

## COMPORTAMENTO DO CRESCIMENTO DE *Chlorella sorokiniana* EM ESCALA LABORATORIAL E AMPLIADA

V. O. ARAÚJO<sup>1</sup>, G. C. MONTANHIM<sup>2</sup>, A. T. LOMBARDI<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de São Carlos, Laboratório de Biotecnologia de Algas

<sup>2</sup> Universidade Federal de São Carlos, PPGERN

<sup>3</sup> Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Botânica  
E-mail para contato: vini.quim@gmail.com

**RESUMO** – Microalgas são organismos fotossintetizantes, cuja biomassa possui alto valor agregado, já que é rica em biomoléculas atrativas a vários ramos da indústria. Além disso, têm sido organismos alvo de empresas no processo de mitigação de carbono. O cultivo em larga escala ainda apresenta muitos desafios para os pesquisadores, como alto custo do processo como um todo, coleta da biomassa e fatores abióticos limitantes. Assim, a modelagem matemática pode proporcionar respostas para variáveis utilizadas durante um cultivo. O objetivo do presente trabalho foi representar parâmetros de biomassa por um modelo com comportamento exponencial, ajustando os parâmetros a fim de descrever o crescimento da microalga em relação ao tempo. Foram realizados cultivos da microalga *Chlorella sorokiniana* em escala laboratorial e ampliada. Com o auxílio do software Igor aplicou-se o ajuste de Boltzman utilizando-se os dados de clorofila *a* (mg L<sup>-1</sup>) e densidade óptica, mensurados diariamente. O modelo empregado descreveu o crescimento da microalga nas fases exponencial e estacionária de crescimento, mostrando-se adequado e evidenciado tais estágios de crescimento.

### 1. INTRODUÇÃO

As microalgas planctônicas apresentam atributos biotecnológicos tal qual rápida velocidade de crescimento e versatilidade metabólica, tornando-as organismos promissores para produção comercial de compostos com alto valor agregado (BOROWITZKA e MOHEIMANI, 2013).

Microalgas são uma fonte atrativa de biomassa para a produção de energia e biomoléculas, já que não competem com a agricultura na produção de alimentos e possuem maior rendimento energético por área do que as plantações terrestres tradicionais. No entanto, o sistema de cultura, o enriquecimento com nutrientes, necessários na formulação do meio nutritivo e o sistema de coleta de biomassa, podem tornar-se fatores impeditivos à viabilidade econômica da produção de biomassa algal (CLARENS et al., 2010; LUNDQUIST et al., 2010).

Considerando o comportamento do cultivo e a produtividade, a modelagem matemática desempenha a condição de oferecer respostas para parâmetros utilizados. O desenvolvimento

de equacionamentos que depende de variáveis do processo aumenta a capacidade de serviço enquanto especifica a condição de melhor trabalho para as variáveis do processo.

Para a produção industrial destinada ao ganho de biomassa, saber o ponto ótimo de operação é economicamente mais favorável devido à maior produção em menor tempo sem perda de produto. Segundo Galvão et al. (2011) o aumento populacional em culturas algais com volume limitado possui comportamento de uma curva sigmoidal. O modelo utilizado analisa todos os pontos do período do desenvolvimento microbiano e fornece a taxa de crescimento para o período até atingir a fase estacionária. A vantagem de empregar a equação de Boltzmann (1872) é que para crescimentos microbianos onde a fase exponencial não é muito bem definida o ajuste fornece os parâmetros de crescimento como a velocidade de propagação e ponto máximo da curva.

## 2. OBJETIVOS

Representar parâmetros de biomassa, a saber, concentração de clorofila *a* e densidade óptica por um modelo com comportamento exponencial, no qual os parâmetros serão ajustados com a finalidade de descrever o crescimento da microalga ao longo do tempo.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Em escala laboratorial, sob condições controladas de intensidade luminosa ( $130 \mu\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ ), fotoperíodo claro-escuro (12:12h) e temperatura ( $24 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) foram utilizados frascos de polycarbonato com capacidade de 1000 mL e 200 mL para o cultivo de 800 mL e 80 mL de *Chlorella sorokiniana*, respectivamente. Utilizou-se o meio de cultura BG 11 (RIPPKA et al., 1979) modificado.

Em escala ampliada, foram utilizados fotobiorreatores de plástico e de vidro, respectivamente com 100 e 1000 litros de cultivo. Os ensaios foram realizados no pátio do Laboratório de Biotecnologia de Algas, da UFSCar. A agitação foi desempenhada por bombas submersas ( $2000 \text{ L hora}^{-1}$ ), sendo três bombas para 1000 L e uma para 100 L. Houve borbulhamento de  $\text{CO}_2$  e de ar atmosférico.

