

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

CULTIVO SEMICONTÍNUO DAS MICROALGAS
Cyanobium sp. e Chlorella sp.

ADRIANO SEIZI ARRUDA HENRARD

Dissertação apresentada para
obtenção do título de Mestre em
Engenharia e Ciência de Alimentos.

Prof. Dr. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA
Orientador

RIO GRANDE, RS
2009

O êxito na vida não se mede pelo que você conquistou, mas sim pelas dificuldades que superou no caminho.

Abraham Lincoln.

Dedico esta dissertação de mestrado aos meus pais Paulo Arruda Pereira e Abegail da Rosa Pereira pela cumplicidade, apoio e presença constante em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Paulo e Abegail

pela luta incansável, enorme apoio, compreensão nos momentos de ausência, tanto esforço e incentivo para que eu conseguisse superar as dificuldades e chegar onde cheguei

Aos meus pais Mário e Sandra, e a “mãedrastra” Bárbara

pelo apoio, carinho, amizade, incentivo e esforço para me ajudar a chegar até aqui

As minhas irmãs Mery, Vera e Ângela

pelo esforço incondicional para me ajudar de alguma forma, torcerem e vibrarem com minhas conquistas e por serem muito mais que irmãs para mim

Ao meu orientador Jorge Alberto Vieira Costa

por ter me orientado desde a iniciação científica, acreditar no meu potencial, pelo incentivo, respeito e amizade

A minha namorada Nathalia Pontes

pelo amor, carinho, amizade, respeito e compreensão nos momentos de ausência, por estar sempre me apoiando nos momentos difíceis e comemorando com minhas vitórias

Aos colegas Fabrício, Christiane, Ana Priscila, Elisângela, Michele Moraes, Michele

Andrade e demais integrantes do LEB

pela amizade e auxílio na execução deste trabalho e pela paciência durante todos os dias no laboratório

Aos bolsistas Gabriel Martins, Luiza Moraes e Kauê Britto

pela grande contribuição ao trabalho, incansável dedicação e pela grande amizade

Aos amigos Carlos Henrique, Felipe Camerini e William Vega

pelo apoio, grande amizade e auxílio indispensável em vários momentos

Ao Roque Lourenço Zílio e Mara Alice

pela amizade e apoio ao longo do trabalho

Aos demais professores e funcionários da FURG

pelos conhecimentos passados e pelo indispensável auxílio

A todos os membros da banca examinadora

que com sua experiência científica e conceituada qualificação enriqueceram as discussões
deste trabalho através de suas sugestões

A Universidade Federal do Rio Grande - FURG

uma instituição pública, gratuita e de qualidade, por ter me acolhido desde a graduação

Ao Governo Federal, PETROBRÁS e a CAPES

pelo apoio financeiro e por me proporcionar o desenvolvimento deste trabalho

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
NOMENCLATURA	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral	3
2.2 Objetivos Específicos	3
3 JUSTIFICATIVA	4
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
4.1 Microalgas.....	8
4.1.1 Microalga <i>Cyanobium</i>	9
4.1.2 Microalga <i>Chlorella</i>	10
4.2 Fotossíntese.....	11
4.3 Nutrientes para o crescimento das microalgas	12
4.3.1 Fontes de carbono.....	13
4.3.2 Fontes de nitrogênio.....	13
4.3.3 Fonte de sódio e potássio.....	14
4.3.4 Fonte de fósforo e enxofre.....	15
4.3.5 Fonte de outros metais	15
4.4 Condições de Cultivo de Microalgas.....	17
4.4.1 Efeito da Temperatura no Cultivo de Microalgas	17
4.4.2 Efeito da Luminosidade no Cultivo de Microalgas.....	18
4.5 Agitação no Cultivo de Microalgas.....	19
4.6 Fotobiorreatores para Cultivo de Microalgas	20
4.7 Modo de Cultivo de Microalgas.....	23

5 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	26
5.1 ARTIGO 1_ CULTIVO DAS MICROALGAS <i>Cyanobium</i> sp. E <i>Chlorella</i> sp. EM DIFERENTES CONDIÇÕES NUTRICIONAIS E DE PROCESSO.....	27
RESUMO	28
ABSTRACT	28
1 INTRODUÇÃO	29
2 MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1 Microrganismos e Meios de Cultivo	30
2.2 Fotobiorreatores e agitações	30
2.3 Condições de Cultivo.....	31
2.4 Determinações Analíticas.....	31
2.5 Respostas Estudadas.....	32
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4 CONCLUSÕES	38
5 AGRADECIMENTOS	39
6 REFERÊNCIAS.....	39
5.2 ARTIGO 2_ FOTOBIORREATOR TUBULAR VERTICAL PARA CULTIVO DE MICROALGA EM MODO SEMICONTÍNUO	42
RESUMO	43
ABSTRACT	43
1 INTRODUÇÃO	44
1 INTRODUÇÃO	44
2 MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1 Microrganismo e Meio de Cultivo.....	45
2.2 Condições de Cultivo.....	45
2.3 Determinações Analíticas.....	46
2.4 Respostas Estudadas.....	46
2.5 Delineamento Experimental.....	47

2.6 Análise Estatística	48
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4 CONCLUSÕES	56
5 AGRADECIMENTOS	56
6 REFERÊNCIAS	56
5.3 ARTIGO 3 CULTIVO SEMICONTÍNUO DA MICROALGA <i>Chlorella</i> sp EM	
FOTOBIORREATOR ABERTO	59
RESUMO	60
ABSTRACT	60
1 INTRODUÇÃO	61
2 MATERIAL E MÉTODOS	62
2.1 Microrganismo e Meio de Cultivo.....	62
2.2 Condições de Cultivo.....	62
2.3 Determinações Analíticas	63
2.4 Respostas Estudadas.....	63
2.5 Delineamento Experimental.....	64
2.6 Análise Estatística	66
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4 CONCLUSÕES	77
5 AGRADECIMENTOS	77
6 REFERÊNCIAS.....	78
6 CONCLUSÕES GERAIS	81
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	82
8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	83
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
10 ANEXOS	97
10.1 Fotografias dos experimentos	97
10.2 Meios de cultivo.....	99

10.2.1 Meio ASM (GORHAM, 1964).....	99
10.2.2 Meio BG11 (RIPPKA et al., 1979).....	100
10.2.3 Meio H/2 (GUILLARD & RYTHER, 1975).	101
10.2.4 Meio Bristol's Modificado MBM (WATANABE, 1960).....	102
10.2.5 Meio MC (WATANABE, 1960).....	103
10.3 Planilhas de acompanhamento da concentração celular das microalgas <i>Cyanobium</i> sp. e <i>Chlorella</i> sp. nos cultivos.....	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fotomicrografia da microalga <i>Cyanobium</i>	10
Figura 2 Fotomicrografia da microalga <i>Chlorella</i>	11
Figura 3 Diferentes tipos de fotobiorreatores: (a) erlenmeyer fechado de 2 L; (b) tubular vertical fechado de 2 L; (c) <i>raceway</i> aberto de 6 L; (d) <i>raceway</i> aberto de 0,6 m ³ ; (e) <i>raceway</i> aberto de 12 m ³ ; (f) <i>raceway</i> aberto de 15 m ³	23
ARTIGO 1 CULTIVO DAS MICROALGAS <i>Cyanobium</i> sp. E <i>Chlorella</i> sp. EM DIFERENTES CONDIÇÕES NUTRICIONAIS E DE PROCESSO	
Figura 1 Desenho esquemático de cada fotobiorreator contendo 5 L de cultura, com as respectivas agitações, onde: (a) pás rotativas; (b) pás rotativas e cortina porosa; (c) pás rotativas e pedras porosas alongadas; (d) pás rotativas e pedras cilíndricas; (e) duas bombas submersas; (f) uma bomba submersa; (g) cortina porosa e (h) pedras porosas alongadas.....	31
Figura 2 Curvas de crescimento dos ensaios realizados com diferentes meios de cultivos para (a) <i>Cyanobium</i> sp.: ASM (▲), BG11 (○), BG11 + NaHCO ₃ (●), H/2 (□) e H/2 + NaHCO ₃ (■); (b) <i>Chlorella</i> sp.: BG11 (○), BG11 + NaHCO ₃ (●), H/2 (Δ), H/2 + NaHCO ₃ (▲), MBM (□), MBM + NaHCO ₃ (■), MC (+) e MC + NaHCO ₃ (◇).....	34
Figura 3 Curvas de crescimento para (a) <i>Cyanobium</i> sp. e (b) <i>Chlorella</i> sp. cultivadas sob diferentes agitações: pás rotativas (■), pás rotativas e cortina porosa (□), pás rotativas e pedras alongadas (Δ), pás rotativas e pedras cilíndricas (▲), 2 bombas submersas (●), 1 bomba submersa (○), cortina porosa (◇) e pedras alongadas (+).	37
ARTIGO 2 FOTOBIORREATOR TUBULAR VERTICAL PARA CULTIVO DE MICROALGA EM MODO SEMICONTÍNUO	
Figura 1 Configuração do fotobiorreator de 2 L. Todas as dimensões em mm.	46
Figura 2 Curvas de concentração celular dos cultivos semicontínuos em função do tempo para: (a) Concentração celular de corte 1,0 g.L ⁻¹ , taxa de renovação de meio 30% e concentração de bicarbonato de sódio 1,0 g.L ⁻¹ (experimento 2); (b) Concentração celular de corte 1,2 g.L ⁻¹ , taxa de renovação de meio 40% e concentração de bicarbonato de sódio 1,0 g.L ⁻¹ (experimento 15).	51
Figura 3 Superfícies de resposta e linhas de contorno para (a) velocidade específica de crescimento, (b) produtividade e (c) ciclos de crescimento em função da concentração de bicarbonato de sódio e taxa de renovação de meio de cultivo.....	55

ARTIGO 3 CULTIVO SEMICONTÍNUO DA MICROALGA *Chlorella* sp. EM FOTOBIORREATOR ABERTO

Figura 1 Desenho esquemático do fotobiorreator utilizado nos cultivos semicontínuos.....	63
Figura 2 Concentração celular dos cultivos semicontínuos em função do tempo para: (a) Concentração celular de corte 0,8 g.L ⁻¹ , taxa de renovação de meio 50% e concentração de bicarbonato de sódio 1,6 g.L ⁻¹ (experimento 12); (b) Concentração celular de corte 0,8 g.L ⁻¹ , taxa de renovação de meio 30% e concentração de bicarbonato de sódio 0,4 g.L ⁻¹ (experimento 9).	69
Figura 3 Evolução da velocidade específica de crescimento (●) e da produtividade (▲) em função do número de ciclos para: (a) Concentração celular de corte 0,6 g.L ⁻¹ , taxa de renovação de meio 40% e concentração de bicarbonato de sódio 0,4 g.L ⁻¹ (experimento 6); (b) Concentração celular de corte 0,8 g.L ⁻¹ , taxa de renovação de meio 30% e concentração de bicarbonato de sódio 0,4 g.L ⁻¹ (experimento 9); (c) Concentração celular de corte 0,8 g.L ⁻¹ , taxa de renovação de meio 50% e concentração de bicarbonato de sódio 0,4 g.L ⁻¹ (experimento 10).	70
Figura 4 Efeitos principais estimados para (a) velocidade específica de crescimento (μ_x), (b) produtividade (P_x) e (c) concentração de biomassa (X_{biomassa}) em função da concentração celular de corte (X_1), taxa de renovação de meio (X_2) e concentração de bicarbonato de sódio (X_3). Efeito linear (L); Efeito quadrático (Q).	74
Figura 5 Superfícies de resposta e linhas de contorno para (a) velocidade específica em função da concentração de corte e taxa de renovação de meio utilizando 1,6 g.L ⁻¹ de bicarbonato de sódio; (b) produtividade em função da concentração de bicarbonato de sódio e concentração de corte utilizando taxa de renovação de meio 40%; (c) concentração de biomassa gerada durante o cultivo em função da taxa de renovação de meio e concentração de corte utilizando concentração de bicarbonato de sódio 1,6 g.L ⁻¹	76

ANEXOS

Figura A1 Cultivos realizados em fotobiorreatores tipo erlenmeyer de 0,5 L.	97
Figura A2 Fotobiorreatores abertos tipo <i>raceway</i> utilizados no cultivo das microalgas <i>Cyanobium</i> e <i>Chlorella</i>	97
Figura A3 Cultivos com a microalga <i>Cyanobium</i> realizados em fotobiorreatores tubulares de 2 L.	98
Figura A4 Cultivos com a microalga <i>Chlorella</i> realizados em fotobiorreatores abertos tipo <i>raceway</i> de 6 L.	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Comparação entre cultivos realizados em fotobiorreatores tipo <i>raceway</i> e tubular.	22
ARTIGO 1 CULTIVO DAS MICROALGAS <i>Cyanobium</i> sp. E <i>Chlorella</i> sp. EM DIFERENTES CONDIÇÕES NUTRICIONAIS E DE PROCESSO	
Tabela 1 Produtividade máxima ($P_{m\acute{a}x}$, g.L ⁻¹ .d ⁻¹) e velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$, d ⁻¹) para <i>Cyanobium</i> sp. e <i>Chlorella</i> sp. cultivadas em diferentes meios de cultivo.....	36
ARTIGO 2 FOTOBIORREATOR TUBULAR VERTICAL PARA CULTIVO DE MICROALGA EM MODO SEMICONTÍNUO	
Tabela 1 Matriz do planejamento fatorial tipo Box-Behnken modificado com as variáveis codificadas e respectivos níveis de variação.	48
Tabela 2 Velocidade específica média de crescimento ($\mu_{m\acute{e}d}io$, d ⁻¹), tempo do cultivo em fase exponencial de crescimento (t_e , d) tempo de geração (t_g , d), ciclos de crescimento (N), produtividade ($P_{m\acute{e}d}io$, g.L ⁻¹ .d ⁻¹), pH mínimo (pH _{min}) e pH máximo (pH _{m\acute{a}x}) do estudo realizado segundo planejamento tipo Box-Behnken aplicado no estudo do cultivo da microalga <i>Cyanobium</i> sp.	50
Tabela 3 Significâncias estatísticas (p) e efeitos obtidos da análise do planejamento fatorial utilizado no cultivo semicontínuo da <i>Cyanobium</i> sp.....	53
ARTIGO 3 CULTIVO SEMICONTÍNUO DA MICROALGA <i>Chlorella</i> sp. EM FOTOBIORREATOR ABERTO	
Tabela 1 Matriz do planejamento fatorial tipo Box-Behnken com as variáveis codificadas e respectivos níveis de variação.....	65
Tabela 2 Número de cortes (N), velocidade específica média de crescimento ($\mu_{m\acute{e}d}io$, d ⁻¹), produtividade ($P_{m\acute{e}d}io$, g.L ⁻¹ .d ⁻¹), tempo de geração ($t_{g\ m\acute{e}d}io$, d) e concentração de biomassa gerada ($X_{biomassa}$, g.L ⁻¹) para a microalga <i>Chlorella</i> sp. em fotobiorreator aberto cultivada em modo semicontínuo.....	67
Tabela 3 Significâncias estatísticas (p) e efeitos obtidos da análise do planejamento fatorial utilizado no cultivo semicontínuo da <i>Chlorella</i> sp.....	72
ANEXOS	
Tabela A1 Composição do Meio ASM.....	99

Tabela A2 Composição do meio BG11.....	100
Tabela A3 Composição do meio H/2.	101
Tabela A4 Composição do meio MBM.	102
Tabela A5 Composição do meio MC.	103
Tabela A6 Acompanhamento diário da concentração celular (g.L^{-1}) para a microalga <i>Cyanobium</i> sp. Artigo Cultivo das microalgas <i>Cyanobium</i> sp. e <i>Chlorella</i> sp. em diferentes condições nutricionais e de processo.	104
Tabela A7 Acompanhamento diário da concentração celular (g.L^{-1}) para a microalga <i>Chlorella</i> sp. Artigo Cultivo das microalgas <i>Cyanobium</i> sp. e <i>Chlorella</i> sp. em diferentes condições nutricionais e de processo.	105
Tabela A8 Acompanhamento diário da concentração celular (g.L^{-1}) para a microalga <i>Cyanobium</i> sp. Artigo Cultivo das microalgas <i>Cyanobium</i> sp. e <i>Chlorella</i> sp. em diferentes condições nutricionais e de processo.	106
Tabela A9 Acompanhamento diário da concentração celular (g.L^{-1}) para a microalga <i>Chlorella</i> sp. Artigo Cultivo das microalgas <i>Cyanobium</i> sp. e <i>Chlorella</i> sp. em diferentes condições nutricionais e de processo.	107
Tabela A10 Acompanhamento diário da concentração celular (g.L^{-1}) para a microalga <i>Cyanobium</i> sp. Artigo Fotobiorreator tubular vertical para cultivo de microalga em modo semicontínuo.....	108
Tabela A11 Acompanhamento diário da concentração celular (g.L^{-1}) para a microalga <i>Chlorella</i> sp. Artigo Cultivo semicontínuo da microalga <i>Chlorella</i> sp. em fotobiorreator aberto.	112

NOMENCLATURA

N	Número de ciclos
p	Significância estatística
P	Produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)
P_x	Produtividade em biomassa ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)
$P_{\text{médio}}$	Produtividade média ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)
$P_{\text{máx}}$	Produtividade máxima ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)
μ_x	Velocidade específica de crescimento celular (d^{-1})
$\mu_{\text{médio}}$	Velocidade específica média de crescimento (d^{-1})
$\mu_{\text{máx}}$	Velocidade específica máxima de crescimento (d^{-1})
t	tempo de cultivo (d)
t_e	tempo de cultivo em fase exponencial (d)
t_g	tempo de geração (d)
X	Concentração celular (g.L^{-1})
X_0	Concentração celular inicial (g.L^{-1})
X_1	Variável: concentração celular de corte (g.L^{-1})
X_2	Variável: taxa de renovação de meio (%)
X_3	Variável: concentração de bicarbonato de sódio (g.L^{-1})
$X_{\text{máx}}$	Concentração celular máxima (g.L^{-1})
X_{biomassa}	Concentração de biomassa gerada no cultivo (g.L^{-1})
X_{C1}	Concentração de biomassa no primeiro ciclo de crescimento (g.L^{-1})
X_{C2}	Concentração de biomassa no segundo ciclo de crescimento (g.L^{-1})
X_{C3}	Concentração de biomassa no terceiro ciclo de crescimento (g.L^{-1})

X_{Cn}	Concentração de biomassa no n ciclo de crescimento (g.L^{-1})
X_{i1}	Concentração de biomassa no início do cultivo (g.L^{-1})
X_{i2}	Concentração inicial de biomassa após o primeiro ciclo de crescimento (g.L^{-1})
X_{i3}	Concentração inicial de biomassa após o segundo ciclo de crescimento (g.L^{-1})
X_{in}	Concentração inicial de biomassa após n ciclo de crescimento (g.L^{-1})

