

ENERGIAS RENOVÁVEIS

EFEITOS DA VARIAÇÃO DE pH E LUMINOSIDADE NO DESENVOLVIMENTO DA MICROALGA *Scenedesmus* sp VISANDO À PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS

Thiago Santos de Almeida Lopes – thiagosantos_al@outlook.com
Universidade Estadual da Paraíba

André Luiz Alves da Silva – nadre.alas@gmail.com
Universidade Estadual da Paraíba

Gustavo Ricardo Rodrigues Klein – gustavorrklein@gmail.com
Universidade Estadual da Paraíba

Camila Bonfim Miranda – camilabonfimm@gmail.com
Universidade Estadual da Paraíba

Adriano Oliveira da Silva – adriano_able@hotmail.com
Universidade Estadual da Paraíba

Weruska Brasileiro Ferreira – weruska.brasileiro@pq.cnpq.br
Universidade Estadual da Paraíba

Resumo: O cultivo de microalgas tem se destacado como uma atraente alternativa para geração de biocombustíveis, devido à sua alta produtividade por unidade de área, uso de terras não aráveis e contribuir com a redução dos efeitos do superaquecimento global em razão do maior sequestro de CO₂, que é emitido com a queima dos combustíveis fósseis. Várias espécies de microalgas também possuem a capacidade de sobreviver em ambientes extremos, adaptando o seu metabolismo de acordo com a alteração das condições ambientais. Desse modo, é importante analisar os parâmetros que influenciam em seu crescimento, como pH e luz, a fim de definir as condições que melhor favorecem seu desenvolvimento bem como buscar a otimização dos cultivos para uma maior produção de biomassa. Dentre as espécies de microalgas existentes, a *Scenedesmus* sp se destaca devido à sua elevada produtividade lipídica e de biomassa, o que potencializa a produção de biocombustíveis. Outro ponto que merece destacar é o benefício ambiental promovido pelo cultivo de microalgas em especial a *Scenedesmus* sp em razão da mitigação das emissões de CO₂ e possível biorremediação de águas residuárias. No presente estudo realizou-se cultivos da *Scenedesmus* sp em pH variando de 5,5 a 9, e fornecimento de luz variando de 6h a 24h, onde verificou-se que a condição mais favorável para o cultivo da respectiva microalga visando à produção de biocombustíveis foi pH 9 e 12h de luz, que resultaram numa velocidade específica máxima de crescimento de 0,0265 h⁻¹, tempo de geração de 26,1509 h e produtividade de biomassa de 0,0757 g.L⁻¹.d⁻¹. Estas condições indicam que a microalga *Scenedesmus* sp pode se adaptar facilmente em efluentes industriais e domésticos que apresentam alta alcalinidade e a não necessidade de iluminação artificial utilizando a própria energia solar em cultivos de grande escala.

Palavras-chave: Microalgas, Biocombustíveis, *Scenedesmus* sp, Biorremediação

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

O cultivo de microalgas se mostra como uma opção em potencial para obtenção de biomassa visando à produção de biocombustíveis, devido à sua alta produtividade por unidade de área, uso de terras não aráveis e sequestro de CO₂, além da capacidade de sobreviver em ambientes extremos, adaptando o seu metabolismo de acordo com a alteração das condições ambientais (CHIRANJEEVI & MOHAN, 2016).

As microalgas do gênero *Scenedesmus* apresentam características fundamentais para a produção de biocombustíveis: são verdes, simples, com alta eficiência fotossintética, possuem a capacidade de acumular alto teor de amido e lipídios – valiosos para a produção do bioetanol e do biodiesel, respectivamente – e a sua estrutura celular simplifica o processamento dos biocombustíveis quando comparado com outras plantas complexas, podendo substituir os recursos agrícolas (CHNG et al., 2016).

De acordo com estudos taxonômicos e bioquímicos, o cultivo de microalgas pode ser fotoautotrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico (ANGELO et al., 2015). Dentre eles, o cultivo mixotrófico apresenta diversas vantagens, incluindo melhor redução de CO₂, ausência de fotoinibição, maior crescimento celular e menor dificuldade para coleta de biomassa (CHANDRA et al., 2014). Nesse tipo de cultivo, as microalgas utilizam carbono orgânico e energia luminosa para o seu desenvolvimento.

