

CULTIVO DE *Spirulina* sp. LEB 18 EM FOTOBIORREATOR TUBULAR HORIZONTAL PARA BIOFIXAÇÃO DE CO₂

A. P. A. CASSURIAGA¹, E. G. MORAIS¹, B.C. FREITAS¹ e J.A.V. COSTA¹

¹ Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos
E-mail para contato: jorgealbertovc@terra.com.br

RESUMO – O potencial biotecnológico das microalgas vem sendo estudado devido às diversas substâncias sintetizadas por estes micro-organismos como proteínas, carboidratos e lipídios. O objetivo do trabalho foi determinar parâmetros cinéticos de crescimento e caracterizar a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada utilizando CO₂ como fonte de carbono. O cultivo foi realizado em fotobiorreator tubular horizontal equipado com air-lift sob condições controladas de luz e temperatura, até a fase estacionária de crescimento. Foi utilizado meio Zarrouk com fonte de N₂ reduzida em 50% e fonte de C substituída por 10% de CO₂. A concentração celular máxima obtida foi 1,06 g.L⁻¹, produtividade 0,02 g.L.d⁻¹ e biofixação diária máxima 160 mg.L.d⁻¹. A biomassa apresentou teor de proteínas, carboidratos, cinzas e lipídios, 47,3%, 13,4%, 12,3% e 11,7%, respectivamente, demonstrando que *Spirulina* sp. LEB 18 possui potencial para desenvolvimento de um processo que resulta na mitigação de CO₂ e uma variedade de biocompostos.

1. INTRODUÇÃO

As aplicações ambientais das microalgas incluem a biofixação de CO₂, remoção de matéria orgânica e metais tóxicos de efluentes, produção de biocombustíveis como biodiesel e bioetanol (LACERDA & CACIA, 2013). Muitas espécies podem ser induzidas a acumular diversos compostos (SOUSA et al; 2014), como carboidratos, proteínas e lipídios (MORIOKA et al., 2014; HULTBERG et al, 2014). Estudos envolvendo o uso de microalgas vêm se intensificando devido ao potencial que apresentam, sendo uma fonte renovável que não compete diretamente com a produção de alimentos e por possibilitar a obtenção combustíveis com menor impacto ambiental quando comparado aos combustíveis fósseis (SANTOS, 2013).

A biofixação de CO₂ por microalgas é uma tecnologia promissora para a redução das concentrações dos gases de efeito estufa (GEE), principalmente CO₂. Neste contexto, pesquisas estão sendo desenvolvidas a fim de identificar espécies de microalgas tolerantes a altas concentrações destes gases, e para definição de parâmetros de processo que maximizem as taxas de crescimento e biofixação de CO₂ (SINGH & AHLUWALIA, 2012). Vários métodos químicos, físicos e biológicos têm sido aplicados para redução do CO₂ e o método biológico com microalgas é considerado uma das abordagens mais eficazes para a fixação deste gás (DEMIRBAS, 2011). O cultivo de microalgas, comparado ao de vegetais superiores apresenta vantagens como possuir baixos custos para a colheita e transporte, podem ser cultivados em locais inóspitos, não dependem de grandes quantidades de água para cultivo e apresentam resultados imediatos de biofixação (HENRIKSON, 1994).

O nutriente que está em maior quantidade no cultivo de microalgas é o carbono, pois as células apresentam em sua composição cerca de 50 % (w/w) deste elemento, sendo que este pode ser fornecido como CO₂, carbonato ou bicarbonato (BORGES et al., 2013). Nos cultivos para mitigação de CO₂ a fonte de carbono do meio pode ser substituída pelo CO₂ gerado a partir da queima dos combustíveis fósseis, que pode ser captado direto da fonte emissora (BENEMANN, 1993). Esta é uma vantagem adicional a aplicação destes micro-organismos para este fim, visto que além da redução dos GEE ainda há a redução nos custos de produção de biomassa (MORAIS; COSTA, 2007).