As culturas foram monitoradas diariamente para os parâmetros densidade óptica (espectrofotômetro digital Macherey-Nagel, Nanocolor UV\VIS, Alemanha), densidade celular (contagem de células sob microscópio óptico em hemocitômetro Fuchs-Rosenthal e contador automático (Muse<sup>TM</sup> Cell Analyzer, Alemanha)), concentração de clorofila *a* por determinação da fluorescência *in vivo* (Turner Designs, Model Trilogy - USA), e eficiência fotossintética por meio da de fluorescência da clorofila utilizando-se um aparelho Phyto-PAM (Walz, Alemanha) de acordo com metodologia descrita em Lombardi e Maldonado (2011).

Para se evidenciar o fato de curvas de crescimento de microalgas apresentarem característica sigmoidal, com auxílio do software Igor aplicou-se o ajuste de Boltzman (1872), equação 1, utilizando os dados de clorofila *a* ( $\text{mg L}^{-1}$ ) e densidade óptica, mensurados diariamente.

$$y(t) = \frac{B}{1 + e^{-(t-\tau)\mu}} + A \quad (1)$$

em que

$y(t)$  = Concentração clorofila  $a$  [ $\text{mg L}^{-1}$ ] ou absorvância.

$B$  = ponto máximo da curva, com mesma unidade de  $y(t)$ .

$A$  = valor inicial, com mesma unidade de  $y(t)$ .

$t$  = variável tempo [tempo]

$\tau$  = parâmetro que determina o ponto de inflexão da curva [tempo].

$\mu$  = taxa de crescimento [ $\text{tempo}^{-1}$ ].

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A curva de crescimento da microalga *C. sorokiniana* possui comportamento sigmoidal, assim como o modelo previsto por Verhulst (1838) para o crescimento populacional biológico auto limitante. Desta forma, para funções sigmóides habitualmente utilizadas a equação (1) de Boltzman (1879) expressou melhor ajuste com os dados de parâmetros de biomassa da espécie microalgal.

A equação

$$y(t) = \frac{B}{1 + e^{-(t-\tau)\mu}} + A \quad (1)$$

No qual  $y(t)$  representa a concentração de clorofila  $a$  [ $\text{mg L}^{-1}$  ou Abs],  $A$  corresponde a concentração inicial [ $\text{mg}_{\text{clorofila } a} \text{ L}^{-1}$  ou Abs] e  $B$  [ $\text{mg}_{\text{clorofila } a} \text{ L}^{-1}$  ou Abs],  $\tau$  [h] e  $\mu$  [ $\text{h}^{-1}$ ] são parâmetros da equação. Para o presente trabalho foi assumido que a variável  $\mu$  é constante e fisicamente equivalente à taxa de crescimento obtida por mensuração da clorofila  $a$  ou de densidade óptica, descrevendo, portanto, a taxa de crescimento da microalga em relação ao tempo. O parâmetro  $\tau$  reflete o ponto de inflexão da curva e caracteriza o instante do tempo em que a concavidade da curva muda para baixo.

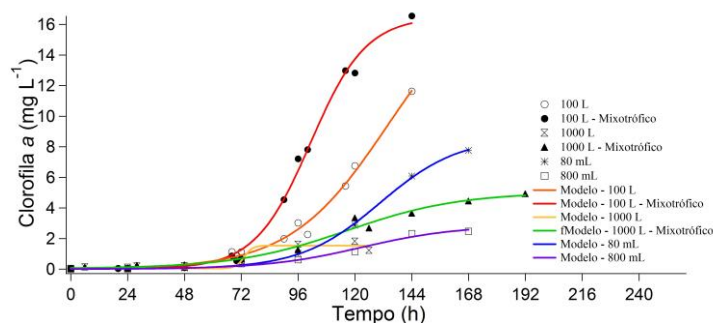
As curvas para o modelo e os dados experimentais estão representados nas figuras 1 e 2. As informações para os valores dos parâmetros do ajuste são encontradas nas tabelas 1 e 2.

O modelo utilizado descreve o crescimento da microalga na fase exponencial e na fase estacionária para as variáveis respostas que podem expressar a concentração celular. No entanto, a equação não consegue esboçar o período de decaimento celular. A fim de assegurar que as condições fisiológicas saudáveis estavam sendo mantidas, para todo o intervalo de obtenção de dados a condição fisiológica da microalga foi avaliada e verificou-se que as células mantiveram-se saudáveis, de acordo com a metodologia descrita em Lombardi e Maldonado (2011), como podemos verificar na figura 3.