A luz desempenha um papel central na produtividade de microalgas uma vez que fornece a energia necessária para as reações fotossintéticas, promovendo a conversão de nutrientes inorgânicos, dissolvidos no meio, em biomassa orgânica. A utilização de luz é, portanto, fundamental para o elevado rendimento da biomassa microalgal (SUTHERLAND et al., 2015).

O pH do meio de cultura é conhecido por ter grande influência no crescimento e na produção da biomassa de microalgas, uma vez que seu pH citosólico é neutro, ou ligeiramente alcalino, e suas enzimas celulares são sensíveis ao pH e podem se tornar inativas em condições ácidas (TRIPATHI et al., 2015). O pH está diretamente ligado com o bom funcionamento celular das microalgas, por isso o seu controle é de vital importância para o melhor desenvolvimento dos cultivos.

Então, sabendo que as condições ambientais estão diretamente relacionadas com o crescimento celular, a produtividade de biomassa e o acúmulo de lipídios, este estudo analisou a influência da luminosidade e do pH no crescimento da microalga *Scenedesmus* sp em cultivo autotrófico, buscando otimizar o seu desenvolvimento com vistas à produção de biocombustíveis.

2. METODOLOGIA

2.1. Microalga e aclimação dos cultivos

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Saneamento Ambiental do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual da Paraíba utilizando cepas da microalga de espécie *Scenedesmus* sp fornecidas pelo laboratório da Universidade Federal Fluminense.

A aclimação dos cultivos foi realizada de modo a estabelecer um ambiente propício para a otimização do crescimento da *Scenedesmus* sp. As culturas foram desenvolvidas em Erlenmeyres, que foram utilizados como fotobioreatores e mantidos a temperatura de 26°C±2, com agitação de ar comprimido para garantir a homogeneização do meio, e expostos por um período de 12 horas à iluminação de 4.000 lux, proveniente de lâmpadas fluorescentes de 40W.

A Figura 1 representa a fotomicrografia das cepas da microalga *Scenedesmus* sp e as condições de aclimação adotadas para o desenvolvimento das microalgas.

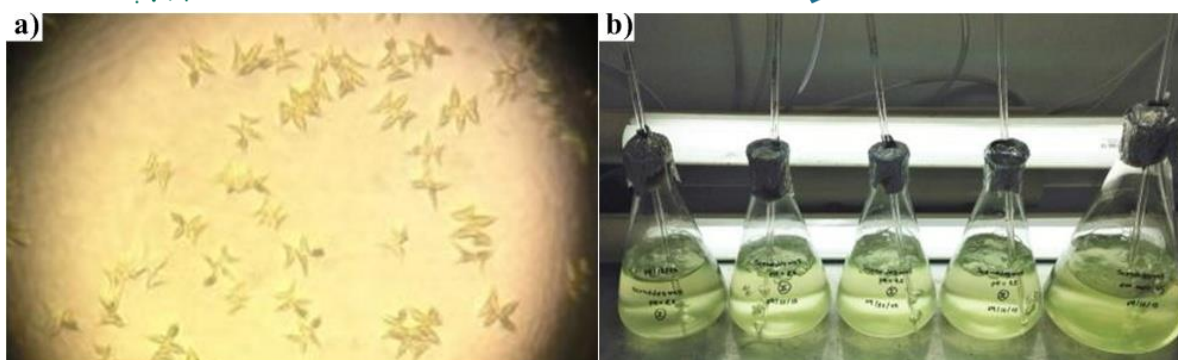


Figura 1 – a) Fotomicrografia da microalga *Scenedesmus* sp; b) Aclimação dos cultivos

2.2. Estratégia de estudo

Para o cultivo da *Scenedesmus* sp foi utilizado o meio de cultura *Wright's Cryptophyte* (WC), desenvolvido por Guillard & Lorenzen (1972), sob diferentes condições de pH e luminosidade, onde buscou-se analisar a influência de tais fatores no desenvolvimento da espécie em estudo.

