dos injetores de ar para garantir uma amostra de cultura bem misturada.

Tabela 2: Data, estação, média ± DP, valores mínimo e máximo de temperatura (**T - ° C**), salinidade (**S**), pH e Irradiância Superficial (**L_{Sup}**) medidos durante experimentos de crescimento (**Exp.**) Com a microalga marinha *Nannochloropsis oceanica* em 330 L fotobiorreator cilíndrico fechado vertical (PBR) com a vazão de ar correspondente (tratamento) **- Q**.

Exp.	Data/estação	Q (vvm)	T (˚C)	pH	S	L_{Sup}
1	13th – 25th Dec. 2017 (Austral summer)	0,0024	28,94 ± 3,66 22,75 – 35,50	9,45 ± 0,59 7,69 – 9,89	20,07 ± 0,27 20,00 – 21,00	720,34 ± 370,54 179,50 – 1235,00
		0,017	29,44 ± 3,69 22,75 – 35,00	9,47 ± 0,64 7,58 – 9,93	20,21 ± 0,54 20,00 – 21,50	697,63 ± 337,07 230,20 – 1230,00
2	05th – 15th Jan. 2018 (Austral summer)	0,0024	33,75 ± 1,28 31,40 – 37,10	8,51 ± 0,39 7,45 – 9,05	33,85 ± 0,58 33,15 – 34,72	910,73 ± 168,41 555,30 – 1099,00
		0,017	33,51 ± 1,45 31,30 – 37,60	8,42 ± 0,40 7,49 – 9,02	33,89 ± 0,67 33,10 – 34,95	768,36 ± 216,66 457,30 – 1147,00
3	23th Jan. – 01st Feb. 2018 (Austral summer)	0,0024	32,17 ± 1,56 28,75 – 33,65	8,35 ± 0,39 7,37 – 8,65	22,03 ± 0,38 21,56 – 22,57	744,70 ± 273,03 269,35 – 930,35
		0,017	31,77 ± 1,61 28,35 – 33,65	8,31 ± 0,39 7,36 – 8,70	22,04 ± 0,40 21,68 – 22,63	779,93 ± 303,61 291,90 – 1.092,00
4	26th Mar. – 09th Apr. 2018 (End of austral summer)	0,0024	29,39 ± 5,44 20,45 – 30,75	9,40 ± 0,33 7,62 – 9,62	29,50 ± 0.5 28.30 – 30.00	735,81 ± 171,83 484,80 – 986,00
		0,0012	29,35 ± 4,67 21,75 – 32,50	9,38 ± 0,29 7,69 – 9,59	29.55 ± 0,48 28,38 – 30,10	805,83 ± 170,03 480,55 – 940,80
5	04th – 14th May 2018 (Austral fall)	0,0024	29,90 ± 2,60 27,50 – 35,00	9,55 ± 0,25 8,79 – 9,73	30,50 ± 0,10 30,30 – 30,70	371,89 ± 193,28 216,65 – 665,00
		0,0012	29,95 ± 2,55 27,35 – 34,95	9,59 ± 0,28 8,74 – 9,73	30,40 ± 0,1 30,20 – 30,60	411,51 ± 277,28 214,60 – 879,65
6	24th – 14th May 2018 (Austral fall)	0,0024	29,55 ± 2,67 27,10 -34,00	9,50 ± 0,48 8,32 – 9,66	28,92 ± 0,22 28,70 – 29,14	381,09 ± 153,58 195,15 – 605,00
		0,0012	29,50 ± 2,55 27,12 – 34,15	9,52 ± 0,49 8,36 – 9,69	28,90 ± 0,21 28,69 – 29,12	401,59 ± 250,26 215,60 – 755,61

A injeção de ar em cada fotobiorreator de 330 L foi controlada por rotâmetros (erro estimado em 10%) e foi ajustada como mostrado na Tabela 1, de acordo com o experimento de cultivo. Quatro fotobiorreatores foram usados em cada experimento, dois para cada tratamento de vazão de ar, e os experimentos foram repetidos no tempo. Portanto, três experimentos para cada comparação foram avaliados: *i*) vazão de ar intermediária (0,0024 vvm) vs. vazão de ar alta (0,017 vvm); *ii*) vazão de ar baixa (0,0012 vvm) vs. vazão de ar intermediária (0,0024 vvm).

2.2.2. Análises de crescimento

Das amostras coletadas diariamente, a biomassa foi estimada por medida de absorbância da água em um comprimento de onda de 750 nm. Embora este método de análise de crescimento possa conter algumas imprecisões ao relacioná-lo ao crescimento de microalgas (Baroni et al., 2019), foi crucial estimar instantaneamente a fase de crescimento para a cultura. Uma vez caracterizada a fase estacionária, os experimentos foram encerrados.

A cada dois dias, a contagem de células foi realizada. Nos experimentos 4, 5 e 6, a contagem de células foi aplicada para avaliar a presença de detritos nos últimos dias de experimentos, levando à superestimativa da produção de microalgas para o tratamento com vazão de ar baixa. A contagem de células foi feita com um hemocitômetro de Neubauer, contando com um mínimo de 400 células de microalgas, logo o erro de estimativa foi de 10% (Becker, 1994).

A biomassa de microalgas foi também determinada por medidas do peso seco, em filtros de fibra de vidro pré-pesados de 0,7 µm (GF/F) e lavados com formiato de amônio 0,65 M (10 ml) para remover os sais absorvidos, de acordo com Borowitzka e Moheimani (2013). A partir da biomassa, a Equação 2 foi usada para calcular a taxa de produção volumétrica (B_p).

$$B_p = \frac{B_f - B_i}{t} \qquad \text{Equação 2}$$

Onde, B_f é a biomassa no final do experimento, B_i é a biomassa inicial e t representa o tempo de duração do experimento.

2.2.3. Análise estatística

Primeiramente os dados foram testados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homocedasticidade (teste de Levene). Posteriormente, estas premissas sendo satisfeitas, a significância das diferenças entre a biomassa nas duas condições de mistura (vazões de ar) foi determinada através de uma Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas. Um intervalo de confiança de 95% foi considerado para os testes de significância (Zar, 2010).

Todas as representações gráficas foram desenvolvidas com o Graphpad Prism 7. Todos os gráficos foram plotados pelo valor médio dos dados e as barras de erro são mostradas para representar os desvios padrão.

2.3. Balanço energético

2.3.1. Energia aplicada para o sistema de mistura

A mistura no fotobiorreator cilíndrico foi realizada por injeção de bolhas de ar e a vazão de ar foi medida/controlada por rotâmetros. Três vazões de ar distintas (Q) foram testadas, cada demanda de energia da vazão de ar (P_{in}) foi calculada a partir da equação 3, conforme descrito por Arudchelvam e Nirmalakhandan (2012):

$$P_{in} = \frac{Q\gamma h}{60V} \qquad \text{Equação 3}$$

Onde, γ é o peso específico da cultura de microalgas (γ = 9996 - N m^{-3}), h é a profundidade da cultura (1,25 m) e V é o volume da cultura (0,33 m^{-3}). Os valores de Q são mostrados na Tabela 3.

2.3.2. Energia produzida por lipídeos de N. oceanica

Uma estimativa da produção de energia a partir da produção lipídica de microalgas pode ser feita a partir da taxa volumétrica de produção de lipídeos determinada experimentalmente como realizado por Arudchelvam e Nirmalakhandan (2012). O trabalho atual não visou explorar a produção de lipídios, assim uma revisão na literatura, para *N. oceanica*, foi realizada determinando a taxa de produção de lipídios (L). Primeiro, uma extensa pesquisa sobre o conteúdo lipídico (% da biomassa) foi feita para encontrar um valor máximo de lipídio produzido pela *N. oceanica*. Existe a possibilidade do teor de lipídeos atingir até 60% do peso seco (Ma et al., 2014; Meng et al., 2015; Ma et al., 2016), e esse valor foi aplicado nos cálculos aqui apresentados. O segundo passo foi determinar taxa de produção de biomassa (B_p) de todos os experimentos, conforme descrito na equação 2. E finalmente, a taxa de produção de lipídios foi calculada pela equação 4.

$$\mathrm{L} = \frac{B_f f - B_0 f_0}{\Delta t} \qquad \text{Equação 4}$$

Aplicando L na equação 5, se calcula a produção de energia a partir de lipídeos, $\mathrm{P_{out}}$.

$$\mathrm{P_{out}} = 0.0116\mathrm{L}\Delta\mathrm{G} \qquad \text{Equação 5}$$

Onde, ΔG é a energia dos lipídios, que é igual a 38.390 J (g lipídeo^{-1}).

2.3.3. Produção liquida de energia

A partir das equações 2 e 5, é possível estimar a produção líquida de energia ($\mathrm{P_{net}}$) para o sistema de mistura utilizado para produzir *N. oceanica* no fotobiorreator (Equação 6).

$$\mathrm{P_{net}} = \mathrm{P_{out}} - \mathrm{P_{in}} \qquad \text{Equação 6}$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Simulações de desempenho hidrodinâmico

Os desempenhos hidrodinâmicos obtidos em distintas condições de mistura a partir de cinco diferentes vazões de ar foram comparados e os resultados apresentados na Tabela 1. O aumento da vazão de ar resultou em uma redução no percentual de zonas mortas no fotobiorreator (Tabela 1). O pior desempenho foi observado no caso 1 (0,0012 vvm) com uma estimativa de 86,25% do tanque sendo zonas mortas. O caso 5 (0,0242 vvm) apresentou o menor percentual de Zonas Mortas (DZ) se comparado aos outros casos simulados, 73,82%. Com um fotobiorreator de coluna de 30 L, Bitog et al. (2014) também observaram uma relação inversa entre a vazão de ar e a presença de DZ.