RESUMO

As microalgas se destacam por apresentarem diversas potencialidades, como fonte de alimento, obtenção de bioprodutos, produção de biocombustíveis e também podem contribuir na redução do efeito estufa, fixando CO₂. As microalgas apresentam em sua composição alto teor de proteínas, ácidos graxos, minerais e pigmentos e, além disso, a microalga *Chlorella* possui certificado GRAS (Generally Recognized As Safe), podendo ser utilizada como alimento sem oferecer risco à saúde humana. Industrialmente, o cultivo semicontínuo de microalgas é muito empregado, pois com esse tipo de cultivo é possível a manutenção da cultura em crescimento por períodos mais prolongados, procedendo-se apenas a alimentação periódica do meio novo. O objetivo deste trabalho foi estudar o crescimento das microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp. cultivadas em modo semicontínuo e diferentes condições nutricionais e de processo. Assim, este trabalho foi dividido em 3 etapas: na primeira, objetivou-se estudar os cultivos das microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp. em diferentes condições nutricionais e de processo; na segunda etapa, avaliou-se o cultivo semicontínuo da microalga *Cyanobium* sp. em fotobiorreator tubular vertical de 2 L e na terceira, estudou-se o cultivo da microalga *Chlorella* sp. em modo semicontínuo em fotobiorreator aberto tipo *raceway* de 6 L. Para avaliar o melhor meio nutriente e agitação, os cultivos foram realizados em fotobiorreatores tipo erlenmeyer e *raceway* de 0,5 L e 6 L, respectivamente. Os cultivos foram realizados em condições controladas, estufa climatizada a 30°C, 3200 Lux e fotoperíodo 12 h claro/escuro. O melhor meio de cultivo para as microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp. foi o meio BG11 com adição de bicarbonato de sódio, onde foram obtidas as maiores concentrações celulares (0,56 e 0,66 g.L⁻¹), velocidades específicas de crescimento (0,303 e 0,166 d⁻¹) e produtividades (0,120 e 0,089 g.L⁻¹.d⁻¹), respectivamente. Quando cultivadas sob diferentes agitações, as melhores respostas foram obtidas nos ensaios realizados com agitação por 2 bombas submersas, com concentrações máximas de biomassa 1,21 e 0,93 g.L⁻¹ para *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp., respectivamente. Para o cultivo em modo semicontínuo da microalga *Cyanobium* sp., a máxima velocidade específica de crescimento foi 0,127 d⁻¹ quando o cultivo foi realizado com concentração de corte 1,0 g.L⁻¹, taxa de renovação 50% e concentração de bicarbonato de sódio 1,0 g L⁻¹. Os máximos valores de produtividade (0,071 g.L⁻¹.d⁻¹) e número de ciclo (10) foram observados em concentração de corte 1,0 g.L⁻¹, taxa de renovação 30% e concentração de bicarbonato 1,0 g.L⁻¹. No cultivo semicontínuo com *Chlorella* sp., a maior velocidade específica de crescimento (0,149 d⁻¹) foi obtida quando cultivada com 1,6 g.L⁻¹ de bicarbonato de sódio e concentração de corte 0,6 g.L⁻¹. A maior produtividade (0,091 g.L⁻¹.d⁻¹) foi obtida quando utilizado no cultivo concentração de corte 0,8 g.L⁻¹, taxa de renovação de meio 40% e concentração de bicarbonato de sódio 1,6 g.L⁻¹. Os resultados mostraram que o cultivo em modo semicontínuo é uma alternativa para maximizar a produção de microalgas, além disso, o sistema de cultivo deve ser escolhido não apenas pela maior produtividade, mas também de acordo com as características desejadas do produto.

PALAVRAS-CHAVE: fotobiorreatores; *Chlorella*; *Cyanobium*; microalgas; semicontínuo.

ABSTRACT

Microalgae had gain attention for presenting diverse potentialities, as source of food, attainment of bioproducts, produce biofuels and also can contribute in the greenhouse effect reduction, fixing CO₂. Microalgae presents in its composition high contents of protein, fatty acids, minerals and pigments, moreover, microalgae *Chlorella* possess the GRAS (Generally Recognized As Safe) certificate, being able to be used as food without offering any risk to the human health. The semicontinuous microalgae cultivation is very used, because of the long period cells maintenance, being necessary the periodic feeding of new cultivation medium. The objective of this work was to study the growth of the microalgae *Cyanobium* sp. and *Chlorella* sp. cultivated in semicontinuous mode and different nutritional and process conditions. This work was divided in three stages: in the first, the aim was to study the cultivation of the microalgae *Cyanobium* sp. and *Chlorella* sp. in different nutritional and process conditions; in the second stage, the semicontinuous cultivation of the microalgae *Cyanobium* sp. in vertical tubular photobioreactor of 2 L was evaluated; in the third, the culture of the microalgae *Chlorella* sp. was studied in semicontinuous mode in open photobioreactor type *raceway* of 6 L. To evaluate the best medium nutrient and agitation conditions, cultures were carried out under in photobioreactors type erlenmeyer and *raceway* of 0,5 L and 6 L, respectively. Cultures were carried out under controlled conditions, climatized greenhouse at 30°C, 3200 Lux and 12 h photoperiod light/dark. The best culture medium for the microalgae *Cyanobium* sp. and *Chlorella* sp. was the BG11 medium with sodium bicarbonate addition, where were obtained the highest cell concentrations (0,56 and 0,66 g.L⁻¹), specific growth rate (0,303 and 0,166 d⁻¹) and productivity (0,120 and 0,089 g.L⁻¹.d⁻¹), respectively. When cultivated under different agitation conditions, the best answers were obtained with agitation given by 2 submerged pumps, with maximum biomass concentrations 1,21 g.L⁻¹ for *Cyanobium* sp. and 0,93 g.L⁻¹ for *Chlorella* sp. For the culture in semicontinuous mode of the microalga *Cyanobium* sp., the maximum specific growth rate was 0,127 d⁻¹ in the culture with cell concentration 1,0 g.L⁻¹, renewal rate 50% and sodium bicarbonate concentration 1,0 g.L⁻¹. The maximum productivity values (0,071 g.L⁻¹.d⁻¹) and cycle number (10) had been observed in cell concentration 1,0 g.L⁻¹, renewal rate 30% and 1,0 g.L⁻¹ bicarbonate concentration. In the semicontinuous culture with *Chlorella* sp., the highest specific growth rate (0,149 d⁻¹) was gotten when cultivated with 1,6 g.L⁻¹.d⁻¹ of sodium bicarbonate and cell concentration 0,6 g.L⁻¹). The highest productivity (0,091 g.L⁻¹.d⁻¹) was gotten when cell concentration 0,8 g.L⁻¹, medium renewal rate 40% and sodium bicarbonate concentration 1,6 g.L⁻¹ were used in the culture. Results had shown that semicontinuous mode culture is an alternative to maximize the microalgae production, moreover, the culture system must not only be chosen by the highest productivity, but also in accordance with the desired characteristics of the product.

KEYWORDS: photobioreactors; *Chlorella*; *Cyanobium*; microalgae; semicontinuous.

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de microalgas é um dos mais modernos processos biotecnológicos que tem se desenvolvido significativamente. A diversidade de microalgas há muito tempo vem atraindo a atenção de vários pesquisadores, por apresentarem em sua composição altas concentrações de proteínas, sais minerais, vitaminas e ácidos graxos essenciais. Além disso, certas espécies de microalgas, quando cultivadas em meios adequados e sob determinadas condições, possuem a capacidade de duplicar sua biomassa em até um dia.

O cultivo de microalgas em grande escala para fins comerciais iniciou por volta de 1960 no Japão, com a microalga *Chlorella*, seguida pela cultura de *Spirulina* em 1970 no México, ambas utilizadas para suplemento alimentar. Após, o mercado de alimentos utilizando microalgas se disseminou pelo mundo, apresentando rápido desenvolvimento em diversos países como França, Estados Unidos, China e Índia (BECKER, 2004).

A microalga *Chlorella* possui certificado GRAS (Generally Recognized As Safe) emitido pelo FDA (Food and Drug Administration), podendo ser utilizada como alimento sem oferecer risco à saúde humana. A microalga *Cyanobium* pode ser consumida como ração animal, além de poder ser utilizada para produção de biocombustíveis e biofixação de CO₂ da atmosfera.

A produção de microalgas e o aumento de escala nos cultivos envolvem problemas, principalmente relacionados à agitação e à incidência luminosa. Em fotobiorreatores que não possuem agitação, o desenvolvimento da cultura é limitado, podendo apresentar zonas de estagnação da cultura, onde as células não recebem luz, afetando o processo fotossintético, bem como o crescimento celular.

Os meios de cultura devem apresentar características, como ser economicamente viável, atender às necessidades nutricionais do microrganismos, auxiliar no controle do processo e não causar dificuldades no tratamento final do efluente (SCHIMIDELL et al., 2001).

Para a obtenção de um produto homogêneo e de forma ininterrupta pode-se utilizar fotobiorreatores operando em modo contínuo. Entretanto, em muitos casos o modo de operação contínuo não se torna viável, econômica ou tecnicamente. Uma aproximação desse processo é o modo semicontínuo, que consiste em um sistema onde há a retirada periódica de produto e subsequente adição de meio de cultivo.

Neste sentido, compreender o processo de crescimento e multiplicação das microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp., bem como controlar as variáveis que influenciam

no seu desenvolvimento, são de grande interesse para a produção dessas microalgas, pois podem determinar as melhores condições de cultivo e proporcionar redução de custos com nutrientes do meio de cultivo. Além disso, o cultivo em modo semicontínuo torna-se uma das alternativas para produção em maior escala.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar o crescimento das microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp. cultivadas em modo semicontínuo e diferentes condições nutricionais e de processo.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar a influência dos diferentes meios de cultivo e agitações nas características cinéticas de crescimento das microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp.;
- Estudar o cultivo da microalga *Cyanobium* sp. em fotobiorreator tubular vertical fechado, em modo semicontínuo;
- Avaliar o cultivo da microalga *Chlorella* sp. em fotobiorreator tipo *raceway* aberto, em modo semicontínuo.

3 JUSTIFICATIVA

A busca de alternativas alimentares que possam diminuir o déficit nutricional existentes em uma parcela significativa da população, a um custo acessível, envolvem a pesquisa de novos processos e matérias-primas (MULITERNO et al., 2005). As microalgas têm sido estudadas em pesquisas biotecnológicas devido a sua importância nutricional, econômica e ecológica (COSTA et al., 2006).

As microalgas tem sido utilizadas na alimentação humana como fonte de suplemento alimentar de alto valor nutricional (MORAIS et al., 2006), fonte de biocorantes (SILVEIRA et al., 2007) e na alimentação animal (CEBALLOS et al., 2007). Além disso, estudos tem sido realizados para utilização de microalgas na produção de biocombustíveis (CHISTI, 2007a) e como forma de fixar CO₂ originado na atividade industrial e geração térmica de energia elétrica (MORAIS & COSTA, 2007a; MORAIS & COSTA, 2007b).

As microalgas podem apresentar substâncias celulares tais como proteínas, ácidos graxos, carboidratos e pigmentos fotossintéticos (COLLA et al., 2007b), em composições e em concentrações variáveis, refletindo a natureza do organismo, influência das condições de cultivo empregadas e estado fisiológico da cultura.

Os cultivos de microalgas, em comparação aos cultivos vegetais, além de utilizar menores áreas, independem da qualidade do solo, podendo ser desenvolvidos em solos estéreis, inutilizáveis para a agricultura e até mesmo no deserto; ou em solos férteis, sem causar impacto. Microalgas necessitam 3 vezes menos água que a soja e utiliza apenas 2% da água necessária para o gado, podendo esta ser, para a maioria destes microrganismos fotossintéticos, salina, alcalina, ou até mesmo residual, impróprias para a agricultura. Para produzir a mesma quantidade de proteínas as microalgas necessitam 20 vezes menos área que a soja e 200 vezes menos área que o gado (HENRIKSON, 1994).

Microalgas realizam a fotossíntese como metabolismo principal para a obtenção de carbono orgânico através do carbono inorgânico contido no CO₂, utilizando a energia solar e liberando oxigênio na atmosfera. As microalgas utilizam carbono inorgânico para o crescimento, apresentando maior eficiência fotossintética que os vegetais superiores, podendo ser utilizadas na mitigação de CO₂ (BROWN & ZEILER, 1993) e cultivadas em meio salino simples (PIRT, 1986).

Os cultivos de microalgas utilizam processos industriais bastante simples, porém, os nutrientes presentes nos meios de cultura são de grande importância para a viabilização desses cultivos. Estudar quais os componentes que devem ser acrescentados

em maior ou menor quantidade nos meios de cultura é fundamental para proporcionar melhor desenvolvimento das espécies (LOURENÇO, 2006).

A agitação nas culturas de microalgas estão relacionadas a uma série de fatores influentes nos parâmetros de crescimento celular. Em fotobiorreatores que não possuem agitação, o desenvolvimento da cultura é limitado pela luminosidade. Algumas funções da agitação são impedir a formação de aglomerados garantindo incidência luminosa suficiente às células (ZHANG et al., 1999; GRIMA et al., 1996; CORNET et al., 1995; OGBONNA et al., 1998), permitir a captação de CO₂ da atmosfera e a liberação de O₂ do interior do meio líquido (JIMÉNEZ et al., 2003).

O cultivo semicontínuo é muito empregado industrialmente para microalgas, apresentando vantagens operacionais, como dispensar a constante troca de inóculo, além de manter o microrganismo em elevadas velocidades de crescimento (LOURENÇO, 2006). Com o cultivo semicontínuo é possível a manutenção da cultura de crescimento por tempos mais prolongados, procedendo-se apenas a alimentação periódica do meio de cultivo novo. Apesar de muito utilizado, esse sistema é pouco estudado, havendo poucos trabalhos científicos envolvendo variáveis como concentração de celular e taxa de renovação de meio.

O Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) pesquisa o cultivo de microalgas desde 1996. Já foram estudados substratos alternativos para o crescimento (ANDRADE & COSTA, 2008; ANDRADE & COSTA, 2007; COSTA et al., 2003; COSTA et al., 2001), configurações de fotobiorreatores e modos de cultivo (REICHERT et al., 2006; COSTA et al., 2004), efeito de fatores como temperatura (COLLA et al., 2004), iluminância (ANDRADE & COSTA, 2007), taxa de renovação e concentração de corte (REICHERT et al., 2006) no crescimento e composição da biomassa de *Spirulina*. Foram realizados estudos de custos de produção (COZZA, 1999), do potencial antitumoral (LOPES et al., 2004) e hipocolesterolêmico (COLLA et al., 2008) da microalga, modelagem matemática do crescimento de *Spirulina* (COSTA et al., 2002; COSTA et al., 2000), perfil de ácidos graxos (MORAIS & COSTA, 2008a; RADMANN & COSTA, 2008), produção de biometano através de biomassa microalgal (COSTA et al., 2008) e o isolamento de uma cepa nativa do extremo sul do Brasil (MORAIS et al., 2008). Foram desenvolvidos produtos adicionados de biomassa microalgal para alimentação humana (MORAIS et al., 2006) e ração, a fixação microalgal de gás carbônico de gases de combustão (MORAIS & COSTA, 2008b; RADMANN & COSTA, 2008), extração de bioprodutos, produção de etanol e biodiesel, e a potencialidade do sul do Brasil para o cultivo de *Spirulina* (ANDRADE & COSTA, 2008), entre outros produtos.

A partir de uma parceria entre o LEB, empresas, prefeituras e organizações não governamentais foi construída uma planta de produção de microalgas. Esta planta opera, desde 2004, no extremo sul do Brasil, às margens da Lagoa Mangueira, possuindo 3 fotobiorreatores de 15 m³, com uma produção mensal de 50 - 70 kg de biomassa, utilizada para enriquecimento de merenda escolar no município de Rio Grande. Atualmente a planta é operada com recursos oriundos da parceria entre o LEB e a empresa BRASKEM.

Em 2004 iniciou o convênio entre o LEB, a ELETROBRÁS (Centrais Elétricas Brasileiras S. A.) e a CGTEE (Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica), localizada no município de Candiota – RS para desenvolvimento de tecnologia para biofixação de CO₂ originado na combustão do carvão mineral por microalgas. Como produto deste convênio foi projetada, montada e colocada em operação a Planta Piloto de Biofixação de CO₂ por microalgas, formada por um sistema modular composto por 2 containers-laboratório de 12 m (40 pés) cada, 2 fotobiorreatores do tipo *raceway*, com dimensões de 15 x 3 x 0,4 m e volume de 18 m³ e um fotobiorreator, com dimensões de 4 x 0,8 x 0,4 m e volume de 1 m³, para crescimento e manutenção de inóculo. A Planta Piloto montada é a maior estrutura construída no Brasil para a biofixação de CO₂ por microalgas.

Uma terceira planta de produção de biomassa microalgal foi colocada em operação na cidade de Ribeirão Preto, para tratamento da vinhaça originada da produção de bioetanol por microalgas. A planta piloto é formada por 2 fotobiorreatores de 15 m³ e 2 fotobiorreatores de 1 m³.

Encontra-se em desenvolvimento o estudo da produção de bioetanol a partir de biomassa microalgal, que pode se tornar a quarta geração de obtenção deste álcool. O trabalho inclui parceria entre o LEB e o CTC (Centro de Tecnologia Canavieira), unindo pesquisadores e infraestrutura das duas instituições.

Em breve outra planta de produção de biomassa será instalada, a partir de uma parceria entre o LEB e a empresa IMCOPA - Importação, Exportação e Indústria de Óleos Ltda, para a produção de lipídios e ácidos graxos ω -3 e ω -6.

Pesquisas sobre microalgas vem sendo desenvolvidas no LEB através dos projetos “Cooperação Técnica Para Obtenção de Biomassa, Bioenergia e Produtos de Alto Valor Agregado a Partir de Microalgas” e “Rede Integradora de Nanotecnologia e Biotecnologia Microalgal Para o Desenvolvimento Científico/Tecnológico e Formação de Recursos Humanos” recentemente aprovados pela CAPES.

Graças ao histórico de trabalhos desenvolvidos com algumas espécies de microalgas no Laboratório de Engenharia Bioquímica, em 2006, juntamente com a

Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e PETROBRÁS, foi firmada uma parceria com o objetivo principal produzir biodiesel a partir de microalgas cultivadas em água de produção/salobra.

Neste sentido, seguindo as linhas de pesquisa implantada há alguns anos no Laboratório de Engenharia Bioquímica e continuando os estudos envolvendo formas de cultivo, faz-se necessária uma avaliação mais detalhada dos cultivos, como agitação e cultivo semicontínuo das microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp., além de avaliar quais nutrientes devem ser adicionados à cultura para melhor crescimento. Com isso, serão obtidos dados de crescimento e produtividade das microalgas, permitindo a verificação da possibilidade de exploração dos cultivos dessas microalgas. Esse tipo de cultivo é muito empregado industrialmente para microalgas, apresentando vantagens operacionais, como dispensar a constante troca de inóculo, além de manter o microrganismo em elevadas velocidades de crescimento.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Microalgas

As microalgas constituem-se como um dos mais eficientes sistemas biológicos de transformação de energia solar em compostos orgânicos, através da fotossíntese (VONSHAK, 1997). Podem ser cultivadas nos mais inóspitos locais, tais como lagos salinos adjacentes a desertos. Elas possuem um enorme potencial de aproveitamento, quer como fontes de alimento ou como dos mais diversos compostos químicos de interesse (HENRIKSON, 1994). As características gerais de alta produtividade e de rápido crescimento de várias espécies de microalgas têm despertado o interesse de pesquisadores, fomentando diversos estudos e divulgação em importantes publicações (LOURENÇO, 1996).