As Tabelas 1 e 2 apresentam as condições de pH e luminosidade utilizados durante o presente estudo. Inicialmente, desenvolveram-se cultivos de *Scenedesmus* sp em meio de cultura WC com variadas alterações em seu pH, mantendo-se as condições originais de aclimação (12h de luminosidade). Em seguida, desenvolveram-se cultivos com variação no tempo de fornecimento de luz, utilizando-se o pH que proporcionou os melhores resultados de crescimento da respectiva microalga. Cada experimento teve duração total de 9 dias.

Tabela 1 - Condições de pH utilizadas nos cultivos da microalga *Scenedesmus* sp

Valores de pH conferidos ao meio de cultura WC para o cultivo da <i>Scenedesmus</i> sp			
5,5	6,5	7,5	9,0 (meio WC sem alteração)

Tabela 2 - Condições de luminosidade utilizadas nos cultivos da *Scenedesmus* sp

Quantidade de horas de luz fornecidas por dia aos cultivos de <i>Scenedesmus</i> sp em meio WC			
6,0	12,0	18,0	24,0

2.3. Avaliação do crescimento

Com o auxílio da microscopia óptica foi possível determinar o crescimento das microalgas avaliando-se a densidade celular em função do tempo de cultivo em cada uma das unidades experimentais. As amostras foram retiradas ao início dos cultivos e depois a cada 24h, para contagem de células em câmara de Neubauer, determinando, desse modo, a densidade celular expressa em número de células por mililitro de cultivo (células.mL⁻¹).

A contagem de células foi realizada em triplicata. O número de células corresponde à média geométrica das três contagens. O tempo de cultivo foi expresso pela quantidade de dias decorridos desde o início da inoculação (período de adaptação – fase lag) até o alcance máximo da densidade celular (fase estacionária). Os gráficos de dispersão foram plotados para representar as curvas de crescimento da *Scenedesmus* sp, onde o eixo das abscissas corresponde ao o tempo de cultivo em dias e o eixo das ordenadas ao número de células.mL⁻¹.

2.4. Avaliação da cinética de crescimento algal

A velocidade de crescimento é diretamente proporcional à concentração de microrganismos em um dado instante. A fração pela qual a população cresce na unidade de tempo é

dada por $\mu_{\text{máx}}$, que representa a velocidade específica de crescimento e tem unidade de tempo h^{-1} . Na fase exponencial (ou logarítmica) a velocidade específica de crescimento é constante e máxima, sendo μ_x igual a $\mu_{\text{máx}}$. A velocidade de crescimento foi calculada através da Equação (1).

$$\ln(x) = \mu_{\text{máx}} \cdot (t - t_i) + \ln(x_i) \quad (1)$$

A representação de $\ln(x)$ versus o tempo de cultivo, na fase exponencial, resulta em uma reta com coeficiente angular igual à velocidade específica máxima de crescimento $\mu_{\text{máx}}$. A fase exponencial também é caracterizada pelo tempo de geração (t_g), que é o tempo necessário para dobrar o valor da concentração celular ($x = 2x_i$). O tempo de geração foi calculado através da Equação (2).

$$t_g = \ln(2) / \mu_{\text{máx}} = 0,693 / \mu_{\text{máx}} \quad (2)$$

2.5. Avaliação da produtividade de biomassa

As análises de produtividade da biomassa cultivada em laboratório foram realizadas em triplicata no início e fim dos cultivos. Foram utilizadas membranas de acetato de celulose de porosidade de $0,45\mu\text{m}$, apresentadas na Figura 2, para realizar filtração a vácuo das amostras contendo biomassa de *Scenedesmus* sp, realizando-se a secagem em estufa na temperatura de 60°C até atingir peso constante e posterior pesagem da biomassa seca.



Figura 2 – Membranas de acetato de celulose com biomassa da microalga *Scenedesmus* sp

A produtividade foi determinada por meio da Equação (3), onde a biomassa seca inicial corresponde à quantidade de biomassa no início do cultivo e a biomassa seca final corresponde à quantidade de biomassa ao término do cultivo.

$$\text{Produtividade} = (\text{biomassa}_{\text{seca,final}} - \text{biomassa}_{\text{seca,inicial}}) / (\text{tempo}_{\text{final}} - \text{tempo}_{\text{inicial}}) \quad (3)$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. *Scenedesmus* sp sob diferentes condições de pH

A fim de verificar a influência que a variação de pH exerceu sobre o crescimento da microalga *Scenedesmus* sp, foram elaborados cultivos variando-se o pH do meio de cultura WC numa faixa de 5,5 a 9,0, mantendo-se as aclimações físicas estabelecidas inicialmente. A Figura 3 ilustra as curvas de crescimento da respectiva microalga sob diversas condições de pH, durante o tempo de cultivo 9 dias. Todos os cultivos iniciaram com uma concentração de células na ordem de 10^5 e, apesar da variação de pH, alcançaram quantidades semelhantes de número de células.