No caso 5 o valor de DZ foi muito próximo ao calculado para o caso 4 (74.12%), no entanto a entrada de energia para o sistema de mistura do caso 5 foi 57,55% maior que no caso 4. Assim, os casos 1 (0,0012 vvm) e 4 (0,0170 vvm) foram selecionados para serem testados experimentalmente como os dois extremos com potencial para serem utilizados como a vazão de ar ótima. No caso 1, o baixo desempenho hidrodinâmico, ou seja, uma baixa mistura da coluna de água poderia ser compensado no balanço energético pelo menor consumo de energia do sistema de injeção de bolhas de ar (3,03 W m^{-3}). No caso 4, o alto consumo de energia (42,00 W m^{-3}), poderia ser compensado por uma alta mistura da coluna de água, resultando em um maior crescimento da microalga marinha *N. oceanica*. Como sugerido por Yang et al. (2014), o crescimento de microalgas pode ser maior, aumentando a vazão de ar, estes autores observaram por análises experimentais de mecânica de fluidos um aumento na mistura da coluna de água de um fotobiorreator de 15,45 L, e nos experimentos de crescimento da espécie de microalga *Scenedesmus dimorphus*, também realizados pelos autores, foi observado um crescimento maior da microalga em um tempo menor de cultivo.

Outro caso, dentre as simulações do presente capítulo, foi selecionado, no qual acreditamos que apresentaria um desempenho equilibrado de crescimento experimental de microalgas e insumos energéticos. O Caso 2 (0,0024 vvm) foi a terceira escolha para as simulações a serem testadas experimentalmente, e este caso foi comparado com os dois previamente selecionados. Este caso mostrou um percentual de zonas mortas no

tanque igual a 77,49% e uma demanda 6,06 W m^{-3} (calculado através da equação 3) de energia para atingir este desempenho hidrodinâmico.

3.2. Produção de biomassa

Os três casos de vazão de ar selecionados pelo desempenho hidrodinâmico numérico (casos 1, 2 e 4) foram comparados em experimentos de crescimento da microalga marinha *N. oceanica* em fotobiorreatores. Primeiro, três experimentos compararam a maior vazão (0,0170 vvm - caso 4) com a vazão de ar intermediária (0,0024 vvm - caso 2). Em seguida, outros três experimentos compararam vazão de ar baixa (0,0012 vvm - caso 1) com a vazão de ar intermediária (0,0024 vvm - caso 2). Os resultados de todos os seis experimentos de produção de biomassa são mostrados na Figura 2 e na Tabela 3. Os resultados das análises estatísticas mostraram uma biomassa inicial sem diferença significativa ($p > 0,05$) nos seis experimentos.

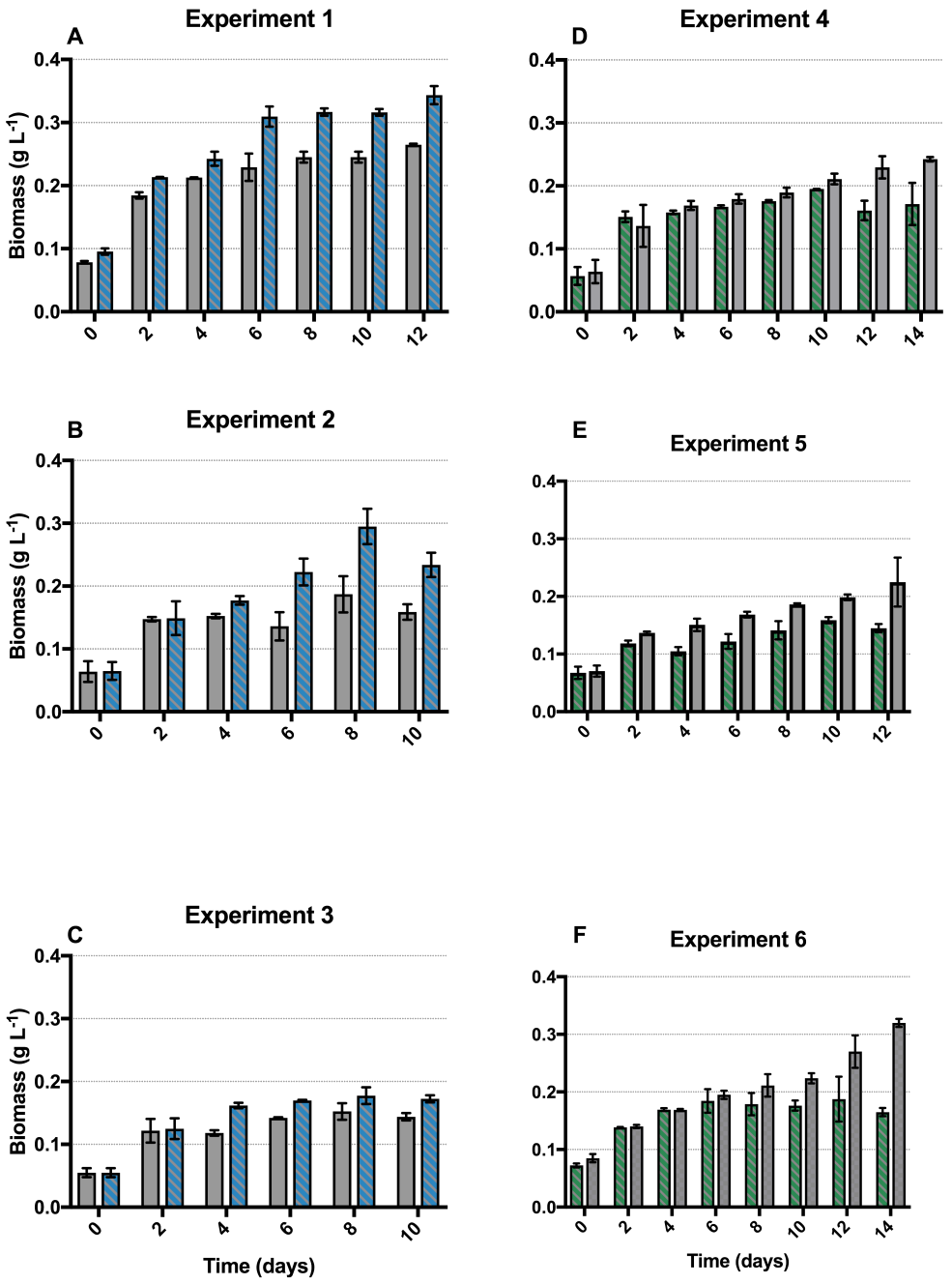


Figura 2: Média e desvio padrão da produção de biomassa durante os seis experimentos de crescimento com a microalga marinha *N. oceanica* em fotobiorreatores de coluna. borbulhante de 330 L. Três vazões de ar foram avaliadas: *i*) baixa (*verde*) – 0,0012 vvm; *ii*) intermediário (*cinza*) - 0,0024 vvm; *iii*) alta (*azul*) - 0,017 vvm.

As Figuras 2 A e B mostraram uma concentração final de biomassa de 0,265 ± 0,002 g L^{-1} e 0,159 ± 0,012 g L^{-1}, respectivamente, no tratamento da vazão de ar intermediária (0,024 L min^{-1}). Nos tanques com alta vazão de ar, durante esses dois primeiros experimentos, as biomassas finais foram significativamente maiores no final do período de cultivo, 0,343 ± 0,014 g L^{-1} (Fig. 2A) e 0,234 ± 0,019 g L^{-1} (Fig. 2B), para os experimentos 1 e 2, respectivamente. Essas produções de biomassa resultaram em ganhos de 33,14 ± 10,54% no experimento 1 e de 78,33 ± 12,87%, no experimento 2. No terceiro experimento (Fig. 2 C), não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as duas vazões de ar avaliadas (alta e média). O ganho médio de biomassa é mostrado para os dois primeiros experimentos na Tabela 3. Não houve ganho médio no terceiro experimento, uma vez que não houve diferença estatística entre os tratamentos ($p>0,05$).

Na Fig. 2 D, E e F uma concentração de biomassa de baixa vazão de ar (0,0012 vvm) é comparada com a vazão de ar intermediária um (0,0024 vvm). Nos três experimentos, diferenças significativas surgem no último dia de cultivo. A vazão de ar intermediária no experimento 4 resultou em uma produção final de biomassa de 0,243 ± 0,003 g L^{-1}, quando comparada a vazão de ar baixa, que teve uma produção de 0,149 ± 0,018 g L^{-1}, houve uma diferença significativa ($p <0,05$). A vazão intermediária resultou em uma produção significativamente maior de biomassa, no entanto foi necessário um gasto maior de energia, para manter condições de mistura adequadas na coluna de água. Portanto, uma perda (ganho negativo) de 48,64 ± 0,78% foi observado no experimento 4. O experimento 5 resultou em uma produção de biomassa de 0,225 ± 0,042 g L^{-1} e 0,145 ± 0,007 g L^{-1} para vazões intermediárias e baixas, respectivamente. Em seguida, o experimento 6 resultou em 0,320 ± 0,071 g L^{-1} de produção de biomassa para a vazão de ar intermediário e 0,165 ± 0,071 g L^{-1} para a vazão de ar baixa. Os experimentos 5 e 6 resultaram em perdas de biomassas de 48,40 ± 13,22% e 60,43 ± 6,89%, respectivamente.