As microalgas representam os microrganismos fotossintéticos procarióticos (cianobactérias) antigamente chamadas de algas azul-esverdeadas, e eucarióticos (algas verdadeiras). São geralmente unicelulares, gram-negativos, coloridos devido à presença dos pigmentos fotossintéticos, e vivem, em sua maioria, em ambientes aquáticos (OLAIZOLA, 2003; TOMASELLI, 1997). Sua importância na natureza refere-se principalmente à elevada participação no balanço global da fotossíntese, contribuindo com grande parcela da produção primária do planeta. No mar, cerca de 90% da fotossíntese é realizada pelas diversas microalgas que constituem o fitoplâncton (LOURENÇO, 2006). Surgiram há mais de 3 milhões de anos e formaram a atual atmosfera, e desde então regulam a biosfera do planeta retirando CO₂ e produzindo O₂ (ROMANO et al., 2000).

O cultivo comercial de microalgas em larga escala começou nos anos 60 no Japão com a cultura de *Chlorella*, seguida nos anos 70-90 pelo cultivo de *Spirulina* no México, Estados Unidos e China, onde estas microalgas eram utilizadas como alimento (BOROWITZKA, 1999). Segundo BOROWITZKA (1999), as microalgas *Dunaliella salina* eram cultivadas para extração de β-caroteno, *Haematococcus pluvialis* para extração de astaxantina e diversas outras espécies de microalgas eram utilizadas como ração na aquicultura.

Nos últimos 30 anos a biotecnologia microalgal tem se desenvolvido e diversificado significativamente. O cultivo de microalgas está se desenvolvendo também como fonte de produtos farmacêuticos, bioquímicos e fertilizantes, e mais recentemente elas têm sido propostas como fonte de energia. As microalgas podem ser utilizadas para produzir metano, também podem produzir hidrogênio fotossinteticamente, e algumas acumulam

lipídios que pode ser transformado em biodiesel (COSTA et al., 2008; SCRAGG et al., 2003).

No Brasil, pesquisas com microalgas são relativamente recentes e têm focado, principalmente, o aspecto de crescimento sob diversas condições, como meios de cultivo, e outros parâmetros como nutrientes, temperatura, salinidade e luz (COSTA, et al., 2001; SIPAÚBA et al., 1999; OLIVEIRA, 1995; DERNER, 1995).

Atualmente, a biomassa obtida nos cultivos de microalgas pode ser utilizada na formulação de alimento humano (MORAIS et al., 2006) e ração animal (GRINSTEAD et al., 2000; GOUVEIA et al., 1998) além de ser utilizada para extração de pigmentos e vitaminas (SAJILATA et al., 2008; PATIL et al., 2008; MENDIOLA et al., 2008; CAMPO et al., 2007). Estudos têm mostrado também sua aplicação na produção de biocombustíveis (CHISTI, 2007a; CHISTI, 2007b; SCRAGG et al., 2003; SCRAGG et al., 2002) e na mitigação de gases que causam o efeito estufa (MORAIS & COSTA, 2007a; MORAIS & COSTA, 2007b; MORAIS & COSTA, 2007c).

O valor nutricional das microalgas depende, principalmente, da sua composição bioquímica. Embora exista uma grande diferença nas composições das microalgas em função da classe e a espécie que se está trabalhando, as proteínas representam o maior constituinte orgânico, seguido usualmente de carboidratos e então pelos lipídios (COUTTEAU, 1996). Quando cultivadas em meios adequados, certas espécies de microalgas podem duplicar a sua biomassa diariamente, produzindo matéria seca com teor protéico superior a 50% e alcançando produtividades de 30-50 g.m⁻².d⁻¹ em peso seco (GOLDMAN, 1980). A manipulação das condições ambientais e os diferentes estágios de crescimento podem alterar a composição bioquímica das microalgas (BROWN et al., 1989).

4.1.1 Microalga *Cyanobium*

A microalga *Cyanobium* é uma cianobactéria da classe Coccogoneae, unicelular, apresenta forma oval, elipsóide, com cromoplasta bem visível. Apresentam-se solitárias ou em pares após a divisão celular, seu tamanho é cerca de 0,4 - 2,4 µm de comprimento e aproximadamente 0,25 – 0,4 µm de largura. São aeróbias fotossintéticas, encontradas em ambiente marinho e água doce. A reprodução da microalga *Cyanobium* é assexuada, ocorrendo por fissão binária, transversal ao longo do eixo, resultando em duas células filhas isomórficas, sendo que as células crescem em tamanho e formato da original, antes da próxima divisão (KOMÁREK et al., 1999). A figura 1 apresenta a fotomicrografia da microalga *Cyanobium*.



Figura 1 Fotomicrografia da microalga *Cyanobium*.

FONTE: KOMÁREK et al., 1999.

4.1.2 Microalga *Chlorella*

Chlorella é uma microalga unicelular microscópica, esférica e seu diâmetro varia de 5-10 μm (ILLMAN et al., 2000), encontrada em tanques e lagos, com grande habilidade de realizar fotossíntese (VONSHAK, 1997). Pertence ao grupo das Clorófitas, que são algas que tem cloroplastos verdes, circundados por duas membranas. As paredes celulares das algas verdes, como aquelas das plantas terrestres, são compostas de pectinas e celulose, ou de polímeros de xilose ou manose conectadas com a proteína. As paredes em muitos gêneros estão incrustadas com carbonato de cálcio, sílica e, menos freqüentemente, outros minerais como óxido de ferro (MARGULIS & SCHWARTZ, 2001).

A microalga *Chlorella* foi descoberta pelos japoneses (RICHIMOND, 1990), tradicionais consumidores de algas, os quais a apreciam e a utilizam normalmente como complemento alimentar em saladas e sushis, devido a sua composição rica em nutrientes como a clorofila “a” e “b”, proteínas, vitaminas, sais minerais e aminoácidos essenciais. A figura 2 apresenta a fotomicrografia da microalga *Chlorella*.

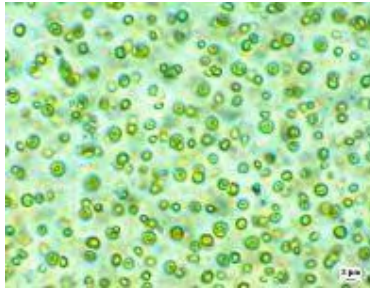


Figura 2 Fotomicrografia da microalga *Chlorella*.

FONTE: Laboratório de Engenharia Bioquímica – FURG

A microalga *Chlorella* possui 53% de proteínas, 23% de carboidratos, 9% de lipídios e 5% de minerais (HENRIKSON, 1994). Ela contém ainda mais de 2% de clorofila, o que lhe permite rápido crescimento, pois assim como as plantas superiores, seu metabolismo principal é a fotossíntese, onde a fonte principal de energia é a luz solar (VONSHAK, 1997). *Chlorella* também é rica em vitaminas do complexo B, principalmente a B₁₂, vital na formação e regeneração das células sanguíneas que juntamente com o ferro fazem desta microalga um produto indicado no tratamento e prevenção de anemia. Assim como a microalga *Spirulina*, a *Chlorella* possui o certificado GRAS (Generally Recognized As Safe) emitido pelo FDA (*Food and Drug Administration*), podendo ser utilizada como alimento sem apresentar risco à saúde.

Espécies do gênero *Chlorella* são estudadas há mais tempo quanto à produção em massa para alimentação humana, sendo atualmente produzidas por mais de 70 empresas no mundo todo, onde a maior produtora mundial gera 400 t de biomassa seca ao ano. Essa produção é inteiramente dedicada ao consumo humano, sendo comercializada nas formas de pílulas, pó (para misturas em alimentos), sucos, extratos concentrados líquidos e barras gelatinosas. A produção mundial anual de *Chlorella* atinge mais de 2.000 t ao ano. Foi a primeira microalga comercializada como pílulas formadas por alga em pó prensada para consumo humano, tendo ocorrido no Japão, em 1964 (LOURENÇO, 2006).

4.2 Fotossíntese

Fotossíntese é o processo metabólico pelo qual os organismos fotoautotróficos convertem energia luminosa em energia química na forma de carboidratos. A energia captada através do processo de fotossíntese é utilizada por algas, plantas superiores e certas bactérias, e é utilizada para síntese de compostos essenciais que posteriormente são utilizados por animais, já que esses não podem utilizar a luz do sol para obtenção de energia (ALBERTS et al., 1997).

A reação global de fotossíntese pode ser assim descrita:



Através desta reação global, duas fases distintas podem ser identificadas: a fase clara (etapa fotoquímica) e a fase escura (etapa química). As reações da fase clara envolvem a captação da energia luminosa e conversão do ATP com redução de energia realizada pelo transporte de elétrons da H_2O para o NADP^+ . O local destas reações que envolvem o transporte de elétrons são as membranas tilacóides dispersas nas células. As reações da fase escura, de natureza enzimática, utilizam a energia gerada das reações da fase clara para converter CO_2 em carboidratos. Estas reações são conduzidas fora do cloroplasto, em células eucarióticas, e no citoplasma, no caso das cianobactérias (VONSHAK, 1997).

Verifica-se deficiência de compostos reserva, quando não há fotossíntese, ou quando há escassez dos nutrientes do meio de cultivo. Nessa situação, produtos de reserva da célula são metabolizados para suprir essa deficiência. Na ausência dessa energia ou na deficiência de CO_2 , um composto de reserva denominado α -1,4-glicano, similar ao glicogênio ou à fração amilopectina de amido encontrado em plantas superiores é o principal produto de reserva que suporta o metabolismo em cianobactérias. Este é provavelmente sintetizado a partir das ficobiliproteínas, sendo oxidado a partir do ciclo oxidativo das pentoses-fosfato, fornecendo a energia necessária para processos celulares. Por sua vez, a assimilação do nitrogênio também depende da energia derivada da fotossíntese. Embora os metabolismos de carbono e nitrogênio sejam independentes, ambos podem ser absorvidos simultaneamente em compostos como proteína e cianoficina (COLLA et al., 2002).

4.3 Nutrientes para o crescimento das microalgas

Com o objetivo de minimizar custos de produção da biomassa microalgal e/ou seus bioprodutos, muitos estudos são realizados utilizando fontes alternativas de nutrientes como glicose (CHEN & ZHANG, 1997), melão (ANDRADE & COSTA, 2007), uréia (SOLETTI et al., 2005; COSTA et al., 2004; DANESI et al., 2002), entre outros.

Cyanobium e *Chlorella*, assim como outras microalgas, necessitam de fontes de carbono, nitrogênio, fósforo e de outros micronutrientes. Estudos sobre a nutrição de microalgas permitem avaliar o papel dos vários elementos químicos no crescimento e na produtividade do fitoplâncton. São de fundamental importância para a viabilização dos cultivos das algas, pois definem os componentes que devem ser acrescentados em maior

ou menor quantidade nos meios de cultura para proporcionar melhor desenvolvimento das espécies (LOURENÇO, 2006).

4.3.1 Fontes de carbono

O dióxido de carbono é a fonte de carbono para o crescimento fotossintético e autotrófico de algas. O carbono é o elemento necessário em maiores concentrações para algas. Sua elevada demanda decorre do fato de que o carbono constitui-se no componente mais importante de todas as substâncias orgânicas sintetizadas pelas células (LOURENÇO, 2006). O ar atmosférico contém somente 0,038% de CO_2 , sendo necessária a adição de CO_2 ao cultivo. Porém, algumas microalgas podem crescer sem um enriquecimento com dióxido de carbono, pois para seu crescimento requerem alta alcalinidade, o que se consegue com a presença de elevadas concentrações de carbonatos (RICHMOND, 1990).

A principal espécie química é o íon bicarbonato que entra na célula por transporte ativo e posteriormente a enzima anidrase carbônica presente no meio intracelular e/ou na membrana periplasmática age sobre o bicarbonato liberando o CO_2 . Este é incorporado no ciclo de Calvin produzindo moléculas orgânicas, tais como carboidratos, proteínas e lipídios (KAPLAN & REINHOLD, 1999). Segundo KOTZABASIS et al. (1999) o metanol é uma fonte de carbono alternativa, que se adicionada aos cultivos em pequenas concentrações pode aumentar a velocidade de crescimento sem provocar efeitos tóxicos. Em lagos naturais as fontes de carbono utilizadas pelas microalgas são CO_2 atmosférico ou carbonatos (VONSHAK, 1997).

Todas as microalgas crescem quimio ou fototroficamente utilizando CO_2 dissolvido ou uma de suas formas hidratadas para a síntese de compostos orgânicos. O CO_2 reage com a água formando ácido carbônico (H_2CO_3). Este ácido carbônico é dissociado em bicarbonato (HCO_3^-) e íons H^+ , e o bicarbonato pode ser dissociado em CO_2 ou íons carbonato (CO_3^{2-}) dependendo do pH do meio de cultivo. Todas essas reações são rápidas, e como as microalgas retiram CO_2 da solução ela forma íons OH^- e isto eleva o pH do meio (FOX, 1996).

4.3.2 Fontes de nitrogênio

Depois do carbono, o nitrogênio é quantitativamente o elemento mais importante contribuindo com a massa seca das células. A proporção de nitrogênio pode variar de 1 a 10% em peso seco. Uma grande variedade de compostos nitrogenados, orgânicos e inorgânicos, pode ser utilizada como fonte de nitrogênio para o cultivo de microalgas devido à grande habilidade que estas possuem para utilizar nitrato, nitrito ou amônia. Quando

amônia é utilizada como única fonte de nitrogênio o pH do meio pode diminuir causando efeitos indesejáveis, sendo algumas espécies de microalgas sensíveis à concentração de 1mM devido a um aumento interno do pH pela penetração das moléculas de hidróxido de amônio não dissociadas na célula. Nitrito pode ser utilizado como fonte de nitrogênio por muitas espécies de microalgas apenas em baixas concentrações, aproximadamente 1mM, enquanto altas concentrações inibem o crescimento (RICHMOND, 1990).

Segundo PIORRECK et al. (1984), o nitrogênio é conhecido por ter uma forte influência no metabolismo de lipídios e ácidos graxos em várias algas. A deficiência de nitrogênio leva a uma acumulação de lipídios. Recentes estudos envolvendo várias algas revelam que o metabolismo de ácidos graxos e lipídios é influenciado pelo conteúdo de nitrogênio do meio. Foi observado que a baixos níveis de nitrogênio essas algas tem uma tendência a sintetizar lipídios neutros e ácidos graxos com um baixo grau de insaturação. Já em altos níveis de nitrogênio as algas sintetizam predominantemente lipídios polares como os monogalactosil diacilglicerol, diagalactosil diacilglicerol entre outros. Em seus estudos, PIORRECK et al. (1984) constataram que a baixas concentrações de nitrogênio, todas as algas verdes contêm relativamente grandes quantidades de lipídios totais (44-66% do peso seco). Essas quantidades diminuem significativamente com o aumento da concentração de nitrogênio.

A fonte de nitrogênio, independente de qual seja, é incorporada como nitrogênio orgânico, na síntese de proteínas. Desta forma, a diminuição desta fonte acarretaria na diminuição da síntese de aminoácidos e, conseqüentemente, do teor protéico (REINEHR, 2003). COLLA et al., (2007a) avaliaram a influência da concentração da fonte de nitrogênio no cultivo de *Spirulina* e verificaram que a concentração inicial de nitrogênio não influenciou na concentração de lipídios e proteínas na biomassa.

4.3.3 Fonte de sódio e potássio

Sódio é requerido por algumas algas, entretanto não é necessário a outras. O requerimento de sódio para microalgas marinhas, geralmente excede aquele necessário para espécies de água doce. Este macronutriente que promove o crescimento autotrófico é requerido pela microalga *Ctenocladus circinnalis* halofílica, e é provavelmente necessário a todas as algas marinhas halofílicas, devido a razões de ordem osmótica. O sódio é um ativador de várias enzimas e repõe potássio em algas com carência deste nutriente (RICHMOND, 1990).

Com relação ao potássio, este é um cofator para uma grande variedade de enzimas e é provavelmente requerido por todas as espécies de algas. Nas bactérias,

potássio está envolvido na estrutura ribossômica, síntese de proteínas e regulação osmótica e possui função similar nas algas (RICHMOND, 1990).

Os cloretos estão associados com a regulação de K^+ e Na^+ . Modelos têm sido propostos para a assimilação de K^+ , Na^+ e Cl^- . O mecanismo que governa estas assimilações está interligado com a bomba de sódio e potássio, correlacionada com a fosforilação cíclica (RICHMOND, 1990).

A imediata inibição do sistema fotossintético e respiratório após a exposição a um estresse salino foi explicada por EHRENFELD & COUSIN (1984), citados por VONSHAK (1997). Estes autores mostraram que um acréscimo da concentração celular de sódio ocasiona um aumento da permeabilidade da membrana plasmática durante os primeiros instantes de exposição a altas concentrações salinas. É suposto que a inibição da fotossíntese provém da rápida entrada de sódio, que pode resultar na separação dos ficobilissomas da membrana tilacóide.

4.3.4 Fonte de fósforo e enxofre

O fósforo é um nutriente essencial para o crescimento de algas, pois participa na transferência de energia intracelular, síntese de ácidos nucléicos e reações especiais associadas com divisão celular. Este nutriente geralmente é limitado para o crescimento de algas na natureza. O consumo e o metabolismo de fósforo tem sido intensivamente estudado em cultivos de algas crescendo sob condições limitadas e em excesso (RICHMOND, 1990).

A concentração de fosfatos orgânicos em águas naturais geralmente excede a de fosfato inorgânico, que é a principal forma das células de microalgas adquirir fósforo. Fosfato orgânico é utilizado como fonte primária de fósforo, o qual é hidrolisado por enzimas extracelulares como fosfoesterases ou fosfatases, resultando em fósforo inorgânico. Os requerimentos de fósforo para um ótimo crescimento diferem consideravelmente entre espécies, até mesmo não existindo fator externo limitante (RICHMOND, 1990).

Enxofre é essencial a todos os organismos na formação de aminoácidos metionina, cistina, cisteína, biotina, ácido pantotênico, tiamina, entre outros. A grande maioria das algas obtém o enxofre a partir de sulfato inorgânico (RICHMOND, 1990).

4.3.5 Fonte de outros metais

Diversos metais são também necessários para o desenvolvimento de algumas espécies de microalgas. O principal papel de alguns metais, é participar da estrutura e da

atividade de diversas enzimas. Tais enzimas são envolvidas em diferentes vias metabólicas das algas, conseqüentemente, são identificados papéis diferenciados para cada metal. Outra função desses metais, é a participação na estruturação de certas organelas celulares, como os ribossomos.