O crescimento microalgal é resultado da interação entre fatores biológicos, físicos e químicos. A composição bioquímica da biomassa das microalgas é determinada pela espécie e fatores ambientais como a intensidade de luz, temperatura, pH e composição do meio de cultivo (FERREIRA et al, 2013). A manipulação de condições de cultivo como presença ou ausência de determinados nutrientes, pode estimular a biossíntese de compostos específicos que estes micro-organismos reagem a variações do meio exterior com alterações intracelulares (NELSON; COX, 2011). A *Spirulina* é conhecida devido aos diversos compostos que podem ser obtidos através da sua biomassa. Esta microalga vem sendo muito investigada devido à capacidade de se desenvolver em condições ambientais adversas, característica desejável para o aumento de escala. A procura por segurança energética tem feito com que a maioria dos países empenhe-se na busca por fontes alternativas de energia, a fim de reduzir problemas econômicos, sociais e ambientais. Espera-se que a biomassa microalgal, venha a tornar-se um dos principais recursos renováveis na produção de alimentos, materiais, produtos químicos, combustíveis e energia (BORGES et al., 2010).

Neste contexto, o trabalho teve como objetivo determinar parâmetros cinéticos de crescimento e caracterizar a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada utilizando CO₂ como fonte de carbono.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo e Condições de Cultivo

A microalga *Spirulina* sp. LEB 18 (MORAIS et al., 2008), foi cultivada em meio Zarrouk, contendo (g L⁻¹): NaHCO₃, 16,8; NaNO₃, 2,5; K₂HPO₄, 0,5; K₂SO₄, 1,0; NaCl, 1,0; Mg.SO₄.7H₂O, 0,2; CaCl₂, 0,04; FeSO₄.7H₂O, 0,01; EDTA, 0,08 e micronutrientes. Neste experimento, a fonte de nitrogênio foi reduzida em 50% e a fonte de carbono foi substituída por CO₂ comercial a 10% (v/v) em uma mistura com ar a 90 mL_{mistura}/min. A injeção ocorreu a cada 40 min na fase clara durante 5 min. Os cultivos foram realizados em fotobiorreator tubular horizontal (Figura 1) equipado com *air-lift* de 150L, volume útil de 130L, com concentração inicial de cultivo de 0,2 g.L⁻¹. Os experimentos foram conduzidos em estufa termostaticada a 30°C com controle de iluminância (43,2 μmol.m⁻².s⁻¹), fotoperíodo 12h claro/escuro e mantidos até a fase estacionária de crescimento.

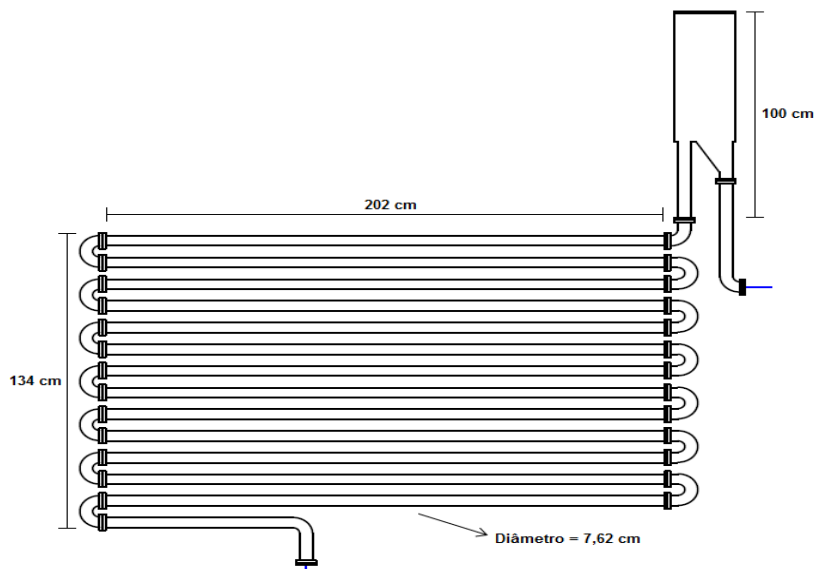


Figura 1 – Esquema biorreator tubular horizontal equipado com *air-lift*.