Os resultados experimentais apoiam os resultados numéricos, pois a porcentagem de DZ simulado com baixa vazão de ar (Caso 1) foi de 8,75 pontos percentuais superior ao tratamento da vazão de ar intermediária (Caso 2) (Tabela 1). Em contraste, as comparações realizadas nos três primeiros experimentos mostram que a vazão de ar alta

aparentemente não compensa a maior produção de biomassa, no entanto uma análise mais aprofundada deste fato será realizada na próxima seção.

Através do aumento da vazão de ar, a velocidade do ar superficial também é aumentada (Kulkarni e Joshi, 2005), a consequência desta velocidade superior da coluna de água é um maior volume do tanque sendo submetido à maiores intensidades de turbulência, aumentando a mistura da coluna de água (Neto et al., 2008). Uma mistura mais efetiva é importante para várias condições de cultivo, como impedir que as células sedimentem (Bitog e Lee, 2017), aumentar os ciclos claro-escuro (Qiang e Richmond, 1996), homogeneizar a coluna de água, evitando gradientes de temperatura, pH, salinidade e nutrientes (Andersen, 2005). Todos estes fatores devem ter influenciado os resultados atuais (Fig. 2 A e B), onde a maior vazão de ar apresentou um ganho médio de 53% de biomassa.

No entanto, como será discutido mais adiante, o potencial da *Nannochloropsis* para biocombustível está relacionado, não apenas com o aumento da produção, mas também com a redução de custos para produção de biomassa (Hulatt e Thomas, 2011). Isso significa que esse ganho significativo (experimentos 1 e 2) na biomassa pode não ser o suficiente para ser compensada pela energia obtida a partir dos lipídios extraídos da biomassa microalgas. Quando comparamos as vazões intermediária e baixa, novamente um aumento no ganho de biomassa é observado (55%), portanto assim como havia sido argumentado por outros autores com espécies de microalgas diferentes (Zhang et al., 2013; Norsker e Barbosa, 2012), o presente trabalho observou um significativo ganho de biomassa da microalga marinha *N. oceanica* com aumento da vazão de ar em fotobiorreatores cilíndricos fechados de 330 L.

3.3. Morte celular

No final do cultivo do quarto experimento, os tanques com o tratamento de baixa vazão de ar apresentaram uma coloração amarronzada. Isto não foi observado nos outros dois experimentos, mas o fraco desempenho na curva de crescimento mostrada na Fig. 3 indica que o tratamento de vazão de ar baixa apresenta um baixo desempenho hidrodinâmico da mistura da coluna de água (baixa turbulência) levando a um menor crescimento das microalgas.

De todos os experimentos mostrados na Fig. 3, e comparando as duas curvas em cada experimento comparando as vazões de ar, intermediária e baixa, pode-se observar uma entrada prematura em fase de crescimento senescente para o tratamento com vazão de ar baixa. Sugerimos que o fraco desempenho hidrodinâmico resultante do campo de baixa velocidade desenvolvido por essa injeção de ar (0,0012 vvm) e a alta porcentagem de zonas mortas (Tabela 1) contribui para a sedimentação excessiva de células de *N. oceanica* (Kubelka et al., 2017; Pires et al., 2017).

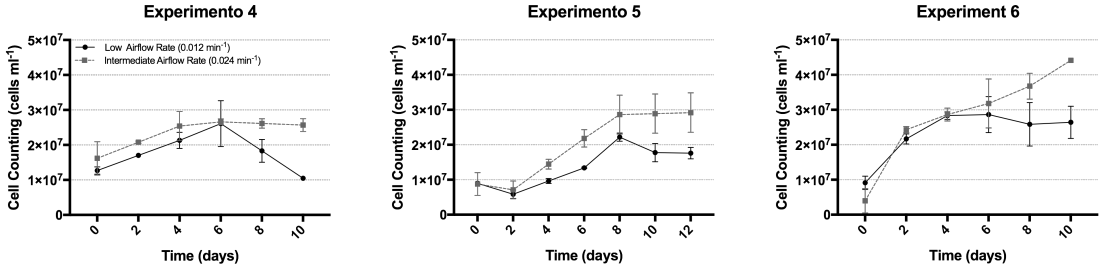


Figura 3: Resultados de contagem de células para os experimentos 4, 5 e 6 para avaliar a presença de células mortas e/ou detritos da microalga marinha *Nannochloropsis oceanica* em fotobiorreatores de coluna borbulhante de 330 L.

O aumento excessivo de zonas mortas de tanques de cultivo de microalgas resulta em diversos problemas que levam à redução da produtividade, tais como: *i*) zonas de estagnação com alta sedimentação e acúmulo de matéria orgânica (Pires et al., 2017); *ii*) formação de biofilme nas paredes (fundo) do tanque, impedindo a passagem de luz (Perner et al., 2003); *iii*) desenvolvimento de condições anaeróbicas, que levam à propagação de bactérias anaeróbicas (Hadiyanto et al., 2013); *iv*) estas áreas são locais em potencial para queda brusca de pH e formação de compostos tóxicos, resultando em morte celular (Hadiyanto et al., 2013).

Acreditamos que os fatores mencionados acima podem ter contribuído para excesso de morte celular da microalga *N. oceanica*. Comparando a vazão de ar baixa com a intermediária, acreditamos que a biomassa estaria superestimada para a vazão menor. Baroni et al. (2019) observaram que este tipo de superestimativa ocorre com frequência em análises de biomassa de microalgas realizadas através de peso seco por gravimetria

e o ideal é realizar simultaneamente a contagem de células, como foi feito aqui. O ganho na contagem de células destes experimentos comparando as vazões de ar intermediária e baixa foi de 93%.

Tabela 3: Resultados do peso seco medido em experimentos de crescimento com a microalga marinha *Nannochloropsis oceanica* em 330 L de fotobiorreator cilíndrico fechado vertical no primeiro dia de cultivo (**B_i**) e no último (**B_f**). Além disso, o rendimento (**B_y**) foi determinado subtraindo final da biomassa inicial e o ganho/perda (% - **B_g**) foi calculado comparando os rendimentos em todas as vazões de ar (**Q**). Os valores de perda são destacados em vermelho (negativo). NS significa diferenças não significativas na produção de biomassa.

Exp.	Q (vvm)	B_i (g L^{-1})	B_f (g L^{-1})	B_y (g L^{-1})	B_g (%)
1	0,0024	0,079 ± 0,020	0,265 ± 0,002	0,186 ± 0,001	-
	0,0170	0,095 ± 0,049	0,343 ± 0,014	0,248 ± 0,019	33.14 ± 10,54
2	0,0024	0,066 ± 0,017	0,159 ± 0,012	0,095 ± 0,004	-
	0,0170	0,064 ± 0,015	0,234 ± 0,019	0,168 ± 0,005	78,33 ± 12,87
3	0,0024	0,055 ± 0,007	0,144 ± 0,006	0,089 ± 0,001	-
	0,0170	0,055 ± 0,007	0,173 ± 0,011	0,118 ± 0,018	NS (0%)
4	0,0024	0,064 ± 0,057	0,243 ± 0,004	0,179 ± 0,022	-
	0,0012	0,057 ± 0,018	0,171 ± 0,034	0,114 ± 0,019	-48,64 ± 0,78
5	0,0024	0,071 ± 0,010	0,220 ± 0,049	0,149 ± 0,040	-
	0,0012	0,068 ± 0,011	0,145 ± 0,007	0,078 ± 0,003	-48,40 ± 13,22
6	0,0024	0,085 ± 0,007	0,320 ± 0.007	0,235 ± 0,028	-
	0,0012	0,073 ± 0,004	0,165 ± 0.007	0,093 ± 0,011	-60,43 ± 6,89

O desempenho de mistura equilibrada e a demanda de energia devem ser a abordagem principal para melhorar a injeção de ar em fotobiorreatores (Pegallapati et al., 2013). Quando a vazão de ar é baixa demais, problemas como formação de DZ (Bitog e Lee, 2017) e aumento de tempo de residência na região sem luz do tanque à

medida que a cultura se torna mais densa (Borowitzka e Moheimani, 2013) podem ocorrer. Como resultado, uma fase estacionária prematura ou morte celular pode ser observada, como visto na Fig. 3.

3.4. Desempenho de economia de energia

Uma última análise foi realizada com o objetivo de estimar a produção de energia líquida de um sistema de cultivo de microalgas em fotobiorreatores verticais cilíndricos fechados de 330 L. Uma revisão da literatura foi realizada para estimar o conteúdo lipídico médio da microalga marinha *Nannochloropsis oceanica*, determinando assim a produção percentual de lipídios para a biomassa seca produzida para esta espécie (Equação 4). Esta estimativa da produção de energia pela produção de biomassa foi comparada com a demanda de energia do sistema de injeção de bolhas de ar, como mostrado na Tabela 4.