O magnésio possui muitas funções de grande importância para o metabolismo celular. Provavelmente a maior porção de magnésio na grande maioria das células está envolvida na agregação de ribossomos no interior de unidades funcionais. A função do magnésio nas reações envolve a transferência de grupos fosfato, sendo também componente do pigmento clorofila, além de ser necessário para ativar enzimas específicas, como a ATPase presente nas membranas tilacóides (VONSHAK, 1997; RICHMOND, 1990).

O manganês é um componente estrutural dos tilacóides dos cloroplastos e funciona como um cofator de enzimas que participam da síntese de ácidos graxos. É fundamental para o transporte de elétrons no fotossistema II, é o cofator de várias enzimas que participam do ciclo de Krebs, atua na manutenção da estrutura das membranas dos cloroplastos (LOURENÇO, 2006).

O ferro é extremamente importante para as algas por participar de inúmeras funções, como vias biossintéticas da clorofila e dos citocromos; transporte respiratório dos elétrons; transporte fotossintético de nitrogênio, além de ser cofator de diversas enzimas (BAKKER et al., 2005).

O molibdênio é essencial para plantas verdes e também para algas. Sua principal função é associada ao metabolismo do nitrogênio, pois é constituinte de uma das principais enzimas das algas e plantas, a nitrato redutase, responsável pela redução do nitrato a nitrito, primeira etapa da assimilação de nitrato, a forma mais estável de nitrogênio na água do mar. O molibdênio é também cofator de enzimas que participam da respiração e fotossíntese, bem como da nitrogenase, que realiza a fixação de N_2 em cianobactérias (SUNDA et al., 2005).

O cobalto é um componente fundamental da vitamina B_{12} , a cianocobalamina, uma das três vitaminas mais importantes para o desenvolvimento de algas em geral. O cobalto participa dos processos de fixação de nitrogênio pela célula, estando, portanto, associado ao metabolismo do nitrogênio (LOURENÇO, 2006).

O cobre é um constituinte fundamental de coenzimas que participam do transporte de elétrons na fotossíntese, como a citocromo oxidase, sendo, portanto, necessário para a aquisição de energia por algas. Além disso, o cobre faz parte da

composição da plastocianina na fotossíntese, que pode substituir a proteína dotada de ferro em algumas espécies de algas (SUNDA et al., 2005).

4.4 Condições de Cultivo de Microalgas

No cultivo de microalgas, o conhecimento da fisiologia das mesmas é muito importante para obtenção das melhores condições de cultivo no que diz respeito a pH, temperatura, nutrientes, entre outros. As condições de cultivo influenciam consideravelmente na composição das microalgas, sendo importante seu estudo, a fim de que se obtenham máximas quantidades dos subprodutos para os quais o cultivo tem finalidade.

4.4.1 Efeito da Temperatura no Cultivo de Microalgas

A temperatura é um dos fatores que mais afetam a taxa metabólica dos organismos. A temperatura do ambiente deve ser escolhida em função das necessidades das espécies presentes e da finalidade dos cultivos (LOURENÇO, 2006). O efeito da temperatura no crescimento da biomassa e atividade celular é explicado basicamente em termos de dois fatores. Um relacionando a temperatura e a dependência dos componentes estruturais da célula, especialmente proteínas e lipídios, e outro relacionado aos coeficientes de taxa de reação, dependentes da energia de ativação. A dependência dos componentes estruturais à temperatura tem efeito secundário no metabolismo regulador, especificidade das reações enzimáticas, permeabilidade celular e composição celular (VONSHAK, 1997).

A temperatura apresenta grande influência na produção de biomassa, proteínas, lipídios e compostos fenólicos a partir de microalgas (COLLA et al., 2002). A taxa de crescimento da microalga *Spirulina* a 18°C é somente 46% da taxa de crescimento a 20°C, já a temperaturas entre 22 – 32°C a taxa de crescimento dobra, permanecendo a mesma até 40°C, entretanto acima desta temperatura ela diminui drasticamente. A temperatura ótima para o crescimento de *Chlorella* está na faixa de 35 a 37°C (LOURENÇO, 2006) e este valor pode variar entre diferentes cepas. Certos tipos de microalgas são tolerantes a temperaturas muito elevadas, como a *Chlorella*, que continua se desenvolvendo a temperaturas em torno de 42°C (SAKAI et al., 1995).

COSTA et al. (2006) verificaram que as concentrações máximas de biomassa de *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima*, além de maior conteúdo de lipídios, foram obtidos quando estas foram cultivadas a 35°C. COLLA et al. (2007b) verificaram que cultivos de *S. platensis* realizados a 35°C apresentaram efeito negativo nos parâmetros cinéticos de

crescimento da microalga, porém, foram obtidas maiores concentrações de lipídios e proteínas em relação a cultivos realizados a 30°C.

Segundo VONSHAK (1997), em baixas temperaturas ocorre um decréscimo da atividade fotossintética nas células de microalga *Spirulina*, que alcança ótimo em 35°C, acima deste valor a concentração de pigmentos fotossintéticos e de proteínas em geral decresce enquanto aumentam as concentrações de carboidratos e lipídios (TOMASELLI et al., 1993). O efeito mais pronunciado da temperatura no metabolismo da célula é sua influência na respiração durante a fase escura da fotossíntese. Nesta fase, a taxa de respiração, particularmente em microalgas, aumenta exponencialmente com a temperatura. O aumento da taxa respiratória, principalmente quando a temperatura à noite é elevada, faz com que o fenômeno de perda noturna de biomassa diminua a produtividade do cultivo (RICHMOND et al., 1986).

Dependendo da fase de crescimento, das temperaturas do dia e da noite, bem como as intensidades luminosas durante o dia, o decréscimo na concentração de biomassa total durante a noite pode ser superior a 17%. Em estudos realizados por OGBONNA & TANAKA (2000), 35% da biomassa produzida durante o dia pode ser perdida durante a noite através da respiração. Os métodos utilizados para minimizar estas perdas são redução da temperatura e controle da agitação do cultivo durante a noite (OGBONNA & TANAKA, 1998).

4.4.2 Efeito da Luminosidade no Cultivo de Microalgas

A luz é um dos fatores mais importante que afeta os organismos fotossintéticos. Assim como muitas outras microalgas, a *Chlorella* e *Cyanobium* como também outras microalgas fotoautotróficas, dependem da luz como a principal fonte de energia. A limitação do crescimento em culturas densas pode ocorrer devido ao sombreamento provocado pelas próprias células a medida que há o crescimento, impedindo que parte da cultura receba luz. A perda de luz devido à densidade dos cultivos pode causar um aumento no conteúdo de pigmentos (FÁBREGAS et al., 2001a).

A luminosidade está relacionada à atividade fotossintética e exerce pouca influência no metabolismo respiratório, envolvendo a via glicolítica, o ciclo de Krebs e a fosforilação oxidativa mitocondrial (CHANG & YANG, 2003). A fixação de carbono também é afetada pela luminosidade, uma vez que muitas enzimas são ativadas pela luz. É importante lembrar que dependendo da espécie de microalga que está sendo trabalhada podemos ter respostas diferentes para a mesma qualidade e intensidade de luz e fotoperíodo.

De acordo com a intensidade e qualidade da fonte luminosa, o conteúdo de pigmentos das microalgas pode sofrer variações. Segundo GOODWIN, (1980); SIEFERMANN, (1980) e KRINSKY, (1979) o aumento de carotenóides está relacionado a uma adaptação necessária da célula a fim de proteger as moléculas de clorofila. Esses autores também estudaram a influência da qualidade de luz na produtividade de carotenóides, submetendo as células à luz branca, vermelha e azul, observando que o nível de pigmentação em duas qualidades de luz, branca e vermelha, apresentaram-se diferentes para cada cepa estudada.

A exposição de cultivos a intensidade luminosa superior ao ponto de saturação pode levar a fotoinibição. A fotoinibição é a diminuição da capacidade fotossintética devido aos danos causados por intensidades luminosas acima da requerida para a realização da fotossíntese (VONSHAK, 1997).

A fotolimitação é um dos principais problemas no cultivo de microalgas, que ocorre devido ao sombreamento que as células da superfície causam nas células em maiores profundidades no interior de meio de cultivo (MOHANTY et al., 1997). VONSHAK et al. (1982) encontraram 0,40 – 0,50 g.L⁻¹ como ótima concentração celular para a máxima eficiência fotossintética em cultivos de *Spirulina*, e nesta concentração é estimado que a 2 – 3 cm da superfície cerca de 80% das células seja exposta a escuridão completa durante alguns instantes.

Muitos sistemas de cultivo de microalgas são planejados para utilizar a luz natural. A principal vantagem deste método é o decréscimo no custo de produção, no entanto, inconvenientes como a variação do fotoperíodo, da intensidade luminosa e, também, variações ambientais fazem com que os cultivos que utilizam luz natural não sejam estáveis (POLI et al., 2004).

4.5 Agitação no Cultivo de Microalgas

A agitação nas culturas de microalgas está relacionada a uma série de fatores influentes no crescimento celular. A agitação deve evitar a formação de aglomerados celulares, garantindo incidência luminosa suficiente às células (OGBONNA et al., 1998; GRIMA et al., 1996), favorecer a captação de CO₂ da atmosfera e a liberação de O₂ do interior do meio líquido e diminuir os gradientes gasosos e de nutrientes no meio (JIMÉNEZ et al., 2003).

O estresse hidrodinâmico causado por excesso de agitação em certas culturas de microalgas pode provocar a quebra das células, com redução em seu tamanho,

interferindo na colheita da microalga por filtração (CAMACHO et al., 2001; VONSHAK, et al., 1982).

A exposição das células aos ciclos claro/escuro no interior do fotobiorreator é um fator favorável ao crescimento (JANSSEN et al., 2001; MITSUHASHI et al., 1994), uma vez que manter as células iluminadas constantemente é difícil devido à pequena altura contemplada pela adequada luminosidade (VONSHAK et al., 1982). O ciclo claro/escuro no interior da cultura depende da intensidade da luz, da altura do meio líquido, da agitação e da densidade celular. A agitação insuficiente pode obrigar certas células a um regime de baixa incidência luminosa e até de escuridão, prejudicando seu crescimento (HOSAKA et al., 1995).

A agitação exerce efeito no fenômeno chamado “sombreamento”, onde apenas parte das células recebe luminosidade suficiente para realização da fotossíntese, enquanto o restante fica na camada menos iluminada devido ao aumento da concentração celular no fotobiorreator. Em fotobiorreatores do tipo tanque aberto utilizados no cultivo de *Chlorella*, mantidos em níveis ótimos de densidade populacional, aproximadamente 85% das células não recebem radiação suficiente para realizar a fotossíntese (RICHMOND, 1990). Neste sentido fica subentendido que o efeito da agitação aumenta sua significância com o aumento da densidade populacional. Desta maneira, o efeito da turbulência causa uma melhor distribuição da radiação luminosa na cultura, com conseqüente aumento na eficiência da fotossíntese. Vários sistemas têm sido projetados para promover agitação no cultivo de microalgas, incluindo agitadores do tipo roda-de-moinho, airlifts (LAWS et al., 1983), bomba de recirculação (ROUBICEK et al., 1985) entre outros.

4.6 Fotobiorreatores para Cultivo de Microalgas

O sucesso para a produção de microalgas em grande escala depende de muitos fatores, sendo o principal, o desenvolvimento de sistemas de cultivo economicamente viáveis. Os fotobiorreatores utilizados podem ser classificados em abertos e fechados. Nos sistemas abertos, a temperatura é o principal fator limitante, assim como variações sazonais de radiação solar que levam a obtenção de baixas concentrações de biomassa. Entretanto, os sistemas abertos são mais utilizados atualmente devido a sua viabilidade econômica e facilidade de escoamento. Os sistemas fechados, por sua vez estão sendo utilizados em escala piloto por apresentarem problemas de viabilidade econômica em seus projetos. Além disso, sua utilização está voltada para espécies de microalgas que não se desenvolvem em meios altamente seletivos evitando a contaminação dos cultivos (BOROWITZKA, 1999).

O tipo de fotobiorreator empregado no cultivo de microalgas está relacionado a uma série de variáveis com influência no crescimento celular. Entre elas, a contaminação das culturas, a evaporação de água do meio, gradientes de intensidade luminosa no interior do meio líquido, níveis e variações de temperatura, intensidade luminosa e dos ciclos claro-escuro (RORRER & CHENEY, 2004).

Alguns critérios devem ser considerados no desenho de um fotobiorreator com o objetivo de obter elevadas produtividades e eficiências fotossintéticas. Os principais aspectos incluem a relação superfície volume do fotobiorreator, inclinação, sistema de mistura, prevenção de crescimento das microalgas nas paredes, controle de temperatura e tipo de material empregado na construção dos fotobiorreatores (MOLINA et al., 2004).

Os sistemas abertos podem ser divididos em águas naturais (lagos, lagoas) ou tanques artificiais. Geralmente os fotobiorreatores utilizados para o cultivo comercial de microalgas, como *Chlorella* e *Spirulina* em grande escala são abertos. Estes fotobiorreatores podem apresentar zonas de estagnação da cultura, onde as células não recebem luz, afetando o processo fotossintético e baixando a absorção de CO₂, bem como o crescimento celular (PULZ, 2001).

Um dos principais problemas dos sistemas abertos tipo tanques é que as produtividades obtidas são menores que as teoricamente possíveis, devido à dificuldade de controle dos parâmetros ambientais de cultivo. Até recentemente os sistemas abertos eram considerados os mais utilizados para cultivo de microalgas, entretanto a preparação de produtos com alto valor agregado como fármacos e cosméticos foram as bases para a adoção de sistemas fechados, os quais possibilitam maior reprodutividade (JIMÉNEZ et al., 2003; OGBONNA & TANAKA, 2000).

Os fotobiorreatores fechados têm sido testados para cultivo de biomassa microalgal nas seguintes configurações: sistemas tubulares verticais, horizontais e placas paralelas os quais apresentam apropriada distribuição de luz (PULZ, 2001). Os fotobiorreatores tubulares verticais proporcionam maior contato entre a luz e o cultivo, fácil transferência de dióxido de carbono às microalgas e ocupam menor área que o *raceway* (MORAIS & COSTA, 2008c; ONO & CUELLO, 2004; MORAIS & COSTA, 2007a).

Fotobiorreatores fechados, como os tubulares (MORAIS & COSTA, 2007a; TRAVIESO et al., 2001) reduzem os problemas de contaminação das culturas e evaporação de água do meio, além de facilitar a instalação de controle de temperatura. Apresentam, porém como inconveniente, a dificuldade de liberação de O₂ dissolvido, que em

concentrações de 30 mg.L^{-1} exerce um efeito prejudicial ao crescimento e sobre a síntese de proteínas (TORZILLO, 1997).

A microalga *Chlorella* é produzida em grande escala na Ásia (Japão, Taiwan, China) em tanques tipo *raceway* ou circular, na República Checa e Bulgária, em fotobiorreatores com superfície inclinada, e mais recentemente em fotobiorreatores tubulares na Alemanha (PULZ, 2001). Em termos de produção global a *Spirulina* é a microalga mais importante e produzida exclusivamente em sistemas abertos. Até 1995 a produção de *Spirulina* foi realizada no Lago Texcoco no México, nos Estados Unidos (Hawaii, Califórnia), China, Taiwan e Japão esta microalga é produzida em tanques tipo *raceway*. A Tabela 1 apresenta a comparação de cultivos realizados em fotobiorreatores tipo *raceway* e tubular.

Tabela 1 Comparação entre cultivos realizados em fotobiorreatores tipo *raceway* e tubular.

Condição	<i>Raceway</i>	Tubular
Área de contato com a luz (m^2)	500	600
Volume total (m^3)	75	7
Área requerida (m^2)	550	110
Concentração de biomassa (g.L^{-1})	0,3 – 0,5	5 – 8
Produtividade ($\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)	0,05 – 0,1	0,8 – 1,2

Fonte: PULZ, 2001.

No Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande foram estudados diferentes tipos de fotobiorreatores (Figura 3) no cultivo de microalgas (MORAIS & COSTA, 2008c; MORAIS & COSTA, 2007a; COLLA et al., 2007; RADMANN et al., 2007; COSTA et al., 2006; ANDRADE, 2005; COLLA et al., 2004; REINEHR, 2003; COSTA et al., 2002; DUARTE FILHO, 2002; COSTA et al., 2001; SANTOS, 2001; COSTA et al., 2000; COZZA, 1999; WEBER et al., 1999).

As Figuras 3a e 3b mostram os fotobiorreatores fechados tipo erlenmeyer e tubular vertical de 2 L, com volume útil 1,8 L, respectivamente, utilizados em escala laboratorial, juntamente com os fotobiorreatores abertos tipo *raceway* de 6 L, com volume útil de 5 L, representados pela Figura 3c. As figuras 3d, 3e e 3f mostram os fotobiorreatores

abertos tipo raceway de 0,6 m³, 12 m³ e 15 m³, respectivamente. Cada fotobiorreator foi projetado com uma profundidade de aproximadamente 0,4 m e a agitação dos cultivos é realizada por pás rotativas a 15 rpm. O fotobiorreator representado pela Figura 3d está localizado no próprio laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG, para testes e cultivos em menor escala. O fotobiorreator da Figura 3e está localizado no município de Santa Vitória do Palmar, nas proximidades da Lagoa Mangueira, onde é utilizado para cultivo da microalga *Spirulina*. A Figura 3f mostra os fotobiorreatores projetados para cultivo de microalgas, cujo objetivo é a biofixação do CO₂ proveniente da queima de carvão mineral.

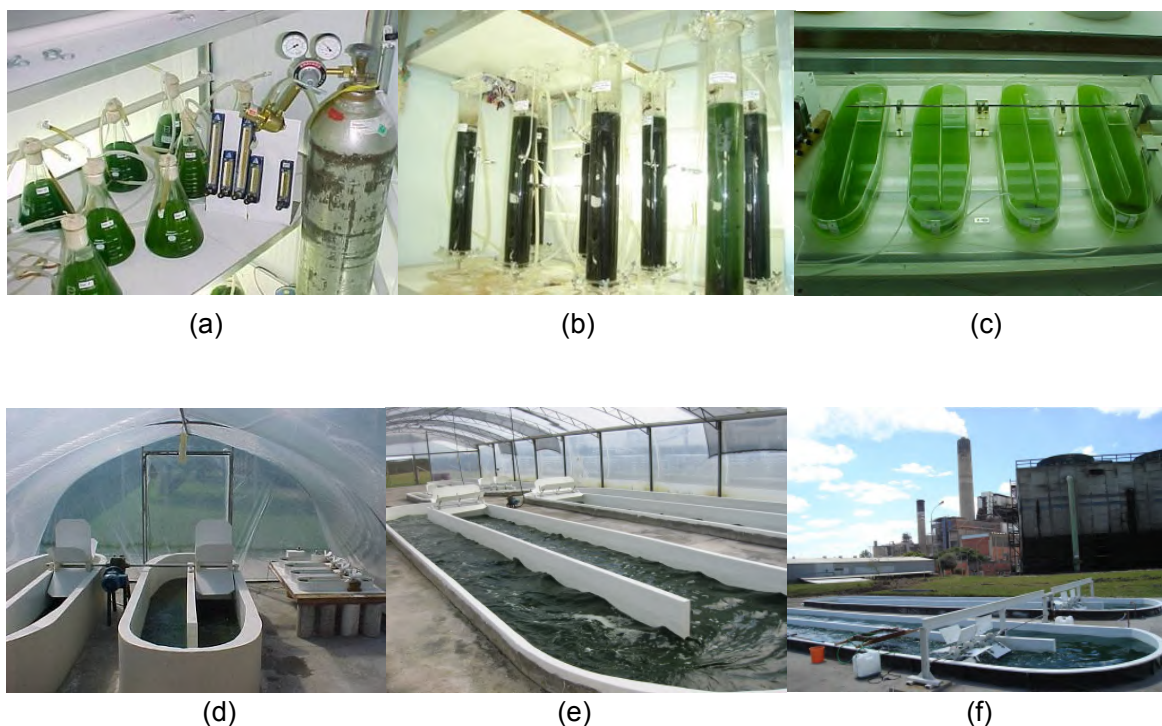


Figura 3 Diferentes tipos de fotobiorreatores: (a) erlenmeyer fechado de 2 L; (b) tubular vertical fechado de 2 L; (c) *raceway* aberto de 6 L; (d) *raceway* aberto de 0,6 m³; (e) *raceway* aberto de 12 m³; (f) *raceway* aberto de 15 m³.