2.2. Caracterização da Biomassa

A biomassa obtida foi centrifugada a 15200x g por 15 min e liofilizada, logo após reidratada e submetida a sonda ultrassônica por 10 min em pulsos de 10s, obtendo o extrato microalgal. A partir deste extrato foram realizadas análises de carboidratos segundo Dubois et al. (1956) e teor de proteínas pelo método proposto por Lowry et al. (1951) utilizando albumina como padrão. Os lipídios foram quantificados a partir da biomassa liofilizada utilizando método de Folch et al. (1957). O teor de umidade e cinzas de acordo com AOAC (2000).

A fim de realizar comparação de resultados foi utilizada uma biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 produzida comercialmente pela empresa Olson microalgas. Esta biomassa foi cultivada em fotobiorreatores *raceway* sob condições *outdoor* em estufa de filme transparente. Nesta biomassa as mesmas quantificações foram realizadas.

2.3. Delineamento experimental

Diariamente foi monitorado o crescimento das microalgas através da medida da concentração celular, determinada pela densidade óptica das culturas em espectrofotômetro a 670 nm. A concentração celular foi obtida através de curva de crescimento relacionando massa seca e densidade óptica (COSTA et al., 2002). Também a cada 24 h foi realizada a medida do pH dos cultivos em pHmetro digital.

Neste ensaio foram determinados os parâmetros concentração celular máxima ($X_{máx}$), produtividade máxima ($P_{máx}$), velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{máx}$), e tempo de geração (tg). A produtividade (P , g.L.d⁻¹) foi calculada segundo a equação $P=(X-X_0)/(t-t_0)$. A

velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) foi obtida por regressão exponencial da fase logarítmica de multiplicação celular e o tempo de geração (tg) foi obtido pela razão entre $\ln 2/\mu_{\text{máx}}$ (MORAIS; COSTA, 2007).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No experimento com *Spirulina* sp. LEB 18 utilizando meio Zarrouk com redução na fonte de nitrogênio e substituição da fonte de carbono por CO_2 , houve uma fase de adaptação de aproximadamente 7 d, conforme Figura 2. Após este período a velocidade de crescimento celular aumentou gradualmente, até o ponto onde manteve-se constante, na etapa de crescimento exponencial entre 12 d e 40 d, até atingir a concentração celular máxima. Neste ponto houve uma desaceleração até o início na fase estacionária, identificada pelo ponto onde a concentração celular se estabilizou. A entrada na fase estacionária para os cultivos microalgais geralmente ocorre devido ao esgotamento de nutrientes ou sombreamento celular (COELHO, 2013). Ao longo dos experimentos, não houve grande variação do pH devido as injeções de CO_2 , se mantendo entre 7,75 e 8,83.

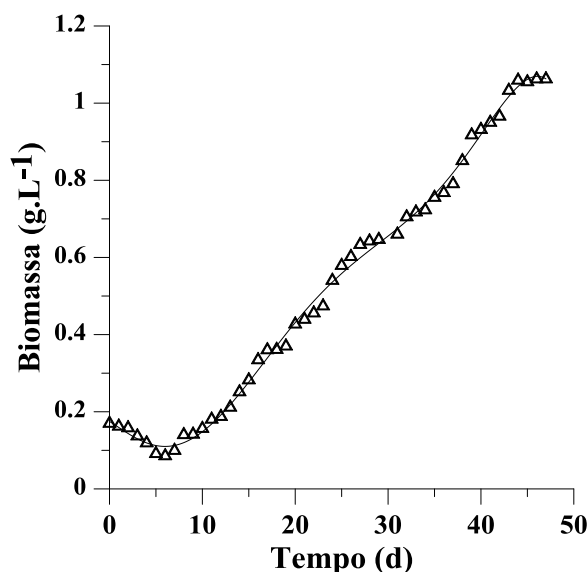


Figura 2 Curva de crescimento da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 50% N, 10% CO_2 , meio Zarrouk modificado.