A partir da Tabela 4 verifica-se que a demanda de energia do tratamento com vazão de ar baixa foi de 3,03 W m^{-3} e a produção de energia resultante do da biomassa lipídica foi de 2,14 ± 0,40 W m^{-3}. A geração estimada de energia a partir da biomassa lipídica representa 70,63% da energia gasta no cultivo da biomassa de *Nannochloropsis oceanica*. A entrada de energia da vazão de ar intermediária foi de 6,06 W m^{-3} e a produção de energia foi de 3,41 ± 0,51 W m^{-3}, representando 56,27% da demanda de energia do sistema de mistura. Além disso, a entrada de energia da vazão de ar alta foi de 42,00 W m^{-3} e a produção foi de 4,98 ± 1,51 W m^{-3}. Assim, a produção de energia resultante do crescimento da biomassa foi de apenas 11,86% deste insumo energético.

Verifica-se, portanto, que a energia líquida foi negativa para as três vazões de ar aqui estudadas. Desta forma, pode-se dizer que a viabilidade econômica da utilização de biomassa de *Nannochloropsis oceanica* para biocombustível ainda depende da redução dos gastos energéticos para a produção de lipídio (Pegallapati et al., 2012). Neste contexto, imediatamente após analisar a Tabela 4, descartamos a vazão de ar alta. A vazão de ar baixa mostrou uma porcentagem de produção de energia da entrada de energia, 14,36 p.p. maior que a vazão intermediária. No entanto, como mencionado na seção anterior, essa economia de energia para produzir a biomassa pode comprometer a qualidade da cultura/produto.

Os ganhos líquidos de energia são mostrados na Tabela 4, e comparando com os ganhos de biomassa, pode-se observar que a vazão de ar alta para o cultivo de fotobiorreatores de *Nannochloropsis oceanica* não é viável para aplicação na indústria de biocombustíveis. Como um aumento de 0,0024 vvm para 0,017 vvm correspondeu a um aumento de 1297,00 ± 410,09% no custo de energia, e essa alta demanda de energia resultou apenas em um aumento de 52,59 ± 6,88% na produção de biomassa. O aumento da vazão de ar de 0,0012 vvm para 0,0024 vvm resultou em um incremento de 238,80 ± 168,90% da demanda de energia, um ganho de 53,35 ± 31,95% da biomassa. O último, parece muito mais viável para aplicações de produção de biocombustíveis.

Tabela 4: Resultados médios da produção líquida estimada de energia (**P_{net}**) para o sistema de mistura utilizado para produzir Nannochloropsis oceanica em um fotobiorreator cilíndrico fechado vertical de 330 L. A energia líquida é calculada pela subtração de cada demanda de energia do fluxo de ar da produção de energia (**P_{in}**) da produção lipídica de microalgas (**P_{out}**). O ganho líquido de produção de energia (**P** -%) também é mostrado e o ganho médio de biomassa (**B_g**) é apresentado para ajudar nas comparações.

Q (vvm)	**P_{in}** (W m^{-3})	**P_{out}** (W m^{-3})	**P_{net}** (W m^{-3})	**P** (%)	**B_g** (%)
0,0012	3,03	2,14 ± 0.40	-0,88 ± 0,40	-	-
0,0024	6,06	3,41 ± 0.51	-2,65 ± 0,51	238,80 ± 168,90	37,35 ± 31,95
0,0170	42,00	4,98 ± 1.51	-37,02 ± 1,51	1297,00 ± 414,09	52,59 ± 6,88

Uma investigação anterior à atual, da coluna de bolha vertical fechada PBR, determinou velocidades de circulação ótimas/mínimas dentro deste tanque para manter a célula de *N. oceanica* de sedimentação (2,0E^{-6} m s^{-1}) na PBR (Kubelka et al., 2017). Esta velocidade é muito mais baixa que as velocidades normalmente aplicadas à mistura de fotobiorreatores de cultivo de microalgas. Sierra et al. (2008) gastaram 53 W m^{-3} para atingir as velocidades ótimas de mistura em placas planas e colunas de bolhas. Com a velocidade de circulação determinada por Kubelka et al. (2017) e a otimização

da vazão de ar feita no presente trabalho, a energia necessária para atingir uma produção satisfatória de biomassa foi muito menor (6,06 W m^{-3}).

Estes resultados estão de acordo com Norsker et al. (2012) e com Arudchelvam e Nirmalakhandan (2012), que argumentam que maximizar a produção de biomassa não é a melhor maneira para transformar uma planta comercial de microalgas em um negócio economicamente viável. Um planejamento adequado do sistema de injeção de ar (mistura da coluna de água) é uma das etapas cruciais para desenvolver fazendas de microalgas lucrativas (Kommareddy e Anderson, 2004; Pegallapati et al., 2013).

O equilíbrio de um sistema de mistura econômica e produtivo foi alcançado pela seleção da vazão de ar intermediária. A energia líquida negativa de -2,65 ± 0,51 W m^{-3} da vazão de ar selecionada (intermediária - 0,024 L min^{-1}) parece ser um valor razoável (Arudchelvam e Nirmalakhandan, 2012; Norsker et al., 2012; Pegallapati et al., 2013), que pode ser aumentado por melhorias hidrodinâmicas no sistema de injeção de ar, como otimizar a distribuição de injetores de ar no fundo dos tanques (Seo et al., 2012) ou melhorias em outras partes da cadeia produtiva (Acién et al., 2017) para alcançar uma produção comercial economicamente viável de *Nannochloropsis oceanica*.

4. CONCLUSÕES

A aplicação da Dinâmica dos Fluidos Computacional para estimar condições de mistura, especialmente velocidades de sedimentação (zonas mortas), dentro de fotobiorreatores de colunas borbulhantes, tem sido de grande importância para melhorar o desempenho do crescimento de fotobiorreatores em Laboratório de Produção de Microalgas da Universidade Federal do Rio Grande. As vazões de ar mostraram-se positivamente relacionadas com a produção da microalga marinha *Nannochloropsis oceanica* e por meio da otimização por engenharia hidrodinâmica foi possível reduzir a demanda de energia do sistema de borbulhamento e manter uma produção satisfatória. Portanto, a energia líquida incentiva a continuidade das melhorias para alcançar um fotobiorreator de colunas borbulhante viável e de baixo custo.

AGRADECIMENTOS

B. Kubelka foi financiado por uma bolsa de doutorado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES. P.C. Abreu é pesquisador do "Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq" e agradecemos também a fundação concedida pelo projeto "Avaliação de custos e produtividade para o cultivo maciço de microalgas para produção de biodiesel".

REFERÊNCIAS

Acién, F.G., Fernández, J.M., Magán, J.J., Molina, E., 2012. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. Biotechnology Advances 30, n. 6, 1344-1353.

Alves Sobrinho, R.C.M., Vauchinski, L., De Moura, R.R., Primel, E.G., Abreu, P.C.V., D'oca, M.G.M., 2015. FAME production and fatty acid profiles from moist *Chlorella sp.* and *Nannochloropsis oculata* biomass. Journal of the American Oil Chemists' Society 92, n. 3, 423-430.

Andersen, R.A., 2005. Algal Culturing Techniques. 1ª ed. Elsevier Academic Press. ISBN 0-12-088426-7.

Arudchelvam, Y. e Nirmalakhandan, N., 2012. Optimizing net energy gain in algal cultivation for biodiesel production. Bioresource Technology 114, 294-302.

Baroni, É.G., Yap, K.Y., Webley, P.A., Scales, P.J., Martin, G.J.O., 2019. The effect of nitrogen depletion on the cell size, density, gravitational settling of *Nannochloropsis salina*, *Chlorella sp.* and *Haematococcus pluvialis*. Algal Research 39.

Becker, E.W., 1994. Microalgae: biotechnology and microbiology. Cambridge.

Bitog, J.P., Lee, I.B., Lee, C.G., Kim, K.S., Hwang, H.S., Hong, S.W., Seo, I.H., Kwon, K.S., Mostafa, E., 2011. Application of computational fluid dynamics for modeling and designing photobioreactors for microalgae production: A review. Computers and Electronics in Agriculture 76, 131-47.

Bitog, J.P.P., Lee, I.B., Oh, H.M., Hong, S.W., Seo, I.H., Kwon, K., 2014. Optimized hydrodynamic parameters for the design of photobioreactors using computational fluid dynamics and experimental validation. Biosystems Engineering 122, 42-61.

Bitog, J.P. e Lee, I., 2017. Designing Photobioreactors using Computational Fluid Dynamics (CFD). Scholars' Press. ISBN 978-620-2-30434-4.

Borges, L., Caldas, S.; Montes D'oca, M.G., Abreu, P.C., 2016. Effect of harvesting processes on the lipid yield and fatty acid profile of the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. Aquaculture Reports 4, 164-168.

Borowitzka, M.A., 1999. Commercial production of microalgae□: ponds , tanks , tubes and fermenters. Journal of Biotechnology 70, 313-321.