FONTE: Laboratório de Engenharia Bioquímica – FURG

4.7 Modo de Cultivo de Microalgas

A parte central de um processo biotecnológico é o crescimento do microrganismo em condições ambientais que estimulem a síntese do produto que se deseja obter. Esses processos podem ser divididos de diversas maneiras, destacando-se a

classificação quanto à condução do cultivo, que se diferencia em descontínuo (batelada), batelada alimentada, semicontínuo e contínuo (BORZANI et al., 2001; TREVAN et al., 1990).

O processo descontínuo, também conhecido como batelada, consta da adição de nutrientes (meio de cultivo) juntamente com o inóculo. Neste processo, após um determinado tempo de reação, ocorre a retirada do produto, tempo este que irá depender da cinética desse tipo de reação. Apesar de ser muito utilizado, este processo não permite ao microrganismo condições ótimas de crescimento, devido à depleção do substrato, pois dependendo do tempo de cultivo, alguns nutrientes serão totalmente consumidos antes do término do cultivo. O processo em batelada alimentada consiste da adição contínua de substrato ao longo do cultivo, eliminando o fenômeno de depleção pelos nutrientes e permitindo um aumento no período produtivo do processo. Já o processo contínuo consiste na adição contínua de substrato, havendo também retirada do produto na mesma vazão de alimentação. O cultivo contínuo tem como principal vantagem a redução dos tempos não produtivos, além da possibilidade do microrganismo sofrer mutações genéticas (BORZANI et al., 2001; TREVAN et al., 1990).

Os cultivos semicontínuos propiciam grande produção de células por intervalo de tempo. Nesse sistema, o fotobiorreator é carregado no início do cultivo com o meio e o inóculo, sendo então incubado nas condições ótimas. Uma parcela do meio de cultivo com as algas é removida e substituída por meio de cultura novo, sem células. Isso pode ser feito a qualquer momento durante o desenvolvimento do cultivo, porém, geralmente é feito após alguns dias de crescimento, quando já se formou uma biomassa relativamente grande (LOURENÇO, 2006). Essa operação, também chamada de corte, deve ser realizada sempre que o cultivo atingir este estágio. A concentração do microrganismo (ou do composto químico em questão) na qual é realizado o corte é chamada de concentração celular de corte, e a fração de meio de cultivo retirada com posterior adição de meio novo é chamada de taxa de renovação de meio. Com esse procedimento consegue-se obter produto com o mesmo inóculo por um tempo bem maior. Além disso, não há os estágios de preparação de inóculo nem limpeza dos tanques entre um ciclo e outro. O corte deve ser feito quando o microrganismo está na fase de crescimento exponencial, para não haver fase de adaptação, conseguindo-se assim um processo quase contínuo de produção de biomassa (BORZANI et al., 2001).

Nos cultivos semicontínuos não há número preestabelecido de coletas, de forma que a remoção de cultivo e a substituição por meio de cultura novo podem ser realizadas, em tese, sem limite. Esse procedimento acarreta curvas de crescimento com variações bruscas de densidade de células. Microalgas podem fornecer biomassa útil em poucos dias

após o início do cultivo. Essas características vêm estimulando grandes investidores a criar fazendas de produção de microalgas de grande porte, como as existentes para cultivar cianobactérias do gênero *Arthrospira* ou algas verdes *Dunaliella* e *Chlorella* (LOURENÇO, 2006).

5 DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

De acordo com os objetivos do presente trabalho foi estabelecida uma estratégia de ação para o desenvolvimento das atividades experimentais. O foco deste estudo foi direcionado para o cultivo semicontínuo das microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp., assim como para verificar o melhor meio de cultivo e agitação para as microalgas cultivadas.

Neste sentido, para um melhor entendimento, o trabalho foi dividido em 3 artigos, o primeiro artigo é intitulado **CULTIVO DAS MICROALGAS *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp. EM DIFERENTES CONDIÇÕES NUTRICIONAIS E DE PROCESSO**, onde realizou-se o cultivo das microalgas em diferentes meios de cultura padrão (ASM, BG11, H/2, MBM e MC) e suplementados com adição de 0,4 g.L⁻¹ de bicarbonato de sódio. Também foram avaliados os efeitos das diferentes formas de agitações (bombas submersas, pás rotativas, aeração passando por cortina e pedra porosa). O segundo artigo é intitulado **FOTOBIOREATOR TUBULAR VERTICAL PARA CULTIVO DE MICROALGA EM MODO SEMICONTÍNUO**, onde o objetivo foi determinar as características cinéticas do cultivo da microalga *Cyanobium* sp. em modo semicontínuo, variando a concentração celular de corte, taxa de renovação de meio e concentração de bicarbonato de sódio em três níveis (0,8, 1,0 e 1,2 g.L⁻¹), (30, 40 e 50%) e (0,4, 1,0 e 1,6 g.L⁻¹), respectivamente, e o terceiro artigo é intitulado **CULTIVO SEMICONTÍNUO DA MICROALGA *Chlorella* sp. EM FOTOBIOREATOR ABERTO**, onde foi estudado a influência das diferentes concentrações celulares de corte (0,4, 0,6 e 0,8 g.L⁻¹), taxas de renovação de meio (30, 40 e 50%) e concentrações de bicarbonato de sódio (0,4, 1,0 e 1,6 g.L⁻¹) na velocidade específica de crescimento e produtividade da biomassa.

5.1 ARTIGO 1

**CULTIVO DAS MICROALGAS *Cyanobium* sp. E *Chlorella* sp. EM DIFERENTES
CONDIÇÕES NUTRICIONAIS E DE PROCESSO**

CULTIVO DAS MICROALGAS *Cyanobium* sp. E *Chlorella* sp. EM DIFERENTES CONDIÇÕES NUTRICIONAIS E DE PROCESSO

RESUMO

A composição das microalgas é influenciada pelas condições físico-químicas do meio de cultivo e do ambiente em que são cultivadas, podendo ter sua composição manipulada de modo a produzir compostos de interesse. O objetivo do presente trabalho foi estudar o crescimento das microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp. em diferentes meios de cultivo e configurações de agitação. Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores tipo erlenmeyer e *raceway* de 0,5 L e 5 L, respectivamente, durante 10 d a 30°C, 3200 Lux e fotoperíodo 12 h claro/escuro. As máximas concentrações celulares (0,56 e 0,66 g.L⁻¹), velocidades específicas de crescimento (0,303 e 0,166 d⁻¹) e produtividades (0,120 e 0,089 g.L⁻¹.d⁻¹), foram observadas nos cultivos com meio BG11 e adição de NaHCO₃, para as microalgas *Cyanobium* e *Chlorella*, respectivamente. As melhores respostas para diferentes agitações e aerações, foram obtidas nos ensaios realizados com agitação por 2 bombas submersas, com concentrações máximas de biomassa 1,21 g.L⁻¹ para *Cyanobium* sp. e 0,93 g.L⁻¹ para a microalga *Chlorella* sp.

PALAVRAS-CHAVE: fotobiorreatores; *Chlorella*; *Cyanobium*; microalgas.

ABSTRACT

Microalgae composition is influenced by the physical-chemical culture medium and environmental conditions, thus its composition can be manipulated in order to produce a compound of interest. The aim of the present work was to study the growth of microalgae *Cyanobium* sp. and *Chlorella* sp. in different culture medium and configurations of agitation. The cultures were carried out in 0,5 L and 6 L erlenmeyer and *raceway* type photobioreactors, respectively, during 10 d at 30°C, 3200 Lux and 12 h light/dark photoperiod. The maximum cell concentrations (0,56 and 0,66 g.L⁻¹), specific growth rate (0,303 and 0,166 d⁻¹) and productivity (0,120 and 0,089 g.L⁻¹.d⁻¹) had been observed in the culture with BG11 medium and NaHCO₃ addition, for the microalgae *Cyanobium* sp. and *Chlorella* sp., respectively. The best answers were obtained with agitation given by 2 submerged pumps, with maximum biomass concentrations 1,21 g.L⁻¹ for *Cyanobium* sp. and 0,93 g.L⁻¹ for *Chlorella* sp.

KEYWORDS: photobioreactors; *Chlorella*; *Cyanobium*; microalgae.

1 INTRODUÇÃO

As microalgas têm sido estudadas em pesquisas biotecnológicas devido a sua importância nutricional, econômica e ecológica (COSTA et al., 2006). A biomassa microalgal produzida pode ser explorada como fonte de biocompostos com alto valor nutricional e comercial, como proteínas, ácidos graxos, vitaminas, pigmentos, biocombustíveis, ou na formulação de alimentos e rações, contribuindo para minimizar problemas como a desnutrição humana (COSTA et al., 2003).

Os cultivos de microalgas apresentam custos relativamente baixos para a colheita e transporte, pequeno consumo de água e pode ser realizado em condições não adequadas para a produção de culturas convencionais, pois independem da qualidade do solo, podendo ser facilmente levados a novos locais. Podem ser extrapolados de pequena para grande escala e operacionalmente é possível a injeção direta do gás de combustão às culturas (ONO & CUELLO, 2004; BINAGHI et al., 2003; PIRT, 1986).

O aproveitamento da energia solar na fotossíntese pelas microalgas é de fundamental importância, diante de previsões pessimistas futuras sobre a disponibilidade de fontes energéticas. As microalgas utilizam a luz solar como principal fonte de energia, possuem alta produtividade, tolerância às alterações das condições ambientais, e podem ser cultivadas em áreas não apropriadas para agricultura (COSTA et al., 2000).

A luz é fundamental no cultivo de microalgas e está diretamente relacionada à densidade celular e a escolha do fotobiorreator. Geralmente os fotobiorreatores utilizados para o cultivo comercial de microalgas, como *Chlorella* em grande escala são abertos. Essa microalga também requer sistemas agitados para permitir altas velocidades de crescimento e minimizar o risco de contaminação por outras algas. Os problemas com sistemas abertos são que as produtividades apresentam-se geralmente menores que as teoricamente possíveis. A profundidade do fotobiorreator deve levar em conta a necessidade de prover luz eficientemente às células e a necessidade de manter uma coluna de líquido adequada para mistura e evitar grandes trocas iônicas devido à evaporação (BOROWITZKA, 1999). Em fotobiorreatores que não possuem agitação, o desenvolvimento da cultura é limitado pela luminosidade. Estes fotobiorreatores podem apresentar zonas de estagnação da cultura, onde as células não recebem luz, afetando o processo fotossintético, bem como o crescimento celular (PULZ, 2001).

Na produção de microalgas, após custos com mão-de-obra aparecem, em ordem decrescente, os nutrientes para o meio de cultivo. O meio de cultivo tem influência direta no crescimento celular, bem como na composição das microalgas (POWELL et al., 1965).

Cyanobium e *Chlorella*, assim como outras microalgas, necessitam de uma fonte de carbono, nitrogênio, fósforo e outros micronutrientes.

O objetivo do presente trabalho foi estudar o crescimento das microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp. em diferentes meios de cultivo e agitação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismos e Meios de Cultivo

As microalgas estudadas foram *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp. Os meios utilizados para o cultivo da microalga *Cyanobium* foram meio ASM (GORHAM et al., 1964), meio BG11 (RIPPKA et al., 1979), meio BG11 modificado com adição $0,4 \text{ g.L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$, meio H/2 (GUILLARD, 1975; GUILLARD & RYTHER, 1962) e meio H/2 modificado ($0,4 \text{ g.L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$). Para a microalga *Chlorella*, os meios utilizados no estudo foram meio BG11 (RIPPKA et al., 1979), meio BG11 modificado ($0,4 \text{ g.L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$), meio MBM (WATANABE, 1960), meio MBM modificado ($0,4 \text{ g.L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$), meio MC (WATANABE, 1960) e meio MC modificado ($0,4 \text{ g.L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$), meio H/2 (GUILLARD, 1975; GUILLARD & RYTHER, 1962) e meio H/2 modificado ($0,4 \text{ g.L}^{-1} \text{ NaHCO}_3$). Nos anexos 9.2.1 a 9.2.5 são apresentados os meios de cultivo com as respectivas composições.

Após determinado qual meio de cultivo apresentou os melhores resultados, as microalgas foram cultivadas em meio BG11 (RIPPKA et al., 1979) com adição $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ bicarbonato de sódio, em diferentes agitações.

2.2 Fotobiorreatores e agitações

Nos cultivos estudados os diferentes tipos de meios de cultura, as microalgas foram cultivadas em fotobiorreatores fechados tipo erlenmeyers de 0,5 L, com volume útil de 0,4 L e agitação contínua através de injeção de ar comprimido, equipados com retirada asséptica de amostra.

Para avaliar os diferentes métodos de agitação, as microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp. foram cultivadas em fotobiorreatores abertos do tipo *raceway* de 6 L, com volume útil de 5 L, e agitação contínua através de 8 diferentes métodos: pás rotativas a 15 rpm; pás rotativas e aeração com injeção de ar comprimido através de cortina porosa de 900 mm cada acopladas no fundo do fotobiorreator; pás rotativas e aeração com injeção de ar comprimido através de 3 pedras porosas alongadas de 150 mm cada; pás rotativas e aeração com injeção de ar comprimido através de pedras porosas cilíndricas de 30 mm cada; 2 bombas submersas com vazão de 60 L.h^{-1} cada, 1 bomba submersa com vazão de

60 L.h⁻¹, cortina porosa acoplada ao fotobiorreator com injeção de ar comprimido; 6 pedras porosas alongadas com aeração através de ar comprimido. A Figura 1 mostra os fotobiorreatores dos cultivos com as respectivas agitações e aerações.

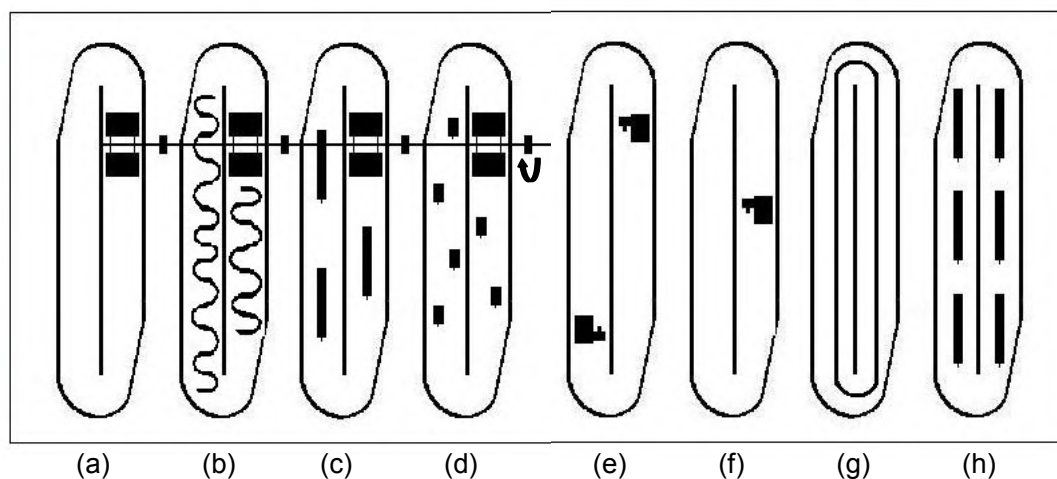


Figura 1 Desenho esquemático de cada fotobiorreator contendo 5 L de cultura, com as respectivas agitações, onde: (a) pás rotativas; (b) pás rotativas e cortina porosa; (c) pás rotativas e pedras porosas alongadas; (d) pás rotativas e pedras cilíndricas; (e) duas bombas submersas; (f) uma bomba submersa; (g) cortina porosa e (h) pedras porosas alongadas.

2.3 Condições de Cultivo

Os cultivos foram realizados em duplicatas, sob condições controladas em câmara termostatazada a 30°C, 3200 Lux e fotoperíodo 12 h claro/escuro, com iluminação provida por lâmpadas fluorescentes de 40 W (REICHERT et al., 2006) durante 10 d. As concentrações iniciais dos cultivos da *Cyanobium* sp. quando cultivada em diferentes meios de cultura e sob diferentes agitações foram 0,10 g.L⁻¹ e 0,35 g.L⁻¹, respectivamente. Para a microalga *Chlorella* sp., a concentração celular inicial foi 0,20 g.L⁻¹.

2.4 Determinações Analíticas

As amostras foram coletadas a cada 24 h para determinação da concentração de biomassa, calculada através da densidade óptica a 670 nm (COLLA et al., 2007a) em espectrofotômetro FEMTO modelo Plus 700 com curva de calibração relacionando densidade óptica e peso seco de biomassa para cada microalga (COSTA et al., 2006). Também foi realizada a medição do pH a cada 24 h através de pHmetro digital (Quimis Q400H, Brasil).

2.5 Respostas Estudadas

Os valores diários da concentração celular foram usados para calcular as velocidades específicas máximas de crescimento, concentração celular máxima e produtividades máximas de crescimento. A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, d^{-1}) foi calculada pela regressão exponencial da fase logarítmica da curva de crescimento celular. A concentração celular máxima ($X_{\text{máx}}$, g.L^{-1}) é o máximo valor de concentração obtido. A produtividade (P , $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) foi obtida segundo a equação $P = (X_1 - X_0)/(t - t_0)$, onde X_1 é a concentração celular (g.L^{-1}) no tempo t (d) e X_0 (g.L^{-1}) a concentração celular no tempo t_0 (d) (SCHMIDELL et al., 2001). $P_{\text{máx}}$ é o máximo valor de produtividade encontrado ao longo do cultivo (BAILEY & OLLIS, 1986).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 2 são mostradas as curvas de crescimento para as microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp. cultivadas em diferentes meios nutrientes. Para *Cyanobium* sp. a maior concentração celular foi obtida em meio de cultivo BG11 com adição $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio ($0,56 \text{ g.L}^{-1}$). Para *Chlorella* sp. as máximas concentrações celulares foram obtidas nos ensaios com meio BG11 com e sem bicarbonato de sódio, apresentando valores de $0,66 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,53 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Em todos os ensaios realizados observou-se ausência da fase de adaptação (lag) da curva de crescimento para as microalgas.