Para o ajuste empregado é importante analisar os parâmetros  $B$  e  $\mu$  em conjunto. A constante  $B$  é o ponto máximo da curva e a variável  $\mu$  é a velocidade de crescimento. Como mostrado nas tabelas 1 e 2, a taxa de crescimento é independente do ponto máximo da curva, ou melhor, quanto mais alta a velocidade de crescimento, mais rapidamente a curva alcançará o ponto ótimo para, posteriormente, chegar à fase estacionária.

Muitos são os trabalhos que envolvem modelos matemáticos para expressar dados referentes à biomassa microalgal.

Figura 1 – Modelo e dados experimentais para a concentração de clorofila *a* de *C. sorokiniana* para cultivos em escala laboratorial e ampliada em relação ao tempo.



Sukenik et al. (1991) elaboraram um modelo para avaliar o efeito da profundidade do reservatório e da produção de clorofila *a* na taxa de produção de biomassa de *Isochrysis galbana* em várias estações.

Figura 2 – Modelo e dados experimentais para absorvância (684 nm) de *C. sorokiniana* para cultivos em escala laboratorial e ampliada em relação ao tempo.

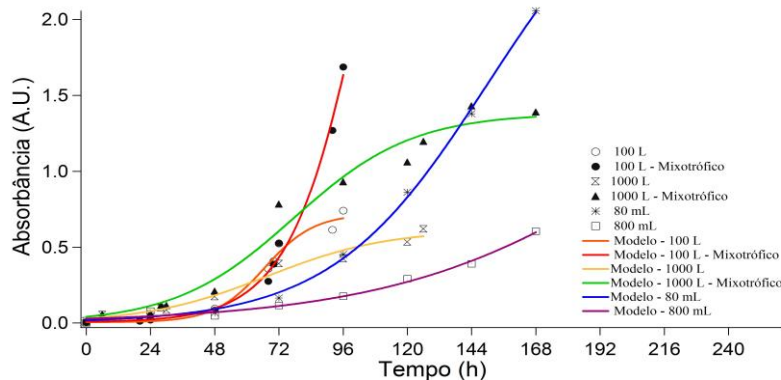
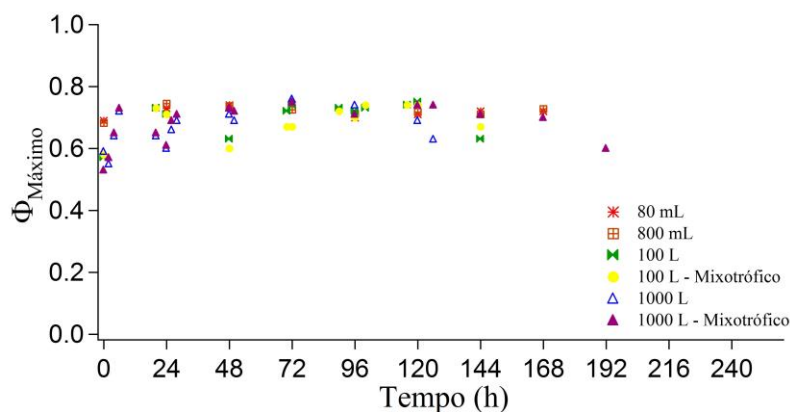


Figura 3 – Rendimento fotossintético máximo de *C. sorokiniana* para cultivos em escala laboratorial e ampliada em relação ao tempo.



Grima et al. (1994), propuseram um modelo matemático para o crescimento contínuo de uma cultura microalgal limitada por luz, utilizando o coeficiente de absorção da biomassa. O modelo reproduziu os estados estacionários atingidos e o comportamento dinâmico do sistema.

Syed Shabudeen et al. (2013) verificaram o crescimento de *Botryococcus braunii*, *Chlorella species* e *Chlorella vulgaris* sob as suas condições ótimas de crescimento e a utilização de dados cinéticos para a concepção e operação do sistema de cultivo em grande escala, utilizando a variável densidade óptica.

Yu et al. (2011) realizaram um cultivo mixotrófico com *Anabaena* sp, por meio da adição de glicose, o que aumentou a densidade celular e a taxa específica de crescimento. Houve variação na composição de pigmentos celulares, entre eles a clorofila *a*. Um modelo de Monod modificado foi desenvolvido para descrever o crescimento celular, incorporando a taxa específica de crescimento e a intensidade de luz média no reator.

Tabela 1 – Valores dos parâmetros da equação (1) para concentração de clorofila A em cada tratamento.