Borowitzka, M.A. e Moheimani, N.R., 2013. Algae for Biofuels and Energy. 1ª ed. Springer Netherlands, Dordrecht. ISBN 978-94-007-5478-2.

Chua, E.T. e Schenk, P.M., 2017. A biorefinery for *Nannochloropsis*: Induction, harvesting, and extraction of EPA-rich oil and high-value protein. Bioresource Technology 244, 1416-1424.

Faé Neto, W.A., Borges, C.R.M., Abreu, P.C., 2018. Carotenoid production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* in different low-cost culture media. Aquaculture Research, 1–9.

Hadiyanto, H., Elmore, S., Van Gerven, T., Stankiewicz, A., 2013. Hydrodynamic evaluations in high rate algae pond (HRAP) design. Chemical Engineering Journal 217, 231-239.

Hulatt, C.J. e Thomas, D.N., 2011. Energy efficiency of an outdoor microalgal photobioreactor sited at mid-temperate latitude. Bioresource Technology 102, n. 12, 6687-6695.

Kubelka, B.G., Pinto, W.T., Abreu, P.C., 2017. Hydrodynamic performance of two air nozzles diameters on the massive microalgae culture: Computational and experimental approaches. Algal Research 27, 318-324.

Kubelka, G.B., Roselet, F., Pinto, W.T., Abreu, P.C., 2018. The action of small bubbles in increasing light exposure and production of the marine microalga *Nannochloropsis oceanica* in massive culture systems. Algal Research 35, 569-576.

Kulkarni, A. e Joshi, J.B., 2005. Bubble Formation and Bubble Rise Velocity in Gas - Liquid Systems□: A Review. Industrial & Engineering Chemistry Research 44, 5873-5931.

Ma, Y., Wang, Z., Yu, C., Yin, Y., Zhou, G., 2014. Evaluation of the potential of 9 *Nannochloropsis* strains for biodiesel production. Bioresource Technology 167, 503–509.

Ma, X.N., Chen, T.P., Yang, B., Liu, J., Chen, F., 2016. Lipid production from *Nannochloropsis*. Marine Drugs 14, n. 4, 61-79.

Meng, Y., Jiang, J., Wang, H., Cao, X., Xue, S., Yang, Q., Wang, W., 2015 The characteristics of TAG and EPA accumulation in *Nannochloropsis oceanica* IMET1 under different nitrogen supply regimes. Bioresource Technology 179, 483-489.

Mitra, M., Shah, F., Bharadwaj, S.V.V., Patidar, S.K., Mishra, S., 2016. Cultivation of *Nannochloropsis oceanica* biomass rich in eicosapentaenoic acid utilizing wastewater as nutrient resource. Bioresource Technology 218, 1178-1186.

Narala, R.R., Garg, S., Sharma, K.K., Thomas-Hall, S.R., Deme, M., Li, Y., Schenk, P.M., 2016. Comparison of Microalgae Cultivation in Photobioreactor, Open Raceway Pond, and a Two-Stage Hybrid System. Frontiers in Energy Research 4 September.

Neto, I.E., Zhu, D.Z., Rajaratnam, N., 2008. Air Injection in Water with Different Nozzles. Journal of Environmental Engineering 134, n. 4, 283-294.

Norsker N. e Barbosa M.J., 2012. On Energy Balance and Production Costs in Tubular and Flat Panel Photobioreactors. Technikfolgenabschätzung – Theorie Und Praxi 21, 54-62.

Pegallapati, A.K., Arudchelvam, Y., Nirmalakhandan, N., 2012. Energy-efficient photobioreactor configuration for algal biomass production. Bioresource Technology 126, 266-273.

Pegallapati, A.K., Arudchelvam, Y., Nirmalakhandan, N., 2013. Energetic Performance of Photobioreactors for Algal Cultivation. Environmental Science and Technology Letters 1, 2-7.

Perner, I., Posten, C., Broneske, J., 2003. CFD Optimization of a Plate Photobioreactor Used for Cultivation of Microalgae. Engineering in Life Sciences 3, n. 7, 287-291.

Pires, J.C.M., Alvim-Ferraz, M.C.M., Martins, F.G., 2017. Photobioreactor design for microalgae production through computational fluid dynamics: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 79, n. September 2016, 248-254.

Qiang, H. e Richmond, A., 1996. Productivity and photosynthetic efficiency of *Spirulina platensis* as affected by light intensity, algal density and rate of mixing in a flat plate photobioreactor. Journal of Applied Phycology 8, n. 2, 139-145.

Rodolfi, L., Zittelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R., 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. Biotechnology and Bioengineering 102, 100-112.

Seo, I.H., Lee, I.B., Hwang, H.S., Hong, S.W., Bitog, J.P., Kwon, K.S., Lee, C.G., Kim, Z.H., Cuello, J.L., 2012. Numerical investigation of a bubble-column photo-bioreactor design for microalgae cultivation. Biosystems Engineering 113, 229-241.

Siemens, 2017. User Guide STAR-CCM+ v12.02.

Sierra, E., Acién, F.G., Fernández, J.M., García, J.L., González, C., Molina, E., 2008. Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. Chemical Engineering Journal 138, 136-147.

Yang, Z., Del Ninno, M., Wen, Z., Hu, H., 2014. An experimental investigation on the multiphase flows and turbulent mixing in a flat-panel photobioreactor for algae cultivation. Journal of Applied Phycology 26, 2097-2107.

Zar, J.H., 2010. Biostatiscal Analysis, 5ª edição, Prentice-Hall/Pearson.

Zhang, Q., Wu, X., Xue, S., Liang, K., Cong, W., 2013. Study of hydrodynamic characteristics in tubular photobioreactors. Bioprocess and Biosystems Engineering 36, 143-150.

9. DISCUSSÃO GERAL

A produção, em escala comercial, de biomassa de espécies do gênero *Nannochloropsis* ainda permanece economicamente inviável, mesmo após duas décadas de pesquisas (Zittelli et al., 1999; Janssen et al., 2019). Melhorias tecnológicas e otimizações em todos os elos da cadeia produtiva vem sendo realizadas e ainda continuam sendo cruciais para o desenvolvimento de fazendas de cultivo que possam prosperar e obter sucesso no mercado (Liu et al., 2017). Pesquisas sobre o desenvolvimento da produção (Roselet et al., 2013), a coleta de biomassa produzida (Roselet et al., 2016) e sobre a extração dos bioprodutos de alto valor comercial (Faé Neto et al., 2018), ou de compostos utilizados para biocombustíveis (De Moura et al., 2018) devem continuar sendo realizadas com o intuito de se aumentar a produção e diminuir o gasto de energia (Razon e Tan, 2011; Acién et al., 2012). A falta de estudos em escalas de produção em massa dificulta o desenvolvimento de cultivos comerciais (Seo et al., 2012). Neste sentido, o desenvolvimento de sistemas de mistura/circulação é é um dos principais gargalos para o escalonamento bem sucedido para a transição de cultivos em laboratório (< 20 L) para cultivos em escala de produção em massa (> 300 L) (Ugwu e Aoyagi, 2012; Bitog e Lee, 2017).

No capítulo 1 desta Tese, apresentamos o primeiro passo dado pelo Laboratório de Produção de Microalgas (LPM) da Universidade Federal do Rio Grande, para o desenvolvimento de um sistema de cultivo de *Nannochloropsis oceanica* otimizado e mais próximo de atingir a viabilidade econômica em larga escala, aprimorando o sistema de injeção de bolhas de ar nos tanques de cultivo massivo da microalga marinha *N. oceanica*. Até recentemente utilizávamos no fotobiorreator cilíndrico fechado (330 L) e o tanque circular aberto (1600 L) do LPM um mecanismo de injeção de para geração da coluna borbulhante com um único injetor de ar de 3 mm (bolhas de ar com aproximadamente 9 mm – Neto et al., 2018). Este sistema foi comparado a um sistema que se verificou ser mais eficiente, composto por um conjunto de nove injetores de 1 mm cada , o que leva a produção de bolhas de ar menores (aproximadamente 6,5 mm – Neto et al., 2018) . Esta modificação foi feita com o intuito de aumentar o coeficiente de transferência de massa de 8.65 h^{-1} para 13.88 h^{-1} (Neto et al., 2018). Os benefícios desta melhoria foram observados tanto nos sistemas fechados (fotobiorreatores – 330 L), quanto abertos (tanques circulares – 1.600 L), com ganhos

de produtividade de 36% e 32%, respectivamente. Esta diferença entre tamanhos de injetores de ar (logo, de tamanho de bolhas de ar e dos seus respectivos coeficientes de transferência de massa) diminuiu o volume de zonas mortas e melhorou a mistura da coluna de água em ambos os tanques de cultivo (Kubelka et al., 2017).