Os ensaios foram mantidos durante 10 d e a *Cyanobium* sp. apresentou crescimento celular durante 7 d de cultivo quando cultivada em meio BG11 com e sem adição de bicarbonato de sódio e H/2 com adição de bicarbonato. Quando cultivada com meio ASM, apresentou fase de crescimento até o 5º dia, após isso, apresentou morte celular. Para *Chlorella* sp. observou-se crescimento celular durante os 10 d de cultivo quando cultivada em meio BG11 com e sem adição de bicarbonato, e meio MBM com bicarbonato de sódio. Apenas o ensaio realizado com meio nutriente H/2 apresentou fase de morte celular após o 6º dia de cultivo.

A fonte de carbono é o elemento necessário em maiores concentrações para microalgas. Sua elevada demanda decorre do fato de que o carbono constitui-se no componente mais importante de todas as substâncias orgânicas sintetizadas pelas células (LOURENÇO, 2006). Do carbono inorgânico total dissolvido em culturas de microalgas o HCO_3^- é a espécie predominante, pois a concentração de HCO_3^- no meio de cultivo determina a taxa de formação de CO_2 . Se a concentração de HCO_3^- no meio é mínima, o crescimento da microalga é limitado pela falta do nutriente (RICHMOND, 1990). Os

resultados alcançados neste trabalho estão de acordo com LOURENÇO (2006) e RICHMOND (1990), pois nos cultivos com ambas espécies de microalgas a concentração celular foi incrementada quando, em todos os meios de cultivo foi adicionado bicarbonato de sódio como fonte de carbono. Segundo BENEMAN et al. (1997), uma alternativa para minimizar custos de produção, seria substituir a fonte de carbono do meio de cultivo por dióxido de carbono proveniente da queima de combustíveis fósseis, para o crescimento fotossintético e autotrófico das microalgas.

Os nutrientes presentes nos meios de cultura são de fundamental importância para a viabilização dos cultivos das microalgas, pois definem os componentes que devem ser acrescentados em maiores ou menores quantidades nos meios de cultura para proporcionar melhor desenvolvimento das espécies (LOURENÇO, 2006). Segundo HUANG et al., (2009), além dos elementos nutritivos tais como nitrogênio, fósforo, potássio e carbono, os microelementos também são importantes para o crescimento de microrganismos autotróficos e heterotróficos. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram influência da composição do meio de cultivo utilizado, concordando com LOURENÇO (2006) e HUANG (2009). Quando as microalgas *Cyanobium* e *Chlorella* foram cultivadas com meios ASM e H/2, respectivamente, ambas apresentaram crescimento celular até o 5º dia de cultivo, porém, a partir do 6º dia, começaram a entrar na fase de morte celular. Isto parece ter ocorrido porque os respectivos meios de cultivo são normalmente utilizados como meio de manutenção de inóculo, além disso, são adicionados pequenas quantidades de nutrientes (mL.L^{-1}) e não contém em sua composição NaHCO_3 , um dos principais nutrientes para o crescimento celular das microalgas.

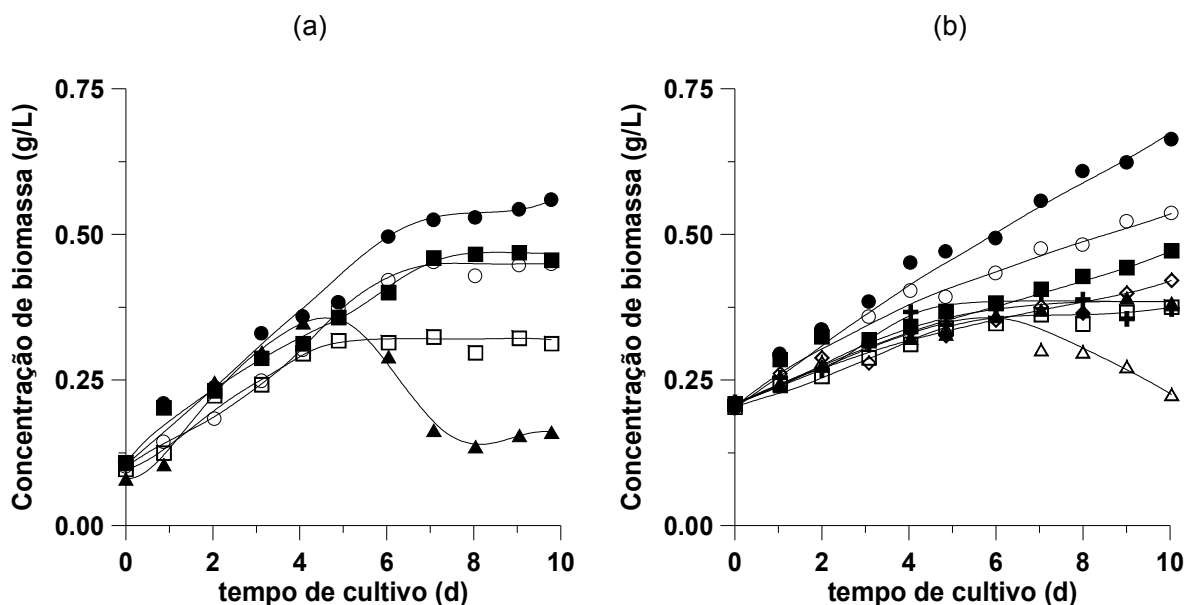


Figura 2 Curvas de crescimento dos ensaios realizados com diferentes meios de cultivos para (a) *Cyanobium* sp.: ASM (▲), BG11 (○), BG11 + NaHCO₃ (●), H/2 (□) e H/2 + NaHCO₃ (■); (b) *Chlorella* sp.: BG11 (○), BG11 + NaHCO₃ (●), H/2 (Δ), H/2 + NaHCO₃ (▲), MBM (□), MBM + NaHCO₃ (■), MC (+) e MC + NaHCO₃ (◇).

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e produtividade máxima ($P_{\text{máx}}$) determinada para as microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp. cultivadas em diferentes meios de cultivo são apresentadas na Tabela 1. As melhores velocidades específicas máximas de crescimento ($0,303$ e $0,166 \text{ d}^{-1}$) e produtividades máximas ($0,120$ e $0,089 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) para *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp., respectivamente, foram obtidas quando as microalgas foram cultivadas em meio BG11 com adição de bicarbonato de sódio. A *Cyanobium* foi inoculada com concentração inicial $0,10 \text{ g.L}^{-1}$, e a microalga *Chlorella* apresentou concentração celular inicial $0,20 \text{ g.L}^{-1}$, podendo-se observar que a produtividade e velocidade específica de crescimento foi reduzida com o aumento na concentração celular inicial. Manter altas produtividades com o aumento da concentração celular é importante do ponto de vista econômico e um desafio nos cultivos de microalgas, uma vez que o aumento da densidade celular prejudica a incidência luminosa e, em cultivos descontínuos, implica em queda na pressão osmótica do meio, devido ao consumo de nutrientes, ambos fatores com potencial efeito sobre as produtividades e velocidades de crescimento (VONSHAK et al., 1982).

Segundo KAPLAN et al., (1990), o nitrogênio é o segundo nutriente mais importante e varia de 1 a 10% na composição das microalgas, sendo que em baixas concentrações no meio de cultivo, favorece o acúmulo de lipídios e polissacarídeos nas

células. Quando o suprimento de nitrogênio é abundante em cultivos, verifica-se tendência de aumento nas concentrações de proteínas e clorofila nas células. Quando as concentrações de nitrogênio disponíveis para microalgas são baixas, verifica-se redução na taxa de crescimento celular (LOURENÇO et al., 2004). Os meios ASM, BG11, H/2, MBM e MC apresentam em sua composição $0,17 \text{ g.L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $1,5 \text{ g.L}^{-1} \text{ KNO}_3$; $0,075 \text{ g.L}^{-1} \text{ NaNO}_3$; $0,25 \text{ g.L}^{-1} \text{ KNO}_3$ e $1,25 \text{ g.L}^{-1} \text{ KNO}_3$, respectivamente. As maiores concentrações celulares foram obtidas quando utilizadas máximas quantidades de nitrato, conforme a composição dos meios utilizados. Esses valores estão concordantes com GROBBELAAR (2007), o qual relatou que os fatores mais importantes para obtenção de alta produtividade e concentração de biomassa é o conteúdo nutricional do meio de cultivo. O estudo da influência de parâmetros nutricionais para o crescimento de microalgas é de grande importância, uma vez que a utilização de determinados nutrientes no meio de cultivo pode ocasionar aumento de custos de produção e influenciar no crescimento e/ou composição da biomassa (SASSANO et al., 2007).

Na Figura 3 são mostradas as curvas de crescimento dos ensaios realizados com diferentes tipos de agitação. Nos cultivos com *Cyanobium* sp. (Figura 3a), apenas os ensaios realizados com bombas submersas não apresentaram fase de adaptação (lag), apresentando crescimento celular ao longo dos 10 d de cultivo. No ensaio realizado somente com agitação por pás rotativas o cultivo manteve-se constante, não apresentando crescimento nem declínio celular. Nos ensaios com pás rotativas e cortina porosa o cultivo apresentou declínio celular. A agitação insuficiente pode influenciar no desenvolvimento das células, levando-as a um regime de baixa incidência luminosa, prejudicando seu crescimento (HOSAKA et al., 1995). Os resultados encontrados no trabalho estão de acordo com HOSAKA et al. (1995), provavelmente devido à retenção da biomassa celular na cortina porosa, dificultando assim, a aeração e homogeneização da cultura, além das células não receberem iluminação suficiente para realizarem a fotossíntese.

Nos ensaios com a microalga *Cyanobium* sp. (Figura 3a) realizados somente com aeração e com pedras porosas alongadas, não apresentou declínio da concentração celular, porém, houve precipitação da biomassa no fotobiorreator retardando o crescimento. Os cultivos utilizando cortina porosa apresentaram crescimento celular alcançando $0,68 \text{ g.L}^{-1}$, entretanto também ocorreu precipitação da biomassa. Isto deve ter ocorrido devido a aeração ser insuficiente para que ocorra agitação constante das culturas. Esses dados estão de acordo com VONSHAK (1997), onde em alta luminosidade pode ocorrer o fenômeno da fotoinibição, que é a perda da capacidade fotossintética devido aos danos causados por intensidades luminosas acima da requerida para a realização da fotossíntese.

Segundo BOROWITZKA (1999), fotobiorreatores que não possuem agitação suficiente, o desenvolvimento da cultura é limitado pela luminosidade.

Tabela 1 Produtividade máxima ($P_{m\acute{a}x}$, $g.L^{-1}.d^{-1}$) e velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{m\acute{a}x}$, d^{-1}) para *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp. cultivadas em diferentes meios de cultivo.

Microalga	Meio de cultivo	$P_{m\acute{a}x}$	$\mu_{m\acute{a}x}$
<i>Cyanobium</i> sp.	ASM	0,081	0,225
	BG11	0,055	0,248
	BG11 + NaHCO ₃	0,120	0,303
	H/2	0,062	0,285
	H/2 + NaHCO ₃	0,108	0,183
<i>Chlorella</i> sp.	BG11	0,083	0,088
	BG11 + NaHCO ₃	0,089	0,166
	H/2	0,036	0,088
	H/2 + NaHCO ₃	0,034	0,087
	MBM	0,038	0,100
	MBM + NaHCO ₃	0,073	0,066
	MC	0,040	0,117
	MC + NaHCO ₃	0,050	0,079

Os cultivos com a *Cyanobium* realizados com 1 ou 2 bombas submersas apresentaram as maiores concentrações celulares, alcançando 1,12 e 1,21 $g.L^{-1}$, respectivamente. As máximas velocidades específicas de crescimento (0,176 e 0,183 d^{-1}) para *Cyanobium* sp. foram obtidas quando cultivada com 1 e 2 bombas submersas, respectivamente. A maior produtividade (0,113 $g.L^{-1}.d^{-1}$) foi observada quando cultivada com apenas 1 bomba submersa. A agitação nas culturas de microalgas está relacionada a

alguns fatores que influenciam o crescimento celular. A agitação deve impedir a formação de aglomerados celulares, garantindo incidência luminosa suficiente às células (GRIMA et al., 1996), permitir a captação de CO₂ da atmosfera, liberação de O₂ do interior do meio líquido e diminuir os gradientes gasosos e de nutrientes no meio (JIMÉNEZ et al., 2003).

A Figura 3b mostra as curvas de crescimento para a microalga *Chlorella* sp. sob diferentes agitações. Nos cultivos realizados com agitação através de injeção de ar passando por pedras porosas alongadas e cortina porosa, a microalga não apresentou crescimento celular durante os 10 dias de cultivo. Quando a *Chlorella* sp. foi agitada por pás rotativas atingiu concentração celular 0,48 g.L⁻¹, apresentando crescimento durante todo o cultivo. Quanto maior a intensidade de luz a que as células são expostas durante o dia, maior a taxa de respiração no período escuro, que pode consumir até 35% da biomassa produzida no período claro (TORZILLO et al., 1991). Assim, a perda noturna de biomassa em cultivos pouco densos, que recebem altas intensidades luminosas, como ocorre no início dos cultivos, contribui para que as densidades celulares mantenham-se baixas e o crescimento seja retardado neste período. Provavelmente, quando a *Chlorella* sofreu agitação apenas por ar comprimido ou por pás rotativas, não apresentou formação de biomassa durante todo o cultivo devido à pouca agitação, o que acarretou a baixas produtividades e possível consumo de parte da biomassa produzida na fase clara.

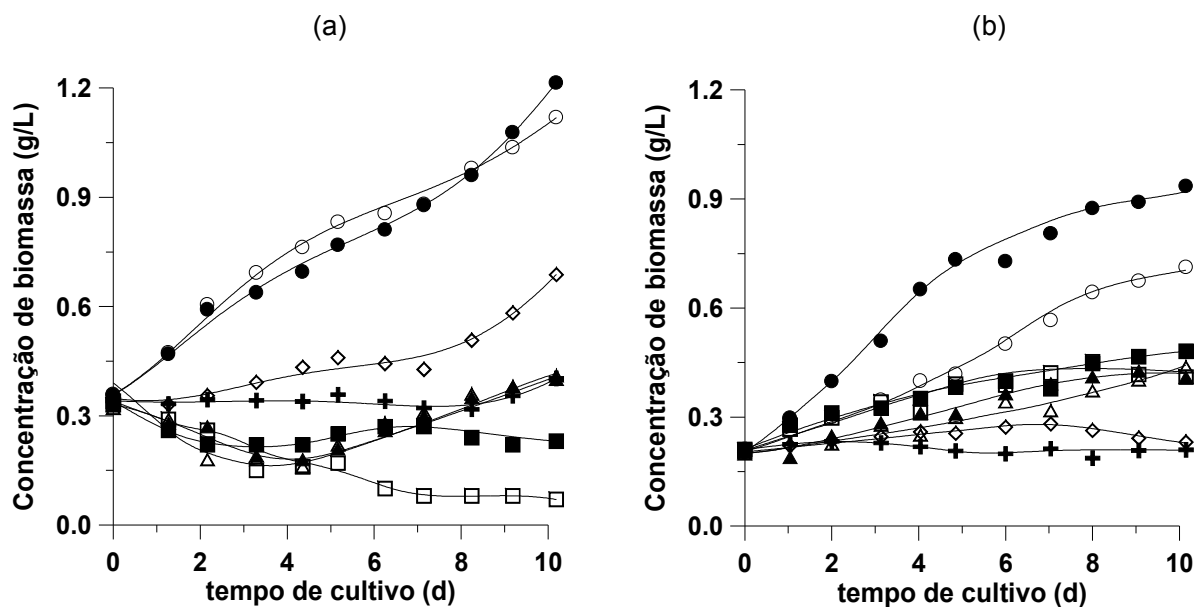


Figura 3 Curvas de crescimento para (a) *Cyanobium* sp. e (b) *Chlorella* sp. cultivadas sob diferentes agitações: pás rotativas (■), pás rotativas e cortina porosa (□), pás rotativas e pedras alongadas (Δ), pás rotativas e pedras cilíndricas (▲), 2 bombas submersas (●), 1 bomba submersa (○), cortina porosa (◇) e pedras alongadas (+).

As melhores respostas para *Chlorella* sp. foram obtidas quando cultivada com agitação através de 1 e 2 bombas submersas, com concentrações celulares máximas 0,71 e 0,93 g.L⁻¹, velocidades específicas máximas de crescimento 0,133 e 0,263 d⁻¹ e produtividades máximas 0,067 e 0,111 g.L⁻¹.d⁻¹, respectivamente. Diversos fatores influenciam na produtividade, entre eles a ineficiente conversão de luz em biomassa, acúmulo de oxigênio no cultivo, consumo de biomassa durante a respiração, nutrientes no meio de cultivo e fotoinibição (STEWART & HESSAMI, 2005). Segundo LOURENÇO (2006), as máximas concentrações celulares são importantes para obtenção de altas densidades celulares viabilizando economicamente os cultivos de microalgas que possuem elevados custos de operação. A produtividade máxima, por sua vez, considera a relação entre a concentração celular e o tempo de cultivo, indicando o desempenho de um processo, e pode definir o tempo de duração de um cultivo descontínuo para produção de biomassa. Assim, com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se observar (Figuras 3a,b) que as maiores concentrações celulares para *Cyanobium* e *Chlorella*, foram obtidas quando cultivadas com bombas submersas, representando um aumento de 95% na produção de biomassa em relação aos cultivos com cortina porosa e pás rotativas com pedras alongadas, respectivamente.

4 CONCLUSÕES

As máximas concentrações celulares (0,56 g.L⁻¹ e 0,66 g.L⁻¹), máximas produtividades (0,120 g.L⁻¹.d⁻¹ e 0,089 g.L⁻¹.d⁻¹) e as máximas velocidades específicas de crescimento (0,303 d⁻¹ e 0,166 d⁻¹) nos cultivos para as microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp., respectivamente, foram alcançadas em meio BG11 suplementado com 0,4 g.L⁻¹ de bicarbonato de sódio.

O crescimento das microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp. foi influenciado pelas diferentes configurações de agitações utilizadas, de modo que, as melhores respostas foram observadas nos ensaios em que se utilizou 1 ou 2 bombas submersas.

As microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp. apresentaram concentrações celulares máximas de crescimento (1,21 g.L⁻¹ e 0,93 g.L⁻¹) e velocidades específicas máximas (0,183 d⁻¹ e 0,266 d⁻¹) quando cultivadas com 2 bombas submersas. As máximas produtividades alcançadas para *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp. quando cultivadas com 1 e 2 bombas submersas, foram 0,113 g.L⁻¹.d⁻¹ e 0,111 g.L⁻¹.d⁻¹, respectivamente.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a PETROBRÁS – Petróleo Brasileiro S.A. e ao CENPES – Centro de Pesquisas da Petrobrás pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

6 REFERÊNCIAS

BAILEY, J. E. & OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals 2^a ed. Singapore: McGraw-Hill, 1986.