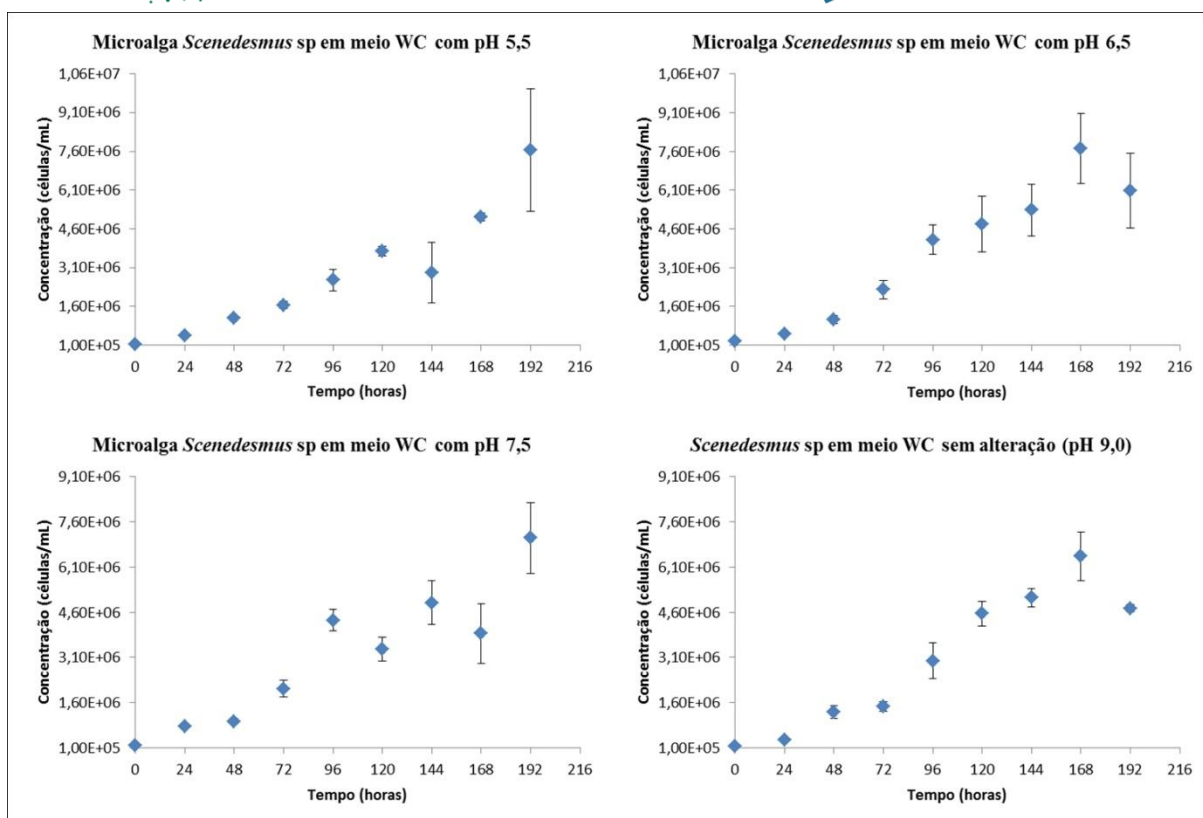


Figura 3 – Curvas de crescimento da *Scenedesmus* sp sob diversas condições de pH

O cultivo de *Scenedesmus* sp em meio WC com pH 6,5 foi o que desenvolveu o maior número de células, assim como os melhores resultados de velocidade específica máxima de crescimento e tempo de geração, apresentados na Tabela 3. Por outro lado, desenvolveu a menor produtividade de biomassa entre os demais. Comparando esse cultivo com o de pH 9,0 (meio WC sem alteração), verificou-se que há pouca diferença entre os valores de número máximo de células alcançado, velocidade específica máxima de crescimento e tempo de geração, utilizando-se como fator decisivo da melhor condição a produtividade em biomassa, que é essencial para a produção de biocombustíveis. Desse modo, observando-se que o cultivo onde não houve alteração de pH proporcionou a melhor produtividade em biomassa, selecionou-se essa condição química para os demais experimentos, ou seja, deu-se continuidade aos estudos com *Scenedesmus* sp sem alterar o pH do meio de cultura WC.