No experimento com a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 os parâmetros cinéticos obtidos ao final dos 47 d de experimento foram esperados devido às alterações no meio de cultivo conforme Tabela 1. Radmann et al. (2011) ao cultivarem *Spirulina* sp. LEB 18 em meio Zarrouk utilizando 10% de CO_2 como fonte de carbono, durante 15 d obtiveram concentração celular máxima de $1,53 \text{ g.L}^{-1}$ e velocidade específica máxima de crescimento de $0,22 \text{ d}^{-1}$ resultados superiores aos obtidos no presente estudo. A redução da fonte nitrogênio pode ter influenciado negativamente o desenvolvimento deste micro-organismo, reduzindo a produtividade e, consequentemente, concentração celular máxima ao final do experimento. O nitrogênio é um elemento utilizado pelas células principalmente para formação de proteínas e ácidos nucleicos, sendo essencial ao

desenvolvimento celular (BEZERRA et al., 2012).

Tabela 1 Parâmetros cinéticos para o cultivo de microalga *Spirulina* sp. LEB 18 50% N, 10% CO₂ e biofixação

| Parâmetros Cinéticos | Respostas |
|----------------------|--------------------------|
| $X_{\text{máx}}$ | 1,06g.L ⁻¹ |
| T_g | 5,39 d |
| $P_{\text{máx}}$ | 0,02g.L.d ⁻¹ |
| $\mu_{\text{máx}}$ | 0,13 d ⁻¹ |
| Biofixação | 160 mg.L.d ⁻¹ |

A redução na fonte de nitrogênio é uma forma efetiva de melhorar o acúmulo de lipídeos e/ou carboidratos na biomassa microalgal, no entanto o aumento destes componentes na biomassa nem sempre é proporcional ao da produtividade celular. Nas microalgas, a resposta das células às condições ambientais definem os fatores como limitante, quando ocorre a redução da taxa de crescimento ou alguma reação bioquímica sem a necessidade de aclimação celular, ou estressante, que implica em um desequilíbrio metabólico o qual demanda ajustes bioquímicos antes que as células possam estabelecer um novo estado de crescimento ou biossíntese (RICHMOND, 2008).

O cultivo realizado em biorreator tubular horizontal apresentou taxa de biofixação de CO₂ de 160 mg.L.d⁻¹, valor inferior ao obtido por Moraes e Costa (2007), quando cultivaram a microalga *Spirulina* sp. LEB 18 em biorreator tubular vertical com injeção de 6% de CO₂ (394 mg L⁻¹ d⁻¹). O mecanismo de biofixação de CO₂ por microalgas é baseado na capacidade que esses micro-organismos possuem de realizar fotossíntese. Mudanças nas fontes nutricionais geralmente não afetam a taxa fotossintética de microalgas, no entanto, a alteração na concentração de nutrientes, como N e P, podem causar a redução na absorção de CO₂ (OHSE et al., 2007). Outros fatores como, iluminação, taxa de injeção de CO₂ nos cultivos, pH, densidade celular e temperatura também podem determinar um aumento ou redução na biofixação de CO₂ (JARENKOW, 2011).

O teor de lipídios encontrado para a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 cultivada em biorreator tubular horizontal é cerca de duas vezes maior que os valores encontrados em cultivos comerciais como apresentado na Tabela 2. O tempo de cultivo, até a fase estacionária, e a redução do componente nitrogenado podem ter contribuído para o aumento da concentração lipídica. Na fase de crescimento exponencial geralmente o teor proteico é mais elevado devido à multiplicação celular e a formação dos ácidos nucleicos. A maior produção de lipídios e carboidratos, no entanto, ocorre na fase estacionária como forma de reserva de energia (DUNSTAN, 1993). Já a redução da fonte de nitrogênio em cultivos microalgais é capaz de realizar um desvio no metabolismo das células para a

produção de lipídios ou carboidratos (LOURENÇO, 2006). No caso do cultivo em biorreator tubular da cepa *Spirulina* sp. LEB 18 este desvio foi favorável a produção de lipídios, visto que comparando-se as concentrações de carboidrato da Tabela 2 pode-se observar que este foi inferior ao obtido no cultivo comercial.