BENEMAN, J. R., HUGHES, E. Energy Convers. Manage. 38, S467, 1997.

BINAGHI, L., BORGHI, A. D., LODI, A., CONVERTI, A., BORGHI, M. D. Batch and fed-batch uptake of carbon dioxide by *Spirulina platensis*. Process Biochem. 38, 1341–1346, 2003.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. J Biotechnol. 70, 313-321, 1999.

COLLA, L. M., REINEHR, C. O., REICHERT, C., COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. Bioresource Technology, 98, 1489-1493, 2007a.

COSTA, J. A. V., MORAIS, M. G., DALCANTON, F., REICHERT, C. C., DURANTE, A. J. Simultaneous cultivation of *Spirulina* and the toxigenic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. Z Naturforsch. 61c, 105-110, 2006.

COSTA, J. A. V., COLLA, L. M., DUARTE FILHO, P. F. *Spirulina platensis* growth in open raceway ponds using fresh water supplemented with carbon, nitrogen and metal ions. Z. Naturforsch, 58, 76-80, 2003.

COSTA, J. A. V.; LINDE, G. A.; ATALA, D. I. P.; MIBIELLI, G. M.; KRUGER, R. T. Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 16, 15-18, 2000.

GORHAM, P. R., MCLACHLAN, J., HARMER, U. T. & KIM, W. H. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lingb.). Verh. Internat. Verein Limnol. (15): 769-780, 1964.

GRIMA, E. M., SEVILLA, J. M. F., PÉREZ, J. A. S., CAMACHO, F. G. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. Journal of Biotechnology, 45, 59-69, 1996.

GROBBELAAR, J. U. Photosynthetic characteristics of *Spirulina platensis* grown in commercial-scale open outdoor raceway ponds: what do the organisms tell us? *Journal of Applied Phycology*, 19, 591-598, 2007.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. pp 26-60. In Smith, W. L. and Chanley, M. H. (eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, USA, 1975.

GUILLARD, R. R. L. & RYTHER, J. H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* 8: 229-239, 1962.

HOSAKA, K., HIOKI, T., FURUUNE, H., TANISHITA, K., Augmentation of microalgae growth due to hydrodynamic activation. *Energy Conversion Management*, 36 (6-9), 725-728, 1995.

HUANG, Z., LI, L., HUANG, G., YAN, Q., SHI, B., XU, X. Growth – inhibitory and metal – binding proteins in *Chlorella vulgaris* exposed to cadmium or zinc. *Aquatic Toxicology* 91, 54-61, 2009.

JIMÉNEZ, C., COSSIO, B., LABELLA, D., NIELL, F. X. The feasibility of industrial production of *Spirulina (Arthrospira)* in Southern Spain. *Aquaculture* 217, 179-190, 2003.

KAPLAN, D., RICHMOND, A. E., DUBINSKY, Z., AARONSON, S. Algal Nutrition. In: RICHMOND, A. *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Boston: CRC Press, 1990.

LOURENÇO, S. O. *Cultivo de Microalgas Marinhas – Princípios e Aplicações – São Carlos: RiMa*, 2006.

LOURENÇO, S. O., BARBARINO, E., LAVÍN, P. L., MARQUEZ, U. M. L. & AIDAR, E. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae. Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. *Eur. J. Phycol.*, 39 (1), 17-32, 2004.

ONO, E. & CUELLO, J. L. Design parameters of solar concentrating systems for CO₂-mitigating algal photobioreactors. *Energy*. 29, 1651-1657, 2004.

PIRT, S. J. The thermodynamic efficiency (quantum demand) and dynamics of photosynthetic growth. *New Phytologist*, 102, 3-37, 1986.

POWELL, C. K., CHADDOCK, J. B., DIXON, J. R. The motion of algae in turbulent flow. *Biotechnology and Bioengineering*, 7, 295-308, 1965.

PULZ, O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl. Microbial. Biotechnol.* 57, 287-293, 2001.

- REICHERT, C. C., REINEHR, C. O., COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. *Braz J Chem Eng.* 23, 23–28, 2006.
- RICHMOND, A. Handbook of microalgal mass culture. Boston: CRC Press. ISBN 0-8493-3240-0, 1990.
- RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J. W., HERDMAN, M. & STANIER, R. G. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111, 1-61, 1979.
- SASSANO, C. E. N., GIOIELLI, L. A., ALMEIDA, K. A., SATO, S., PEREGO, P., CONVERTI, A., CARVALHO, J. C. M. Cultivation of *Spirulina platensis* by continuous process using ammonium chloride as nitrogen source. *Biomass and Bioenergy*, 31, 593-598, 2007.
- SCHMIDELL, W., LIMA, A. U., AQUARONE, E., BORZANI, W. *Biotechnologia Industrial*. v.2. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.
- STEWART, C., HESSAMI, M. A. A study of methods of carbon dioxide capture and sequestration – the sustainability of a photosynthetic bioreactor approach. *Energy Convers Manage.* 46, 403–420, 2005.
- TORZILLO, G., SACCHI, A., MATERASI, R. Temperature as an important factor affecting productivity and night biomass loss in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors. *Bioresource Technology*, 38, 95-100, 1991.
- VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira) physiology, cell-biology and biotechnology*. London: Taylor & Francis, ISBN 0-7484-0674-3, 1997.
- VONSHAK, A., ABELIOVICH, A., BOUSSIBA, S., ARAD, S., RICHMOND, A. Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. *Biomass*, 2, 175–185, 1982.
- WATANABE, A. List of algal strains in collection at the Institute of Applied Microbiology University of Tokyo. *J Gen Appl Microbiol.* 6, 1–4, 1960.

5.2 ARTIGO 2

FOTOBIORREATOR TUBULAR VERTICAL PARA CULTIVO DE MICROALGA EM MODO SEMICONTÍNUO

FOTOBIORREATOR TUBULAR VERTICAL PARA CULTIVO DE MICROALGA EM MODO SEMICONTÍNUO

RESUMO

A intensidade luminosa é fundamental no cultivo de microalgas e está diretamente relacionada à concentração de biomassa, modo de cultivo e a escolha do fotobiorreator. O cultivo semicontínuo evita limitação de nutrientes e altas densidades celulares e os fotobiorreatores tubulares verticais aumentam a área de contato entre a luz e o cultivo, proporcionando melhor condição as microalgas. O objetivo deste trabalho foi determinar as características cinéticas do cultivo da microalga *Cyanobium* sp. cultivada em fotobiorreator tubular vertical em modo semicontínuo. Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores tubulares verticais de 2 L durante 57 d a 30°C, 3200 Lux e fotoperíodo 12 h claro/escuro. A máxima velocidade específica de crescimento foi 0,127 d⁻¹ quando o cultivo foi realizado com concentração de corte 1,0 g.L⁻¹, taxa de renovação 50% e concentração de bicarbonato de sódio 1,0 g.L⁻¹. Os máximos valores de produtividade (0,071 g.L⁻¹.d⁻¹) e número de ciclos (10) foram observados em concentração de corte 1,0 g.L⁻¹, taxa de renovação 30% e concentração de bicarbonato 1,0 g.L⁻¹. Os resultados evidenciaram o potencial do cultivo semicontínuo da *Cyanobium* sp. em biorreator tubular fechado, combinando fatores, como a concentração celular de corte, taxa de renovação de meio e concentração de bicarbonato de sódio.

PALAVRAS-CHAVE: fotobiorreator; *Cyanobium*; microalga; semicontínuo.

ABSTRACT

The light intensity is an important factor in microalgae culture and is directly related to the biomass concentration, cultivation mode and photobioreactor choice. Semicontinuous culture prevents nutrients limitation and high cell densities and the vertical tubular photobioreactors increase the contact area between light and culture, providing better condition to the microalgae. The aim of this work was to determine the kinetic characteristics of the microalga *Cyanobium* sp. cultivated in tubular vertical photobioreactor in semicontinuous mode. Cultures were carried out in 2 L tubular vertical photobioreactors during 57 d at 30°C, 3200 Lux and 12 h light/dark photoperiod. The maximum specific growth rate was 0,127 d⁻¹ when cell concentration was 1,0 g.L⁻¹, renewal rate 50% and sodium bicarbonate concentration 1,0 g.L⁻¹. The maximum productivity values (0.071 g.L⁻¹.d⁻¹) and cycle number (10) had been observed at cell concentration 1,0 g.L⁻¹, renewal rate 30% and 1,0 g.L⁻¹ bicarbonate concentration. Results had evidenced the potential of the *Cyanobium* sp. semicontinuous culture in closed tubular photobioreactor, combining factors as cell concentration, renewal rate and sodium bicarbonate concentration.

KEYWORDS: photobioreactor; *Cyanobium*; microalgae; semicontínuo.

1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia microalgal tem sido explorada por diversos pesquisadores devido ao seu potencial no enriquecimento nutricional de alimentos como suplemento alimentar (MORAIS et al., 2006), biofixação de dióxido de carbono (MORAIS & COSTA, 2007a; MORAIS & COSTA, 2007b), geração de biocombustíveis (CHISTI, 2007) e extração de biocompostos específicos (SILVEIRA et al., 2007). As condições de cultivo tais como, temperatura, luminosidade, pH do meio, tipo de fotobiorreator, modo de operação, disponibilidade e fontes de nutrientes, influenciam diretamente na obtenção de biocompostos e características cinéticas da cultura.

A utilização de microalgas na alimentação humana ocorre há séculos, sendo utilizadas como fontes de proteínas por tribos indígenas do Chad e pelos Astecas, que as secavam em lamelas para serem ingeridas (NAVALHO, 1998). Quando cultivadas em condições adequadas, certas espécies de microalgas podem duplicar sua biomassa diariamente, produzindo matéria seca com teor protéico superior a 50% e alcançando produtividades de 30 a 50 g.m⁻².d⁻¹ em peso seco (GOLDMAN, 1980).

Os métodos convencionais para cultivo de microalgas são realizados em tanques abertos tipo *raceway*, os quais utilizam luz natural ou artificial. Tal método, entretanto, requer grandes áreas e pode apresentar dificuldades para controle das condições de cultivo, evaporação do meio e redução da intensidade luminosa com o aumento da altura de meio (MORAIS & COSTA, 2007a).

O projeto de um fotobiorreator apropriado poderá reduzir a área necessária, desde que empregue distribuição vertical do cultivo de microalgas. O uso de fotobiorreator tubular vertical proporciona maior contato entre a luz e o cultivo, aumenta o tempo de residência do gás no meio de cultivo, e conseqüentemente a eficiência de utilização de nutrientes. Além disso, a fonte de carbono é um dos componentes de maior custo do meio, e a sua concentração ideal no cultivo deve ser determinada já que o excesso ou limitação prejudicam o crescimento microalgal (MORAIS & COSTA, 2008).

Cultivos de microalgas em grande escala são, na maioria das vezes, economicamente inviáveis de ser realizados em modo descontínuo, em função do tempo necessário para carga, descarga e limpeza do fotobiorreator. No modo semicontínuo, o fotobiorreator é carregado no início com meio de cultivo e incubado sob condições ótimas. Depois de determinado período, uma parcela do meio de cultivo com microalgas é removida e substituída por meio de cultura novo, sem células (RADMANN et al., 2007). Este tipo de cultivo apresenta vantagens operacionais, como dispensar a constante troca de inóculo,

além de manter o microrganismo em elevadas velocidades de crescimento (FÁBREGAS et al., 1996; FÁBREGAS et al., 1995a). Apesar de muito utilizado, esse sistema de cultivo é pouco estudado, havendo uma deficiência de trabalhos científicos envolvendo variáveis como concentração celular de corte e taxa de remoção de meio.

O objetivo deste trabalho foi determinar as características cinéticas do cultivo da microalga *Cyanobium* sp. cultivada em fotobiorreator tubular vertical em modo semicontínuo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo e Meio de Cultivo

A microalga *Cyanobium* sp. foi utilizada neste estudo. Para manutenção e preparação do inóculo foi utilizado meio de cultivo BG11 contendo (g.L^{-1}): NaNO_3 (1,5); K_2HPO_4 (0,04); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,075); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,036); $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{FeNO}_7$ (0,006); EDTA dissódico (0,001); Na_2CO_3 (0,02); $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ (0,006) e micronutrientes (RIPPKA et al. 1979). As concentrações de NaHCO_3 no meio de cultivo variaram em 0,4, 1,0 e $1,6 \text{ g.L}^{-1}$.

2.2 Condições de Cultivo

A *Cyanobium* sp. foi cultivada em fotobiorreator tubular vertical de 2 L (MORAIS & COSTA 2007a) com volume útil de 1,8 L e concentração inicial $0,40 \text{ g.L}^{-1}$. A Figura 1 mostra a configuração do fotobiorreator tubular utilizado no cultivo.

A agitação dos cultivos foi realizada através de injeção de ar comprimido com vazão de 0,3 vvm (MORAIS & COSTA, 2007a). A iluminância foi 3200 Lux fornecida por lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia (40 Watts). O aparato experimental foi mantido durante 57 d em câmara termostaticada a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, com fotoperíodo 12 h claro/escuro (REICHERT et al., 2006).

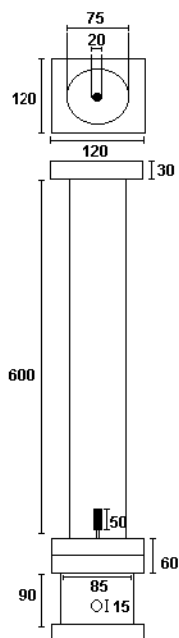


Figura 1 Configuração do fotobiorreator de 2 L. Todas as dimensões em mm.

Fonte: MORAIS & COSTA, 2007a.

2.3 Determinações Analíticas

As amostras foram coletadas diariamente para determinação da concentração celular, calculada através da densidade ótica a 670 nm em espectrofotômetro VARIAN modelo Cary 100 (COSTA et al., 2003) utilizando-se uma curva de calibração relacionando densidade ótica com peso seco de biomassa de *Cyanobium* sp. O pH foi determinado a cada 24 h através de pHmetro digital (Quimis Q400H, Brasil).

2.4 Respostas Estudadas

Foram comparadas as respostas velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{médio}}$), produtividade ($P_{\text{médio}}$) e tempo de geração (t_g) quando expostas a diferentes concentrações de bicarbonato de sódio (0,4; 1,0 e 1,6 g.L⁻¹), taxa de renovação (30, 40 e 50%) e concentração de corte (0,8; 1,0 e 1,2 g.L⁻¹). A velocidade específica de crescimento (BAILEY & OLLIS, 1986), foi obtida através da Equação 1.

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

A produtividade da biomassa, definida como a massa celular formada em determinado volume na unidade de tempo (SCHMIDELL et al., 2001), foi calculada segundo a Equação 2.

$$P_x = \left(\frac{X - X_0}{t - t_0} \right) \quad (2)$$

onde, X (g.L^{-1}) é a concentração celular final, X_0 (g.L^{-1}) é a concentração celular inicial do cultivo, t (d) é o tempo final e t_0 é o tempo inicial do cultivo.

O tempo de geração definido como o tempo necessário para que ocorra a duplicação da biomassa (SCHMIDELL et al., 2001), foi obtido através da equação 3.

$$t_g = \frac{\ln(2)}{\mu_{\text{médio}}} \quad (3)$$

2.5 Delineamento Experimental

Foi proposto um planejamento fatorial do tipo Box-Behnken (RADMANN et al., 2007) modificado com três fatores de estudo variando cada um em três níveis. A modificação no planejamento foi realizada na concentração celular de corte, onde o nível central foi substituído pelo nível superior e vice-versa. A Tabela 1 apresenta a matriz das variáveis codificadas do planejamento fatorial e os respectivos níveis das variáveis.

Quando a concentração de celular atingia 0,8; 1,0 ou 1,2 g.L^{-1} (concentração celular de corte), de acordo com a matriz do planejamento era efetuada a retirada de 30, 40 ou 50% de meio de cultivo (taxa de renovação de meio) e adicionada a mesma quantidade de meio novo. Cada experimento foi realizado por um período de 57 d.

A velocidade específica de crescimento foi obtida por regressão exponencial na fase logarítmica de multiplicação em cada intervalo de tempo correspondente ao respectivo ciclo de crescimento (corte). A produtividade em biomassa, que é definida como a massa celular formada num determinado volume de unidade de tempo, foi calculada separadamente para cada corte.

Tabela 1 Matriz do planejamento fatorial tipo Box-Behnken modificado com as variáveis codificadas e respectivos níveis de variação.

Exp.	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁ (g.L ⁻¹)	X ₂ (%)	X ₃ (g.L ⁻¹)
1	-1	-1	0	0,8	30	1,0
2	0	-1	0	1,0	30	1,0
3	-1	+1	0	0,8	50	1,0
4	0	+1	0	1,0	50	1,0
5	-1	0	-1	0,8	40	0,4
6	0	0	-1	1,0	40	0,4
7	-1	0	+1	0,8	40	1,6
8	0	0	+1	1,0	40	1,6
9	+1	-1	-1	1,2	30	0,4
10	+1	+1	-1	1,2	50	0,4
11	+1	-1	+1	1,2	30	1,6
12	+1	+1	+1	1,2	50	1,6
13	+1	0	0	1,2	40	1,0
14	+1	0	0	1,2	40	1,0
15	+1	0	0	1,2	40	1,0

X₁: Concentração celular de corte, X₂: Taxa de renovação de meio, X₃: Concentração de bicarbonato de sódio.

2.6 Análise Estatística

Os resultados obtidos a partir dos dados experimentais foram avaliados pela comparação entre as curvas de crescimento e Análise de Variância (ANOVA), com nível de confiança de 90% ($p \leq 0,10$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A máxima velocidade específica de crescimento foi $0,127 \text{ d}^{-1}$, no ensaio 4, com concentração de corte $1,0 \text{ g.L}^{-1}$, taxa de renovação 50% e concentração de bicarbonato no meio $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ (Tabela 2). RADMANN et al. (2007) obtiveram $0,138 \text{ d}^{-1}$ cultivando a microalga *Spirulina* com concentração de corte $0,4 \text{ g.L}^{-1}$, taxa de renovação 40% e 20% meio Zarrouk diluído em água destilada, sendo que o aumento da concentração de corte para $0,6 \text{ g.L}^{-1}$, concentração de Zarrouk para 50% e redução da taxa de renovação para 20% causou decréscimo na velocidade específica de crescimento para $0,038 \text{ d}^{-1}$.

Cultivos com a microalga *Spirulina* realizados em fotobiorreator aberto tipo *raceway* contendo água da Lagoa Mangueira suplementada com bicarbonato de sódio e uréia obtiveram velocidade específica máxima de crescimento $0,157 \text{ d}^{-1}$ na fase exponencial de crescimento durante 15 d (COSTA et al., 2003), entretanto nos experimentos cultivados em fotobiorreator tubular a microalga *Cyanobium* sp. apresentou velocidade específica $0,127 \text{ d}^{-1}$ mantendo-se com crescimento exponencial durante 55 d de cultivo (Tabela 2).