Tabela 3 – Velocidades específicas máximas, tempos de geração e produtividades de biomassa dos cultivos de *Scenedesmus* sp em meio WC sob diversas condições de pH

pH do meio de cultura	Velocidade específica $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	R^2	Tempo de geração (h)	Produtividade de biomassa ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)
5,5	0,0203	0,9930	34,1380	0,0550
6,5	0,0285	0,9990	24,3158	0,0470
7,5	0,0242	0,9503	28,6364	0,0633
9,0 (sem alteração do meio de cultura)	0,0265	0,9086	26,1509	0,0757

Os valores elevados do coeficiente de determinação (R^2), também expressos na Tabela 3, indicam que houve um excelente ajuste amostral ao modelo de estudo utilizado.

Tripathi et al. (2015) cultivaram *Scenedesmus* sp em meio de cultura BG-11, com pH 7,4 e 18 h de luz, e analisou a influência do pH alterando-o numa faixa entre 7 e 10, onde a microalga obteve sua maior produtividade em pH 8, mostrando que seu meio de cultivo deve ser alcalino. Chiranjeevi e Mohan (2016) também verificaram maior produção de biomassa em pH alcalino (8,5), que em pH ácido (6) e neutro (7,5). Fato reforçado no presente estudo, onde a produtividade da respectiva microalga aumentou juntamente com o pH.

Aburai et al. (2015) cultivaram a *Scenedesmus* sp em *Bold's Basal Medium* (meio de cultura BBM) autoclavado, com pH ajustado para 8, em Erlenmeyers de 500 mL, e obtiveram uma velocidade específica máxima de crescimento de $0,0112 \text{ h}^{-1}$. Comparando-se esse dado com o presente estudo, verifica-se que o meio WC em pH alcalino, além de favorecer a produção de biomassa, também favoreceu a cinética de crescimento da microalga, cuja velocidade específica máxima de crescimento alcançou o valor de $0,0265 \text{ h}^{-1}$ em pH 9.

Sutherland et al. (2015) investigaram os efeitos da adição de CO_2 no cultivo de microalgas em águas residuárias, ao longo de um gradiente de pH, e observaram melhor eficiência fotossintética quando o pH das culturas foram reduzidos para 8 e 6,5, onde o pH 6,5 promoveu o melhor rendimento de biomassa das microalgas *Micractinium bornhemense* e *Pediastrum boryanum*, porém reduziu de forma significativa a eficiência na absorção de nutrientes. Isso mostra que, para o tratamento de águas residuárias, o pH alcalino favorece a remoção de nutrientes, de modo que a microalga *Scenedesmus* sp, ao desenvolver melhor produtividade em pH 9, é uma forte candidata para remediação de efluentes alcalinos.

3.2. *Scenedesmus* sp sob diferentes condições de luminosidade

A Figura 4 ilustra as curvas de crescimento da microalga *Scenedesmus* sp em 6h, 18h e 24h de luz, juntamente com a do cultivo de 12h de luz, já apresentada na Figura 3 (pH 9,0). Os cultivos foram realizados mantendo-se a melhor condição de pH definida na primeira parte do estudo.