Tabela 2 Teor de carboidratos, lipídios, proteínas e cinzas na biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 em biorreator tubular e *raceway*

| Amostra | Carboidratos (%) | Lipídios (%) | Proteínas (%) | Cinzas (%) |
|-----------------------------|------------------|--------------|---------------|------------|
| Tubular | 13,40±0,49 | 11,69±0,76 | 47,26±1,10 | 12,3±0,8 |
| <i>Raceway</i> [*] | 21,68±0,12 | 5,74±0,46 | 44,69±0,25 | 15,6±0,7 |

*valores obtidos para a biomassa de *Spirulina* sp LEB 18, cultivada pela empresa Olson microalgas.

Com relação ao teor de proteínas e cinzas, os cultivos comercial e em biorreator tubular horizontal mantiveram-se próximos. As variações da composição da biomassa das microalgas cultivadas sob diferentes formas, podem ter ocorrido devido às diferentes configurações dos reatores (volume, agitação e exposição a luz solar) e condições ambientais aos quais foram submetidos os cultivos. As variações de temperatura e luminosidade em condições *outdoor* podem afetar a composição da biomassa microalgal (RICHMOND, 1986).

A microalga *Spirulina* sp. possui a capacidade de produzir biomassa rica em biocompostos (proteínas, lipídios e carboidratos), que podem ser utilizados na produção de biocombustíveis, suplementos alimentares, produção de fármacos e cosméticos bem como no sequestro de carbono sendo uma alternativa viável para redução da concentração de CO₂ atmosférico.

4. CONCLUSÃO

O cultivo da microalga *Spirulina* sp. LEB 18 realizado em fotobiorreator tubular horizontal equipado com *air-lift*, com redução da fonte de nitrogênio e substituição da fonte de carbono por 10% de CO₂ no meio, obteve concentração celular máxima 1,06 g.L⁻¹ e produtividade 0,02 g.L.d⁻¹ ao final de 47 d de cultivo. A microalga produziu biocompostos com aplicabilidade em diversas áreas e a produção de lipídios pode ter sido estimulada pela redução do componente nitrogenado. *Spirulina* sp LEB-18 biofixou 160 mgCO₂.L⁻¹.d⁻¹ mostrando-se como uma alternativa para a mitigação das emissões antropogênicas de CO₂.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Olson Nutrição, Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica (CGTEE), Capes e Fapergs pelo apoio a este trabalho.

5. REFERENCIAS

- A.O.A.C.; Official Methods of Analysis, *Association of Official Analytical Chemist* EUA, 2000.
- BENEMANN, J. R.; Utilization of carbon dioxide from fossil fuel - burning power plants with biological system. *Energy conversion and management*, v. 34, p.999-1004, 1993.
- BEZERRA, R.P.; MATSUDO, M.C.; SATO, S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J.C.M.; Effects of photobioreactor configuration, nitrogen source and light intensity on the fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina)* platensis. bioenergetic aspects. *Biomass and Bioenergy*, v. 37, p. 309-317, 2012.
- BORGES, F.C.; TRIERWEILER, J.O.; Proposta de um modelo conceitual de biorrefinaria com estrutura descentralizada. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Escola de Engenharia. *Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química*, 2010.
- BORGES, J. A. et al.; *Spirulina* sp. LEB 18 culture using effluent from the anaerobic digestion. *Braz. J. Chem. Eng.*, v.30, n.2, p. 277-288, 2013.
- COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P.; KABKE, K.; WEBER, A. Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. *World J Microb Biot*, v. 18, p. 603-607, 2002.
- COELHO, V.C.; Síntese de Biopolímeros pela Microalga *Spirulina* sp. LEB-18 cultivada em Diferentes Concentrações de Nutrientes. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande, 2013.
- DERMIBAS A.; Biodiesel from oilalgae, biofixation of carbon dioxide by microalgae: A solution to pollution problems. *Appl Energy*, 2011.
- DUBOIS, M., GILLES, K., HAMILTON, J., REBERS, P., & SMITH, F.; Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v.28(3), p.350-356, 1956.
- DUNSTAN, G. A.; Changes in lipid compositions and maximization of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. *Journal of Applied Phycology*, v.5, p.71-83, 1993.
- FERREIRA, S.P.; SOUZA-SOARES, L.; COSTA, J.A.V.; Revisão: microalgas: uma fonte alternativa na obtenção de ácidos gordos essenciais. *Rev. de Ciências Agrárias*, v.36, n.3, p. 275-287, 2013.
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S.; *J. Biol. Chem.* , v.226, n.497, 1957.
- HENRIKSON, R.; Microalga *Spirulina*, superalimento del futuro, Ronore Enterprises. 2ª ed. *Ediciones Urano*, Barcelona, España. p.222, 1994.
- HO, S. H.; CHENA, C. Y.; YEHA, K. L.; CHENC, W. M.; LIND, C. Y.; CHANG, J. S. Characterization of photosynthetic carbon dioxide fixation ability of indigenous *Scenedesmus obliquus* isolates. *Biochemical Engineering Journal*, v. 53, p. 57-62, 2010.
- HULTBERG, B., BERGLUND, M., ANDERSSON, A. AND FRANK, A. ;Elevated plasma homocysteine in alcoholics. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, v.17, p.687-689, 2014.
- JARENKOW, A.; Influencia da vazão de entrada de ar no crescimento de microalgas em reator tipo *air-lift*; *Trabalho de Diplomação em Engenharia Química*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