É importante destacar que este ganho significativo na produção foi atingido sem um acréscimo na demanda de energia no sistema de injeção com bolhas de ar menores (9x1 mm). Estes resultados foram obtidos em condições estritas onde apenas o tamanho dos injetores de bolhas de ar foi avaliado, uma vez que houve o controle da vazão de ar, através de rotâmetros, de maneira que a vazão de ar fosse igual para os dois tamanhos de bolhas de ar testados. Além disso, as áreas dos injetores de ar eram equivalentes. Da mesma forma, as alturas das colunas de água e os volumes de água acima dos injetores também foram iguais para ambos os tratamentos com diferentes de bolhas de ar. Portanto, a energia gasta para injeção de bolhas de ar foi exatamente a mesma nos tratamentos com tamanhos de bolhas diferentes. Arudchelvam e Nirmalakhandan (2012) mostraram, através de formulações teóricas, que a energia de entrada em um sistema de injeção de bolhas de ar depende da vazão de ar, do volume do tanques e da altura da coluna de água acima dos injetores de ar. Todos estes aspectos foram considerados em nosso experimento (Kubelka et al., 2017).

O sistema de injeção de ar com bolhas menores apresentou 3 pontos percentuais a menos de zonas mortas do que o sistema com bolhas grandes. Este resultado, obtido a partir de estimativas numéricas (CFD), foi de pequena magnitude, porém comparável ao obtido por Bitog et al. (2014), que mostraram que a diminuição do tamanho de bolhas de ar levou à uma diminuição do volume de zonas mortas em um tanque coluna borbulhante de 30 L nas mesmas proporções observadas em nosso estudo (Kubelka et al., 2017). Entretanto, os autores aplicaram uma metodologia diferente para determinar as zonas mortas em suas modelagens numérica. Bitog et al. (2014), assim como outros trabalhos definiram como velocidade limite para formação de zonas mortas velocidades arbitrárias que variam na literatura 0,001 m s^{-1} (Yu et al., 2009) a 0,500 m s^{-1} (Gómez-Pérez et al., 2015).

Já em nosso estudo, a velocidade de sedimentação para a formação de zonas mortas foi definida a partir de características específicas da microalga marinha

Nannochloropsis oceanica, como diâmetro da célula e sua densidade no cultivo, sendo aplicadas na Lei de Stokes, que resultou em um valor bem inferior ($2{,}0E^{-6}$ m s^{-1}) ao que usualmente é empregado na definição de zonas mortas pela literatura em tanques de cultivo de microalgas. Em nosso trabalho consideramos que $2{,}0E^{-6}$ m s^{-1} é a velocidade mínima necessária para carregar uma célula de *N. oceanica*, evitando a sua sedimentação e formação de zonas mortas. Portanto, qualquer entrada de energia que alcance uma velocidade maior que esta pode ser um desperdício de energia, se o intuito é reduzir o volume de zonas mortas. Quando a escala de tanques de cultivo for aumentada, este tipo de abordagem de velocidade ótima pode ser crucial para termos uma produção de microalgas lucrativa.

Em nossa análise para a otimização do sistema de borbulhamento com diferentes tamanhos, um padrão repetitivo na curva de crescimento foi observado durante os experimentos apresentados no Capítulo 1. Verificamos que após um período de 4 a 6 dias de cultivo começavam a ocorrer diferenças significativas entre os tanques com os dois tamanhos de bolhas de ar. No capítulo 2, testamos em experimentos adicionais se um possível "gatilho" para este comportamento seria a maior exposição à luz (Richmond et al., 2003) ou, alternativamente, a maior exposição aos nutrientes dissolvidos (Reynolds, 2006). Estes dois fatores foram avaliados como possíveis precursores das diferenças observadas. No entanto, após os experimentos verificou-se que a concentração de nutrientes não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos não podendo ser, portanto, limitante. Na verdade verificou-se que as concentrações de nutrientes empregadas no nosso meio de cultivo são altas (Faé Neto et al., 2018) e permaneceram assim durante todo o experimento independente do sistema de mistura, garantindo um suprimento de Nitrogênio e Fósforo para o crescimento da microalga.

Por outro lado, a incidência de luz, a 5 cm de profundidade, sofre uma queda brusca (< 50 µmols) após o período de 4-6 dias de cultivo sendo, por isso, a luz foi sugerida como o principal fator limitante em um sistema de mistura com baixo coeficiente de transferência de massa (ou seja, bolhas maiores) (Kubelka et al., 2017; Abu-Ghosh et al., 2016). Desta forma, nos tratamentos com bolhas menores ocorre uma maior transferência de energia para a coluna de água, resultando em uma maior mistura do sistema e, por consequência, maiores chances de exposição das célula a luz incidente.

Estes resultados estão de acordo com de Borowitzka e Moheimani (2013), de que o efeito de autosombremaento em células de microalgas passa a ser mais evidente na medida em que a densidade da cultura aumenta, especialmente em tanques cilíndricos/tubulares com diâmetros superiores a 10 cm. Nos fotobiorreatores utilizados no presente trabalho, a disponibilidade de luz é excessivamente reduzida no centro do tanque (biomassa > 0,2 g L^{-1}). Neste contexto, os resultados observados anteriormente de melhores condições de mistura (turbulência) nos tanques com sistema de bolhas menores indicam uma distribuição mais eficiente das células de microalgas nas zonas de claro e escuro dos fotobiorreatores cilíndricos utilizados neste trabalho (Kubelka et al., 2017; Abu-Ghosh et al., 2016).

Resultados similares foram apresentados para tanques *raceways*, onde houve a inserção de canaletas que aumentaram a velocidade de circulação do cultivo, intensificando a mistura na coluna de água que resultou no aumento da frequência de exposição das células de *Chlorella sp.* levando a um ganho de biomassa de 27% (Zhang et al. 2015). Da mesma forma, Qiang e Richmond (1996) obtiveram um ganho de densidade de *Spirulina platensis* na medida que as condições de mistura foram melhoradas ao ajustar vazões de ar para ocorrer exposições mais frequentes das células a zonas de iluminação em um fotobiorreator placa-plana. Em um fotobiorreator de coluna borbulhante Bitog e Lee (2017) analisaram o tempo de circulação de células de microalgas em diferentes diâmetros de injetores de ar, logo diferentes diâmetros de bolhas de ar, e concluíram que bolhas menores são capazes de circular as células de microalgas até 4 vezes mais rápido tanto em zonas escuras como iluminadas.

Neste contexto, mais uma análise foi realizada para apoiar a hipótese que o sistema de mistura mais eficiente (com bolhas menores) foi crucial para superar a limitação por luz após 4 a 6 dias de cultivo. A Dinâmica de Fluidos Computacionais (CFD), foi aplicada como uma ferramenta exploratória (Pires et al., 2017) e não com intuito de validação como utilizada anteriormente (Kubelka et al., 2017). Simulações com um modelo lagrangiano permitiram o acompanhamento de trajetórias de células de *N. oceanica* no interior do fotobiorreator cilíndrico de 330 L. O acréscimo de uma ordem de grandeza na frequência de ciclos claro/escuro observadas nas simulações mesmo que esteja muito abaixo (de 0.00002 Hz para 0.0001 Hz) do observado como condição ótima de outros estudos, próximo a 1 Hz (Combe et al., 2015), nos levou à formulação

da hipótese de que o sistema de mistura com bolhas menores é capaz de expor com maior frequência as células de microalgas à luz, resultando em um ganho significativo de biomassa.

Grobbelaar et al. (1996) verificou que microalgas cultivadas ao ar livre mudam de aclimatadas a alta intensidades de luz para aclimatadas a baixa intensidades, quando atingem o final da fase de crescimento exponencial, quando a luz começa a ficar limitante para as células). E ainda, Grobbelaar et al. (1995) observou que cultivos com longos intervalos de claro/escuro resultam em um efeito de aclimatação a baixa intensidade de luz, e os organismos precisam de muito menos energia luminosa por unidade de tempo, se comparado com organismos aclimatados a alta intensidade de luz. Portanto, processos de fotoaclimatação podem explicar como uma pequena diferença na frequência de claro/escuro devido a diferenças no tamanho de bolhas de ar, resultou em uma significativa diferença na produção de biomassa da microalga marinha *N. oceanica*.

No capítulo 3, foi dado o segundo passo para otimizar a produção e o gasto de energia do sistema de mistura por coluna borbulhante, avaliando diferentes vazões de ar no sistema de injeção de bolhas de ar. Isto foi realizado através de estimativas de zonas mortas, como descrito por Kubelka et al. (2017), por simulações numéricas (CFD) e análises teóricas de gastos de energia, desenvolvidas por Arudchelvam e Nirmalakhandan (2012). Dentre seis simulações numéricas realizadas (para diferentes vazões de ar), três simulações foram selecionadas para comparativos de produção de biomassa experimentalmente.

De maneira geral pode-se dizer que o aumento da vazão de ar resultou em um aumento na velocidade superficial do ar injetado no tanque de cultivo (Kulkarni e Joshi, 2005), a consequência desta velocidade superior da coluna de água é um maior volume do tanque sendo submetido à maiores intensidades de turbulência, aumentando a mistura da coluna de água (Neto et al., 2008). Assim como para a diminuição do tamanho das bolhas de ar o aumento da vazão de ar pode resultar em menos sedimentação de células de microalgas (Bitog e Lee, 2017), um aumento da frequência dos ciclos claro/escuro (Qiang e Richmond, 1996) e homogeneização da coluna de água, com redução nas variações de temperatura, pH, nutrientes e salinidade (Andersen,

2005). Portanto, o ganho de biomassa de até 53%, observado durante os experimentos do Capítulo 3, da vazão de ar alta em comparação com a intermediária, nos mostra que o gasto de energia mais elevado na vazão alta (1297%) não compensou o ganho de biomassa para esta vazão.