Parâmetros	180 L - Mixo	180 L - Photo	1000 L – Photo	1000 L – Mixo	80 mL	800 mL
A [mg/L]	0.0178	0.0180	0.0373	0.033	0.006	0.005
B [mg/L]	16.487	18.782	1.505	4.992	8.643	2.844
$\tau$ [h]	101.25	133.84	73.20	116.79	1330.55	122.90
$\mu$ [h <sup>-1</sup> ]	0.085346	0.048386	0.558004	0.042012	0.059726	0.049488
$\mu$ [dia <sup>-1</sup> ]	2.048305	1.161271	13.39210	1.008276	1.433435	1.187707

Tabela 2 – Valores dos parâmetros da equação (1) para absorbância em cada tratamento.

Parâmetros	180 L - Mixo	180 L - Photo	1000 L – Photo	1000 L – Mixo	80 mL	800 mL
A [mg/L]	0.0070	0.0063	0.0016	0.0013	0.0017	0.0030
B [mg/L]	5.39	0.71	0.61	1.38	3.13	2.30
$\tau$ [h]	108.41	66.57	67.49	77.53	149.63	220.28
$\mu$ [h <sup>-1</sup> ]	0.07	0.11	0.04	0.04	0.03	0.02
$\mu$ [dia <sup>-1</sup> ]	1.62	2.58	1.06	1.08	0.83	0.48

## 5. CONCLUSÕES

O modelo empregado mostrou-se adequado para as variáveis que consideram biomassa algal, neste caso, concentração de clorofila *a* e absorbância.

Muitos são os casos de espécies microalgais em que alguma das fases de crescimento não ficam evidentes em representações gráficas convencionais. Assim, o modelo empregado neste trabalho facilitou o entendimento do comportamento de *Chlorella sorokiniana* em determinadas condições, podendo também ser aplicado em outras espécies de microalga.



## 6. AGRADECIMENTOS

Agradeço à professora Dr<sup>a</sup> Ana Teresa Lombardi, ao apoio financeiro concedido, aos colegas do Laboratório de Biotecnologia de Algas e ao professor Dr. César Rogério de Oliveira, do Departamento de Matemática da UFSCar.

## 7. REFERÊNCIAS

- BOLTZMANN, L.E. Weitere Studien über das Wärmegleichgewicht unter Gasmolekülen, *Wiener Berichte* 66,1, 306-402, 1872.
- BOROWITZKA, M.A.; MOHEIMANI, N.R. 2013. *Mitig Adapt Strateg Glob Change*, 18: 47-72.
- CLARENS, A.F.; RESURRECCION, E.P.; WHITE, M.A.; COLOSI, L.M. Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks. *Environ. Sci & Techn.* 44, 1813 -1819. 2010.
- GALVÃO, R.M.; SANTANA, T.S.; FONTES, C.H.O.; SALES, E.A. Estudo da taxa de crescimento de microorganismos e proposta de modelo para produção de biomassa de *Haematococcus pluvialis*. *Anais do III International workshop advances in cleaner production*, 2011.
- GRIMA, E.M.; CAMACHO, F.G.; PÉREZ, J.A.S.; SEVILLA, J.M.F.; FERNÁNDEZ, F.G.A.; GÓMEZ, A.C. A mathematical model of microalgal growth in light-limited chemostat culture. 1994. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 61:167-173.
- LOMBARDI, A. T.; MALDONADO, M.T. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. *Photos. Res.*, 108: 77-87, 2011.
- LUNDQUIST, T.J.; WOERTZ, I.C.; QUINN, N.W.T.; BENEMANN, J.R. A Realistic Technology and Engineering Assessment of Algae Biofuel Production. *Energy Biosciences Institute*, 1-178, 2010.
- RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.; HERDMAN, M.; STANIER, R. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 111, 1-61, 1979.
- SUKENIK, A.; LEVY, R.S.; LEVY, Y.; FALKOWSKI, P.G.; DUBINSKY, Z. Optimizing algal biomass production in an outdoor pond: a simulation model. 1991. *J. Appl. Phyc.* 3: 191-201.
- SYED SHABUDEEN, P.S.; SOUNDARAJAN, M.; INDUMATHI, P. Algae biomass growth kinetic study in waste water medium using spectroscopic analysis. *J. Environ. Res. Develop.* 7, 4A:1496-1500, 2013.
- VERHULST, P.F. Notice sur la loi que la population poursuit dans son accroissement. *Corresp. Math. Phys.* 10, 113–121 (1838). books.google.com Disponível em: <http://webpages.fc.ul.pt/~mcgomes/aulas/dinpop/Mod13/Verhulst.pdf> Acesso em 18 de março de 2017.
- YU, G.; SHI, D.; CAI, Z.; CONG, W.; OUYANG, F. Growth and physiological features of cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120 in a glucose-mixotrophic culture. 2011, *Chin. J. Chem. Eng.*, 19:108-115.