- LACERDA, L.M.C.; Otimização de sistemas de microalgas para mitigação de CO₂ e produção de biodiesel; Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em engenharia Química, Campinas SP, 2013.
- LOURENÇO, S.O.; *Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações*. São Carlos: RiMa, p.606, 2006.
- MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V.; Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, v.129, p.439-445, 2007.
- MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V.; Bioprocessos para remoção de dióxido de carbono e óxido de nitrogênio por micro-algas visando a utilização de gases gerados durante a combustão do carvão. *Quím. Nova*. v.31, p.1038-1042, 2008.
- MORIOKA, L.R.I.; MATOS, A.P.; OLIVO, G.; SANT'ANNA, E.S.; Flocculação de *Chlorella* sp. produzida em concentrado de dessalinização e estudo de método de extração de lipídeos intracelulares. *Quím. Nova*, v.37, p.44-49, 2014.
- NELSON, D.L.; COX, LEHNINGER, M.M.; *Lehninger: Princípios de Bioquímica*. 5º Ed. São Paulo: Sarvier, 2011.
- OHSE, S.; DERNER, R.B.; OZERIO, R.A.; CUNHA, P.C.R.; LAMARCA, C.P.; SANTOS, M.E.; MENDES, L.B.B.; Revision on carbon sequestration by microalgae and forests and the production of lipids for the microalgae; *Dissertação de mestrado*, Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, Brasil, 2007.
- RADMAN, E. M., CAMERINI, F.V., SANTOS, T. D., COSTA, J. A. V.; Isolation and application of SO_x and NO_x resistant microalgae in biofixation of CO₂ from thermoelectricity plants. *Energy Conversion and Management*, v.52, p.3132–3136, 2011.
- RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. London: Blackwell Science, v.15, p.312-351. 2004.
- SANTOS, M.O.; Rheological behavior of *Chlorella* sp. e *Scenedesmus* sp. cultures in different biomass concentrations. *Eng. Agríc.*, v.33, n.5, p.1063-1071, 2013.
- SINGH, U. B.; AHLUWALIA, A. S. Microalgae: a promising tool for carbon sequestration. *Mitig Adapt Strateg Glob Change*, 2012.
- SOUSA, L.L.; HORA, D.S.; SALES, E.A.; PERELO, L.W.; Cultivation of *Nannochloropsis* sp. in brackish groundwater supplemented with municipal wastewater as a nutrient source. *Braz. arch. biol. technol.* v.57, n.2, p.171-177, 2014.
- ZARROUK, C.; Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et photosynthèse de *Spirulina maxima* Geitler. Ph.D. Thesis, University of Paris, 1966.