A otimização da produção de biomassa de microalgas, independente da aplicação em larga escala, deve buscar não somente o aumento na produtividade, mas também a redução de custos (Hulatt e Thomas, 2011). Isso significa que a vazão de ar mais alta avaliada experimentalmente e seus ganhos de biomassa não justifica o seu emprego devido ao seu alto gasto de energia para manter o sistema de injeção de ar funcionando, assim como observado experimentalmente, com vazões de ar intermediárias é possível atingir uma boa produção de biomassa sem um gasto muito elevado de energia. Por outro lado, nos experimentos com vazão de ar baixa, apesar de ter sido observado um gasto muito baixo de energia, -240% se comparado a vazão intermediária, houve um grande aumento no volume estimado de zonas mortas (8,75 pontos percentuais).

O aumento excessivo de zonas mortas de tanques de cultivo de microalgas resulta em diversos problemas que levam à redução da produtividade, tais como: *i*) zonas de estagnação com alta sedimentação e acúmulo de matéria orgânica (Pires et al., 2017); *ii*) formação de biofilme nas paredes (fundo) do tanque, impedindo a passagem de luz (Perner et al., 2003); *iii*) desenvolvimento de condições anaeróbicas, que levam à propagação de bactérias anaeróbicas (Hadiyanto et al., 2013); *iv*) estas áreas são locais em potencial para queda brusca de pH e formação de compostos tóxicos, resultando em morte celular (Hadiyanto et al., 2013).

Neste contexto, durante os experimentos do Capitulo 3 foi possível observar, no tratamento de vazão de ar baixa, uma deterioração na aparência do cultivo no último dia de cada experimento. Acreditamos que os fatores mencionados acima podem ter contribuído para excesso de morte celular da microalga *Nannochloropsis oceanica*. Comparando a vazão de ar baixa com a intermediária, acreditamos que a biomassa estaria superestimada para a vazão menor. Baroni et al. (2019) observaram que este tipo de superestimativa ocorre com frequência em análises de biomassa de microalgas realizadas através de peso seco por gravimetria e o ideal é realizar simultaneamente a contagem de células, como foi feito aqui. O ganho na contagem de células destes

experimentos comparando as vazões de ar intermediária e baixa foi de 93%. Este resultado apoia a escolha da vazão intermediária como a de melhor custo-benefício para o cultivo da microalga marinha *N. oceanica*.

10. CONCLUSÕES GERAIS

A aplicação do programa comercial de Dinâmica de Fluidos Computacionais (CFD), STAR-CCM+, se mostrou uma excelente ferramenta tanto para planejamento e otimização de tanques de cultivo de microalgas e seus sistemas de injeção de ar (mistura/circulação), como uma ferramenta exploratória para análise de fenômenos/processos específicos a serem investigados nos sistemas de produção de microalgas. O CFD apresentou, em ambos os casos, resultados robustos e validados em experimentos de crescimento da microalga *Nannochloropsis oceanica*. Além disto, foi possível extrapolar os resultados numéricos obtidos para o fotobiorreator de 330 L para o tanque circular aberto de 1600 L, ou seja, os dois desenhos e volumes de tanques foram comparáveis. Portanto, apenas utilizando as simulações dos fotobiorreatores, os quais possuem uma demanda computacional menor, é possível otimizar os dois desenhos de tanques de cultivo.

O desenvolvimento de uma nova metodologia a partir da Lei de Stokes deve levar em conta as características da espécie alvo de microalga, bem como a velocidade de sedimentação definida a partir de parâmetros específicos para cada espécie, como densidade de cultivo, diâmetro da partícula (célula) e densidade da água de cultura (salgada ou doce). Esta nova velocidade de sedimentação, determinada pela Lei de Stokes, pode ser aplicada na determinação de zonas mortas em tanques de cultivo de *N. oceanica*. Este método, além de ter sido útil no aumento da produção dos tanques do Laboratório de Produção de Microalgas, também permitiu uma economia de energia se comparado a velocidades genéricas usualmente aplicadas no desenho, desenvolvimento e otimizações de tanques de cultivo de microalgas. Principalmente, por características da microalga *N. oceanica* que favorecem a permanência da mesma em suspensão.

Dois tamanhos de bolhas de ar foram comparados quanto ao volume de zonas mortas e a turbulência da coluna de água (indicador de mistura), em ambas as variáveis o sistema de injeção de bolhas de ar menores (injetores 9 x 1,0 mm) apresentou um

melhor desempenho hidrodinâmico através das simulações numéricas. Estes resultados foram confirmados em experimentos de crescimento da microalga marinha *N. oceanica*, resultando não só em um bom desempenho hidrodinâmico, mas também em significativos ganhos de produção no sistema de mistura com bolhas de ar menores. É importante ressaltar que este ganho de biomassa não gerou em um gasto adicional de energia, pois a vazão de ar, a altura da coluna de água e o volume do tanque nos dois tratamentos com diferentes tamanhos de bolhas foram mantidos iguais.

O presente estudo procurou identificar causas específicas para o padrão de crescimento observado para a microalga marinha *Nannochloropsis oceanica* em fotobiorreatores de 330 L e tanques circulares abertos de 1600 L onde, após um intervalo de 4 e 6 dias, ocorriam diferenças significativas na produção de biomassa entre os sistemas de mistura de bolhas maiores e menores. Os dados experimentais aqui avaliados mostraram que as concentrações de nutrientes não foram afetadas pelo tratamento com bolhas de ar menores. Por outro lado, as medidas de irradiância mostraram que a luz no tanque é extremamente reduzida após 4 e 6 dias de cultivo, como consequência do crescimento das microalgas, o que leva ao seu auto

sombreamento. Neste ponto, a luz se torna um fator limitante para o crescimento de microalgas, mas uma maior mistura da coluna de água, resultante das bolhas menores, superou essa limitação. Portanto, a produção de biomassa mostrou um ganho significativo com o sistema de injeção de bolhas de ar menores sobre as bolhas maiores. Os resultados numéricos corroboraram esses achados, mostrando que a distribuição ótima de turbulência e a transferência de energia do ar para a cultura resultam em maior frequência de exposição à luz e menor tempo de permanência em áreas escuras do tanque.

O sistema de injeção de bolhas de ar menores agora foi melhorado quanto a vazão de ar entrando no tanque de cultivo, simulações numéricas indicaram que um nível intermediário de vazão de ar resulta em condições razoáveis, com menos zonas mortas no fotobiorreator de 330 L. A vazão de ar mais baixa analisada aqui mostrou um aumento no volume de zonas mortas que foi sugerido como problemático para a cultura de *N. oceanica*. Estes resultados foram corroborados com os experimentos de crescimento realizados. Tendo em vista, que o aumento da vazão de ar diminui o

volume de zonas mortas avaliamos o gasto de energia com relação a vazão de ar e ao conteúdo lipídico produzido a partir da biomassa resultante de três níveis de vazão de ar (baixo, intermediário e alto). A vazão de ar mais alta foi descartada, pois o custo benefício de aumentar a vazão com relação ao balanço energético (produção de energia/ gasto de energia) ficou muito longe de um sistema economicamente viável. Por outro lado, vazão de ar baixa, apesar de apresentar um gasto muito baixo de energia, resultou em um alto volume de zonas mortas e isto foi relacionado a uma quantidade excessiva de morte celular. Portanto, o sistema com bolhas de ar menores (9x1 mm) e vazão de ar intermediária (0.024 min^{-1}) se mostrou promissor na busca de um sistema de produção de microalgas de baixo custo operacional.

11. TRABALHOS FUTUROS

Após a análise da influência da vazão de ar e do tamanho de bolhas de ar nos sistemas de cultivo de microalgas do Laboratório de Produção de Microalgas (EMA-FURG), nosso próximo objetivo é analisar de que forma o número e distribuição de injetores no fundo dos tanques de cultivo podem ser otimizados a partir da metodologia de modelagem numérica e experimentação, como nos estudos anteriores.

Outra área de estudo que se abre é a avaliação na altura da coluna de água em busca de um balanço energético positivo. O gasto energético de um sistema de mistura/circulação está diretamente relacionado com a altura da coluna de água sobre os injetores de ar (Arudchelvam e Nirmalakhandan, 2012). Portanto, diminuições na coluna de água poderão ser testadas quanto ao desempenho hidrodinâmico e ao gasto de energia. Assim como realizado para os parâmetros otimizados neste projeto, a otimização da altura da coluna de água poderia ser analisada, primeiramente, pela ferramentas de CFD, e em seguida, por comprovações experimentais.

Adicionalmente, pode ser também avaliado a transformação do fotobiorreator cilíndrico em um *airlift* pela instalação de uma canaleta central direcionando o fluxo de bolhas de ar. Ugwu e Aoyagi (2012) argumentam que a aleatoriedade da mistura resultante de um fotobiorreator cilíndrico de coluna borbulhante é menos eficiente que o uso de uma canaleta central para direcionamento do fluxo central de bolhas de ar, pois neste último caso ocorre uma circulação mais eficiente junto as paredes laterais do

tanque. Este procedimento poderia ser analisado e otimizado numericamente (CFD) antes de ser testado experimentalmente para obtenção de melhores resultados (Kubelka et al., 2017). A transformação de um fotobiorreator de coluna borbulhante para o tipo *airlift* pode resultar em uma maior frequência de exposição das células de *N. oceanica* a luz incidente, desta maneira a metodologia aplicada por Kubelka et al. (2018) poderia ser novamente utilizada.