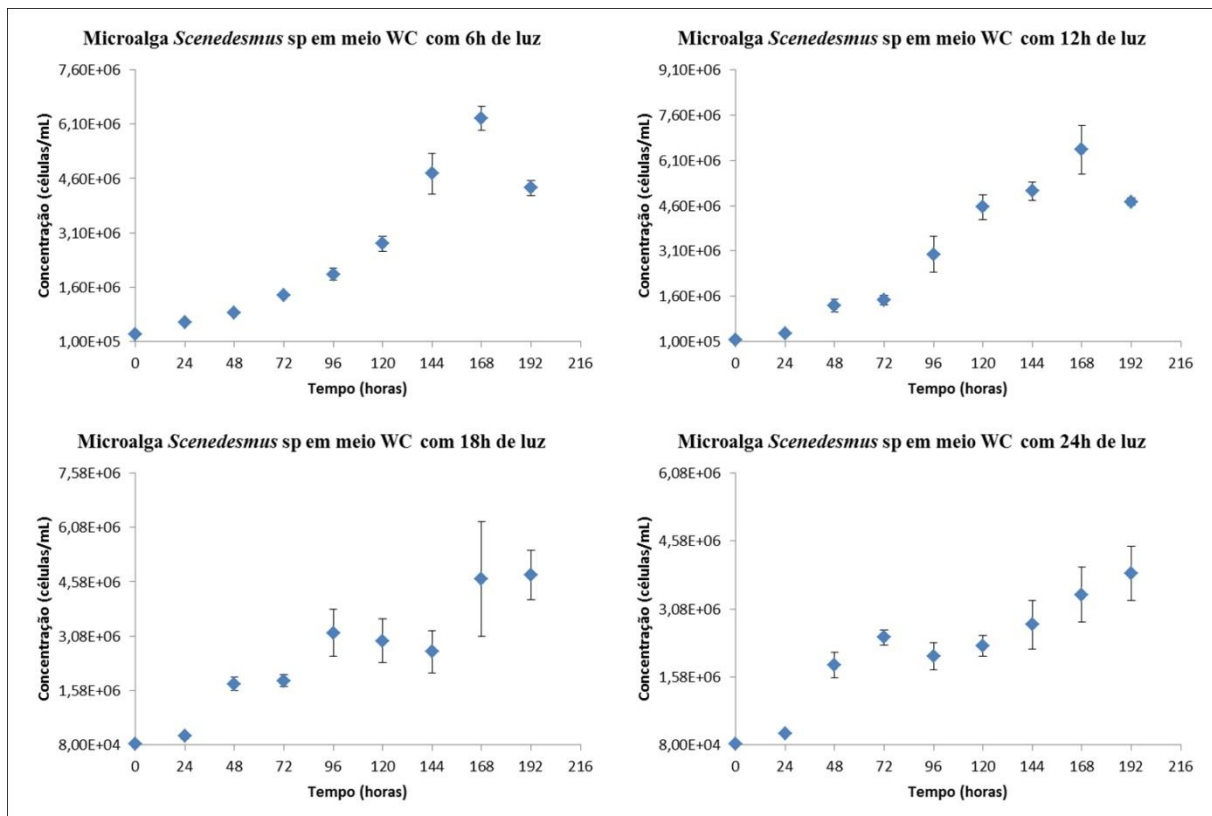


Figura 4 – Curvas de crescimento da microalga *Scenedesmus* sp em meio WC (sem alteração de pH) com variação na disponibilidade de luz

Os cultivos com 6h e 12h de luz iniciaram com um número de células na ordem de 10^5 , enquanto que os com 18h e 24h de luz iniciaram com 10^4 . Por esse motivo, os dois primeiros alcançaram maiores valores de número de células que os demais. No entanto, verifica-se que os cultivos com menor luminosidade apresentaram uma maior fase lag, o que corresponde a um lento crescimento nos primeiros dias após o inóculo. Já os cultivos com maior disponibilidade de luz rapidamente chegaram à fase exponencial, apresentando acelerado crescimento já no segundo dia após o inóculo.

Para uma melhor análise da influência da radiação luminosa sobre a microalga *Scenedesmus* sp, a Tabela 4 apresenta os dados de velocidade específica máxima de crescimento, tempo de geração e produtividade de biomassa dos cultivos com 6h, 12h, 18h e 24h de iluminação.

Observa-se que quanto maior a disponibilidade de luz, maior serão a velocidade específica máxima de crescimento e a produtividade de biomassa, assim como menor será o tempo de geração. Fato comprovado em estudos realizados por Chiranjeevi e Mohan (2016), que mostraram uma maior produtividade de biomassa de microalgas na presença de luz que na ausência.

Han et al. (2015) estudaram a influência da luz no crescimento da *Chlorella* sp, fornecendo energia com intensidade na faixa de 2.000-10.000 lux, e observaram que a taxa de crescimento e o rendimento de biomassa seca melhoravam à medida que se aumentava a intensidade luminosa, porém, 6.000 lux satisfaz completamente a necessidade das microalgas. No atual estudo, onde se forneceu energia com intensidade de 4.000 lux, verificou-se que o maior tempo de luminosidade (24h de luz por dia) favoreceu o melhor desenvolvimento da microalga, porém, o tempo de fornecimento de luz de 12h foi suficiente para as necessidades microalgais. Além disso, em larga escala se pretende simular as condições externas do meio ambiente, fato da indicação do tempo de luminosidade de 12h para o cultivo de *Scenedesmus* sp.

Tabela 4 – Velocidades específicas máximas, tempos de geração e produtividades de biomassa dos cultivos de *Scenedesmus* sp sob diversas condições de luminosidade

Horas de luz por dia	Velocidade específica $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	R²	Tempo de geração (h)	Produtividade de biomassa ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)
6,0	0,0161	0,9986	43,0435	0,0464
12,0	0,0265	0,9086	26,1509	0,0757
18,0	0,0291	0,8056	23,8144	0,0846
24,0	0,0420	0,8556	16,5000	0,1165

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através do estudo da microalga *Scenedesmus* sp sob diversas condições de pH e tempos de iluminação, visando a produção de biocombustíveis, pôde-se concluir:

- Valores de pH do meio de cultura WC entre a faixa 5,5-9,0 proporcionaram um bom desenvolvimento da microalga *Scenedesmus* sp, que alcançou a produtividade de biomassa máxima de $0,0757 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, em meio WC sem alteração química (pH 9,0).
- A disponibilidade de luz se apresentou como fator essencial para o desenvolvimento da microalga em estudo, mostrando que quanto maior o tempo de luminosidade, maior a velocidade específica máxima de crescimento e a produtividade de biomassa, e menor o tempo de geração, sendo o tempo de 12h de luz definido como condição ideal para o cultivo em larga escala, possibilitando o aproveitamento da energia solar e dispensando a iluminação artificial.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo financiamento do projeto.

REFERÊNCIAS

ABURAI, Nobuhiro; SUMIDA, Daichi; ABE, Katsuya. Effect of light level and salinity on the composition and accumulation of free and ester-type carotenoids in the aerial microalga *Scenedesmus* sp.(Chlorophyceae). **Algal Research**, v. 8, p. 30-36, 2015.

ANGELO, Elisangela Andrade; ANDRADE, Diva Souza; COLOZZI FILHO, Arnaldo. Cultivo não-fotoautotrófico de microalgas: uma visão geral. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 35, n. 2, p. 125-136, 2015. CHANDRA, Rashmi et al. Regulatory function of organic carbon supplementation on biodiesel production during growth and nutrient stress phases of mixotrophic microalgae cultivation. **Bioresource technology**, v. 165, p. 279-287, 2014.

CHIRANJEEVI, P.; MOHAN, S. Venkata. Critical parametric influence on microalgae cultivation towards maximizing biomass growth with simultaneous lipid productivity. **Renewable Energy**, 2016.

CHNG, Lee Muei; CHAN, Derek JC; LEE, Keat Teong. Sustainable production of bioethanol using lipid-extracted biomass from *Scenedesmus dimorphus*. **Journal of Cleaner Production**, 2016.

GUILLARD, Robert RL; LORENZEN, Carl J. YELLOW-GREEN ALGAE WITH CHLOROPHYLLIDE C1, 2. **Journal of Phycology**, v. 8, n. 1, p. 10-14, 1972.

HAN, Fei et al. Optimization and lipid production enhancement of microalgae culture by efficiently changing the conditions along with the growth-state. **Energy Conversion and Management**, v. 90, p. 315-322, 2015.

SUTHERLAND, Donna L. et al. The effects of CO₂ addition along a pH gradient on wastewater microalgal photo-physiology, biomass production and nutrient removal. **Water research**, v. 70, p. 9-26, 2015.

TRIPATHI, Ritu; SINGH, Jyoti; THAKUR, Indu Shekhar. Characterization of microalga *Scenedesmus* sp. ISTGA1 for potential CO₂ sequestration and biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 74, p. 774-781, 2015.