Como mencionado é possível a aplicação destes métodos de análise e otimização para outras espécies de microalgas cultivadas pelo Laboratório de Produção de Microalgas e por outros laboratórios da Estação Marinha de Aquicultura da FURG. Como, *Conticribra weissflogii* e *Chaetoceros muelleri*, que são diatomáceas e apresentam características morfológicas bem diferentes da espécie em que a presente metodologia foi para qual desenvolvida seria necessário adaptações na Lei de Stokes (Reynolds, 2006) para está apresentar resultados aplicáveis em estudos de otimização de hidrodinâmica e eficiência de mistura de tanques de cultivos.

Referências

Abu-Ghosh, S., Fixler, D., Dubinsky, Z., Iluz, D., 2016 Flashing light in microalgae biotechnology. Bioresource Technology 203, 357-363.

Acién, F.G., Fernández, J.M., Magán, J.J., Molina, E., 2012. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. Biotechnology Advances 30, n. 6, 1344-1353.

Andersen, R.A., 2005. Algal Culturing Techniques. 1ª ed. Elsevier Academic Press. ISBN 0-12-088426-7.

Arudchelvam, Y. e Nirmalakhandan, N., 2012. Optimizing net energy gain in algal cultivation for biodiesel production. Bioresource Technology 114, 294–302.

Baroni, É.G., Yap, K.Y., Webley, P.A., Scales, P.J., Martin, G.J.O., 2019. The effect of nitrogen depletion on the cell size, density, gravitational settling of *Nannochloropsis salina*, *Chlorella sp.* and *Haematococcus pluvialis*. Algal Research 39.

Bitog, J.P.P., Lee, I.B., Oh, H.M., Hong, S.W., Seo, I.H., Kwon, K., 2014. Optimized hydrodynamic parameters for the design of photobioreactors using computational fluid dynamics and experimental validation. Biosystems Engineering 122, 42-61.

Bitog, J.P. e Lee, I., 2017. Designing Photobioreactors using Computational Fluid Dynamics (CFD). Scholars' Press. ISBN 978-620-2-30434-4.

Borowitzka, M.A. e Moheimani, N.R., 2013. Algae for Biofuels and Energy. 1ª ed. Springer Netherlands, Dordrecht. ISBN 978-94-007-5478-2.

Combe, C., Hartmann, P., Rabouille, S., Talec, A., Bernard, O., Sciandra, A., 2015. Long-term adaptive response to high-frequency light signals in the unicellular photosynthetic eukaryote *Dunaliella salina*. Biotechnology and Bioengineering 112, n. 6, 1111-1121.

De Moura, R.R., Etges, B.J., Dos Santos, E.O., Martins T.G., Roselet, F., Abreu, P.C., Primel, E.G., D'oca, M.G.M., 2018. Microwave-Assisted Extraction of Lipids from Wet Microalgae Paste: A Quick and Efficient Method. European Journal of Lipid Science and Technology 120, 1-7.

Faé Neto, W.A., Borges, C.R.M., Abreu, P.C., 2018. Carotenoid production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* in different low-cost culture media. Aquaculture Research 49, 2597-2535.

Gómez-Pérez, C.A., Espinosa, J., Montenegro Ruiz, L.C., Van Boxtel, A.J.B., 2015. CFD simulation for reduced energy costs in tubular photobioreactors using wall turbulence promoters. Algal Research 12, 1-9.

Grobbelaar, J.U., Nedbal, L., Tichy, V., Setlik, L., 1995. Variation in some photosynthetic characteristics of microalgae cultured in outdoor thin-layered sloping reactors. Journal of Applied Phycology 7, n. 2, 175-184.

Grobbelaar, J.U., Nedbal, L., Tichy, V., 1996. Influence of high frequency light/dark fluctuations on photosynthetic characteristics of microalgae photoacclimated to different light intensities and implications for mass algal cultivation. Journal of Applied Phycology 8, 335-343.

Hadiyanto, H., Elmore, S., Van Gerven, T., Stankiewicz, A., 2013. Hydrodynamic evaluations in high rate algae pond (HRAP) design. Chemical Engineering Journal 217, 231-239.

Hulatt, C.J. e Thomas, D.N., 2011. Energy efficiency of an outdoor microalgal photobioreactor sited at mid-temperate latitude. Bioresource Technology 102, n. 12, 6687-6695.

Janssen, J., Wijffels, R., Barbosa, M., 2019. Lipid Production in *Nannochloropsis gaditana* during Nitrogen Starvation. Biology 8, n. 1, p. 5.

Kubelka, B.G., Pinto, W.T., Abreu, P.C., 2017. Hydrodynamic performance of two air nozzles diameters on the massive microalgae culture: Computational and experimental approaches. Algal Research 27, 318–324.

Kulkarni, A. e Joshi, J.B., 2005. Bubble Formation and Bubble Rise Velocity in Gas - Liquid Systems□: A Review. Industrial & Engineering Chemistry Research 44, 5873-5931.

Liu, J., Song, Y., Qiu, W., 2017. Oleaginous microalgae *Nannochloropsis* as a new model for biofuel production: Review & analysis. Renewable and Sustainable Energy Reviews 72, n. December 2016, 154-162.

Neto, I.E., Zhu, D.Z., Rajaratnam, N., 2008. Air Injection in Water with Different Nozzles. Journal of Environmental Engineering 134, n. 4, 283-294.

Perner, I., Posten, C., Broneske, J., 2003. CFD Optimization of a Plate Photobioreactor Used for Cultivation of Microalgae. Engineering in Life Sciences 3, n. 7, 287-291.

Pires, J.C.M., Alvim-Ferraz, M.C.M., Martins, F.G., 2017. Photobioreactor design for microalgae production through computational fluid dynamics: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews 79, n. September 2016, 248-254.

Razon, L.F. e Tan, R.R. , 2011. Net energy analysis of the production of biodiesel and biogas from the microalgae: *Haematococcus pluvialis* and *Nannochloropsis*. Applied Energy 88, n. 10, 3507-3514.

Reynolds, C.S., 2006. The Ecology of Phytoplancton. 1ª ed. Cambridge University Press. ISBN 978-0-511-19094-0.

Richmond, A., Cheng-Wu, Z., Zarmi, Y., 2003. Efficient use of strong light for high photosynthetic productivity: interrelationships between the optical path, the optimal population density and cell-growth inhibition. Biomolecular Engineering 20, 229-236.

Richmond, A., 2004. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. 1ª ed. Blackwell Science Ltd. ISBN 0-632-05953-2.

Roselet, F., Burkert, J., Abreu, P.C., 2016. Flocculation of *Nannochloropsis oculata* using a tannin-based polymer: Bench scale optimization and pilot scale reproducibility. Biomass and Bioenergy 87, 55-60.

Seo, I.H., Lee, I.B., Hwang, H.S., Hong, S.W., Bitog, J.P., Kwon, K.S., Lee, C.G., Kim, Z.H., Cuello, J.L., 2012. Numerical investigation of a bubble-column photo-bioreactor design for microalgae cultivation. Biosystems Engineering 113, n. 3, 229-241.

Ugwu, C.U. e Aoyagi, H., 2012. Microalgal Culture Systems: An Insight into their Designs, Operations and Applications. Biotechnology 11, 127-132.

Yu, G., Li, Y., Shen, G., Wang, W., Lin, C., Wu, H.; Chen, Z., 2009. A novel method using CFD to optimize the inner structure parameters of flat photobioreactors. Journal of Applied Phycology 21, n. 6, 719-727.

Qiang, H. e Richmond, A., 1996. Productivity and photosynthetic efficiency of *Spirulina platensis* as affected by light intensity, algal density and rate of mixing in a flat plate photobioreactor. Journal of Applied Phycology 8, n. 2, 139-145.

Zittelli, G.C., Lavista, F., Bastianini, A., Rodolfi, L., Vincenzini, M., Tredici, M.R., 1999. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis sp.* cultures in outdoor tubular photobioreactors. Journal of Biotechnology 70, n. 3, 299-312.

Zhang, Q., Xue, S., Yan, C., Wu, X., Wen, S., Cong, W., 2015. Installation of flow deflectors and wing baffles to reduce dead zone and enhance flashing light effect in an open raceway pond. Bioresource Technology 198, 150-156.

ANEXO I – ARTIGO DO CAPÍTULO 1:

Hydrodynamic performance of two air nozzles diameters on the massive microalgae culture: Computational and experimental approaches. Kubelka, B.G., Pinto, W.T, Abreu, P.C. Algal Research 27 (2017), 318-324

ANEXO II – ARTIGO DO CAPÍTULO 2:

The action of small bubbles in increasing light exposure and production of the marine microalga *Nannochloropsis oceanica* in massive culture systems. Kubelka, B.G., Roselet, F., Pinto, W.T, Abreu, P.C. Algal Research. 35 (2018), 569-576.