A configuração do fotobiorreator é um fator importante para controlar a produtividade da biomassa de culturas fotossintéticas (MORAIS & COSTA 2007a). Em estudo realizado por MORAIS & COSTA (2007a), os fotobiorreatores tubulares verticais apresentaram melhores respostas cinéticas em cultivos com as microalgas *Spirulina* sp., *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella kessleri* e *Chlorella vulgaris*, comparado aos fotobiorreatores tipo erlenmeyer.

Segundo HENRIKSON (1994), as microalgas podem duplicar sua biomassa em menos de 7 d. No presente estudo o menor tempo de geração foi 5,44 d (ensaio 4, concentração de corte $1,0 \text{ g.L}^{-1}$, taxa de renovação 50% e concentração de bicarbonato no meio $1,0 \text{ g.L}^{-1}$), comprovando a vantagem do cultivo semicontínuo. Esse tempo de geração concorda com o menor tempo de geração obtido por RADMANN et al. (2007) que foi 5,2 d, também em cultivo semicontínuo com a microalga *Spirulina platensis*. À medida que a velocidade de duplicação da célula aumenta, o tempo de geração diminui, podendo viabilizar economicamente o cultivo. Uma vantagem de cultivar microalgas é que elas podem duplicar sua biomassa em menos de uma semana. Dobrar a biomassa de plantas terrestres pode levar meses, assim como duplicar a concentração de proteínas animais pode levar até anos (HENRIKSON, 1994).

Tabela 2 Velocidade específica média de crescimento ($\mu_{\text{médio}}$, d^{-1}), tempo do cultivo em fase exponencial de crescimento (t_e , d) tempo de geração (t_g , d), ciclos de crescimento (N), produtividade ($P_{\text{médio}}$, $\text{g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), pH mínimo (pH_{min}) e pH máximo ($\text{pH}_{\text{máx}}$) do estudo realizado segundo planejamento tipo Box-Behnken aplicado no estudo do cultivo da microalga *Cyanobium* sp.

Exp.	$\mu_{\text{médio}}$	t_e	t_g médio	N	$P_{\text{médio}}$	pH_{min}	$\text{pH}_{\text{máx}}$
1	0,109	48	6,33	5	0,036	8,17	9,32
2	0,096	55	7,23	10	0,071	8,75	9,56
3	0,111	44	6,22	7	0,060	8,69	9,36
4	0,127	47	5,44	6	0,069	8,67	9,30
5	0,049	38	14,20	6	0,026	8,59	9,18
6	0,070	49	9,93	8	0,046	8,52	9,27
7	0,051	46	13,70	4	0,018	8,67	9,32
8	0,047	45	14,80	5	0,025	8,66	9,41
9	0,051	48	13,53	6	0,070	8,43	9,26
10	0,056	52	12,39	5	0,057	8,43	9,20
11	0,052	50	13,21	8	0,066	8,76	9,47
12	0,075	43	9,29	6	0,034	8,82	9,47
13	0,079	39	8,75	8	0,053	8,54	9,22
14	0,072	42	9,63	7	0,056	8,58	9,30
15	0,092	38	7,54	8	0,061	8,48	9,61

A produtividade máxima e ciclos de crescimento foram $0,071 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e 10 ciclos (Figura 2), respectivamente, no ensaio 2 (concentração de corte $1,0 \text{ g.L}^{-1}$, taxa de renovação 30% e concentração de bicarbonato no meio $1,0 \text{ g.L}^{-1}$), onde também foi obtido o maior tempo de fase exponencial de crescimento (55 d). Os ensaios 6, 11, 13 e 15 apresentaram 8

ciclos de crescimento ao longo do cultivo. Resultados semelhantes foram obtidos por REICHERT et al. (2006) em cultivos com *Spirulina platensis* realizados em erlenmeyer em modo semicontínuo, quando utilizaram concentração celular de corte $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ e taxa de renovação 25% durante 71 d, onde a produtividade e velocidade de crescimento começaram a apresentar declínio após 50 d de cultivo. FÁBREGAS et al. (2001) no cultivo semicontínuo da microalga *Haematococcus pluvialis* em fotobiorreatores fechados obtiveram produtividade máxima utilizando taxa de renovação 20%.

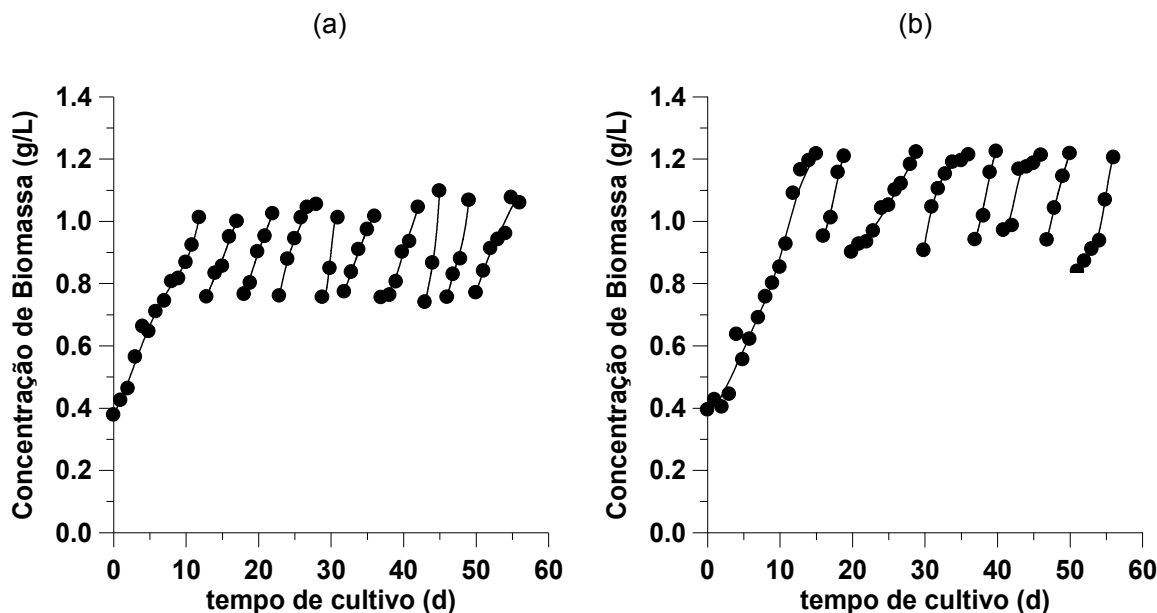


Figura 2 Curvas de concentração celular dos cultivos semicontínuos em função do tempo para: (a) Concentração celular de corte $1,0 \text{ g.L}^{-1}$, taxa de renovação de meio 30% e concentração de bicarbonato de sódio $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ (experimento 2); (b) Concentração celular de corte $1,2 \text{ g.L}^{-1}$, taxa de renovação de meio 40% e concentração de bicarbonato de sódio $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ (experimento 15).

A fotoinibição é um fenômeno que ocorre no cultivo de microalgas devido ao excesso de luz que chega ao cultivo, e pode proporcionar alterações que inibem ou retardam a fotossíntese pelas microalgas, principalmente devido ao acúmulo de H_2O_2 . Este fenômeno pode ser ativado por alguma condição de estresse, como a baixa concentração celular no cultivo, o que permite alta incidência de luz nas células (VONSHAK, 1997). O fluxo de luz emitido pode causar a fotoinibição dependendo do gênero e espécie da microalga estudada. Cultivos com a microalga *Spirulina* geralmente apresentam ótimo crescimento com condições de concentração celular inicial $0,15 \text{ g.L}^{-1}$. Entretanto, a microalga *Cyanobium* sp. apresentou aglomeração da biomassa seguida de morte celular

quando exposta a concentrações celulares iniciais de 0,10, 0,20 e 0,30 g L⁻¹ (dados não mostrados), problema esse resolvido ao adotar-se concentração inicial de 0,40 g.L⁻¹.

Neste estudo os valores máximos para velocidade específica de crescimento, produtividade e número de ciclos de crescimento foram observados na concentração de corte 1,0 g.L⁻¹, os quais após a renovação do meio de cultivo apresentam concentração mínima 0,5 g.L⁻¹. Segundo TRAVIESO et al. (2001) a concentração celular ideal em processos descontínuos para a máxima produtividade microalgal encontra-se entre 0,5 e 0,7 g.L⁻¹. Neste intervalo de concentração os cultivos também se apresentam menos propensos à contaminação por outras microalgas ou microrganismos.

Os valores de pH apresentaram pequena variação ao longo do cultivo para todos os ensaios. O mínimo valor observado foi 8,17 no ensaio 1 (concentração de corte 0,8 g.L⁻¹, taxa de renovação 30% e concentração de bicarbonato de sódio 1,0 g.L⁻¹) e o máximo 9,61 no ensaio 15 (concentração de corte 1,2 g.L⁻¹, taxa de renovação 40% e concentração de bicarbonato de sódio 1,0 g.L⁻¹). A máxima variação observada entre os valores máximos e mínimos de pH para o mesmo ensaio foi 1,15 (Tabela 2).

Os efeitos e os níveis de significância resultantes da análise de variância para o planejamento fatorial Box-Behnken utilizado no cultivo semicontínuo são apresentados na Tabela 3. A taxa de renovação de meio e a concentração de bicarbonato no meio apresentaram efeito quadrático significativo ($p < 0,10$). Em relação ao efeito da taxa de renovação de meio sobre a velocidade específica de crescimento, esta foi influenciada negativamente, havendo uma diminuição da velocidade quando foi utilizada uma taxa de renovação de meio 40%. Como o efeito quadrático da concentração de bicarbonato de sódio no meio foi significativo, o comportamento da velocidade específica em função dessa taxa não foi linear, havendo um aumento na velocidade específica no nível central da variável (1,0 g.L⁻¹).

Em relação à produtividade, os três fatores estudados apresentaram influência significativa ($p < 0,10$), exceto para taxa de renovação de meio na forma linear. O efeito quadrático da taxa de renovação foi significativo, havendo ponto de máximo entre as taxas de renovação 40% e 50%.

Tabela 3 Significâncias estatísticas (p) e efeitos obtidos da análise do planejamento fatorial utilizado no cultivo semicontínuo da *Cyanobium* sp.

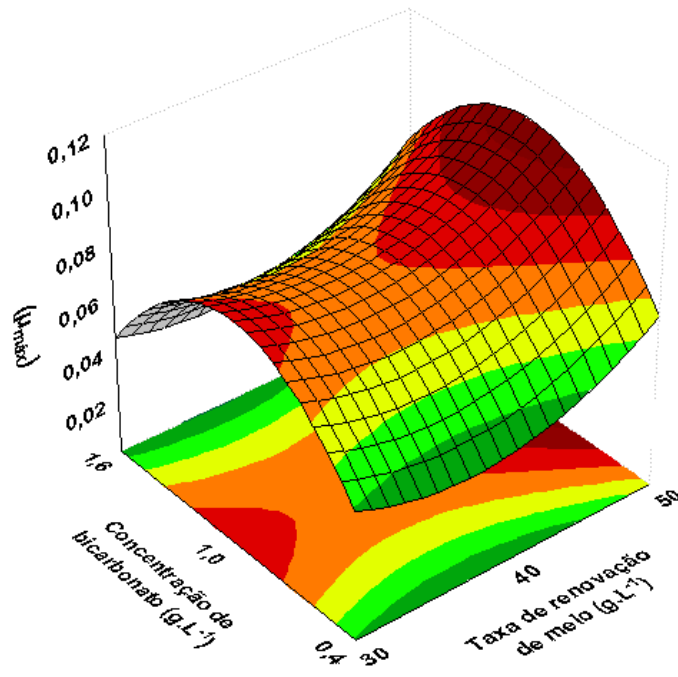
Fator	μ_x (d ⁻¹)		P_x (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)	
	p	Efeito	P	Efeito
X₁ (L)	0,2210	-0,0112 ± 0,0080	0,0007*	0,0217 ± 0,0029
X₁ (Q)	0,2187	0,0106 ± 0,0075	0,0550*	0,0068 ± 0,0027
X₂ (L)	0,1438	0,0163 ± 0,0094	1,0000	0,0056 ± 0,0034
X₂ (Q)	0,0585*	-0,0162 ± 0,0066	0,0015*	-0,0151 ± 0,0024
X₃ (L)	0,7161	-0,0036 ± 0,0094	0,0112*	-0,0135 ± 0,0034
X₃ (Q)	0,0021*	0,0387 ± 0,0066	0,0016*	0,0150 ± 0,0024
X₁-X₂	0,6942	0,0045 ± 0,0109	0,0022*	-0,0230 ± 0,0046
X₁-X₃	0,6942	0,0045 ± 0,0109	0,6681	-0,0018 ± 0,0039
X₂-X₃	0,7119	0,0050 ± 0,0127	0,0983*	-0,0095 ± 0,0046

X₁: Concentração celular de corte; X₂: Taxa de renovação de meio; X₃: Concentração de bicarbonato de sódio; L: Efeito linear; Q: Efeito quadrático; μ_x : Velocidade específica de crescimento; P_x: Produtividade. *Estatisticamente significativo para um intervalo de confiança de 90%.

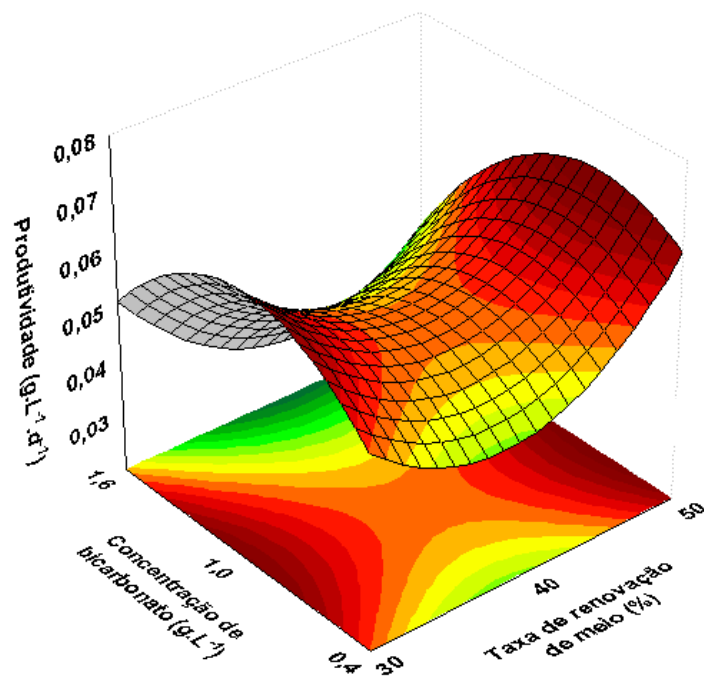
As máximas velocidades específicas de crescimento e produtividades são obtidas com taxa de remoção de 30 e 50% e concentração de bicarbonato entre 0,4 e 1,6 g.L⁻¹. Em concentrações mínimas e extremas de bicarbonato de sódio e taxa de remoção de 40% verificam-se as menores velocidades específicas e produtividades (Figuras 3a e 3b).

Nas menores taxas de renovação de meio de cultivo (Figura 3c) e concentrações de bicarbonato de sódio entre 0,4 e 1,6 g.L⁻¹ ocorreram o maior número de ciclos de crescimento (10 ciclos). O bicarbonato de sódio é o nutriente adicionado em maior quantidade no meio de cultivo, correspondendo a 60% do custo total com nutrientes. No presente estudo verificou-se que o uso de 1,6 g.L⁻¹ de bicarbonato de sódio prejudicou o crescimento microalgal, sugerindo o uso de menores concentrações deste composto (Figura 3c).

(a)



(b)



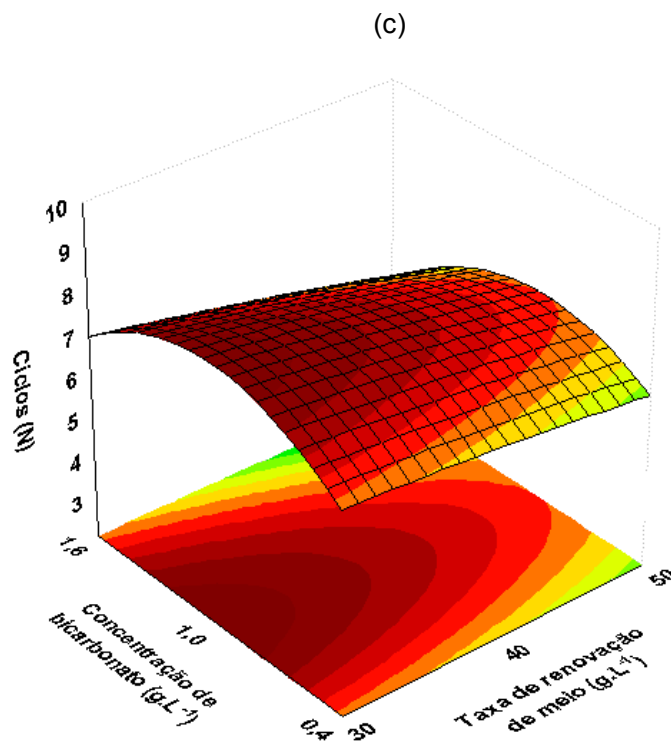


Figura 3 Superfícies de resposta e linhas de contorno para (a) velocidade específica de crescimento, (b) produtividade e (c) ciclos de crescimento em função da concentração de bicarbonato de sódio e taxa de renovação de meio de cultivo.

SMITH et al. (1992), em estudos sobre o crescimento da microalga *Skeletonema costanum* em diferentes níveis de irradiação e concentrações de nitrogênio, perceberam que quando a concentração de nutrientes era elevada, o microrganismo necessitava de mais energia para incorporação e redução do nitrato presente no meio de cultivo, diminuindo sua eficiência fotossintética. FÁBREGAS et al. (1995b) observaram este mesmo comportamento durante o cultivo semicontínuo da microalga *Tetraselmis suecica*, sendo a diminuição da produtividade em concentrações elevadas de nutrientes atribuída também a um efeito de inibição da atividade enzimática relacionada à fotossíntese. Os resultados estão de acordo com os obtidos neste trabalho, pois quando se utilizou nível máximo de bicarbonato de sódio no meio, obtiveram-se baixas produtividades e velocidades específicas de crescimento.

TRAVIESO et al. (2001) estudaram diferentes taxas de renovação de meio durante o cultivo semicontínuo da microalga *Spirulina platensis* em fotobiorreator tubular, realizando os ciclos diariamente. Verificaram que havia aumento da produtividade com aumento da taxa de renovação (5 a 20%), sendo que a partir de 25% a produtividade começava a decair. Os resultados estão parcialmente de acordo com os obtidos neste trabalho, pois as menores produtividades foram alcançadas quando a microalga foi cultivada

com taxa de renovação de meio 40% e concentrações de bicarbonato de sódio 0,4 g.L⁻¹ e 1,6 g.L⁻¹, porém quando cultivadas com taxas de renovação 30% e 50% aliadas à concentração de bicarbonato de sódio 1,0 g.L⁻¹, obteve-se produtividades até três vezes maiores.

4 CONCLUSÕES

A microalga *Cyanobium* sp. cultivada em fotobiorreator tubular vertical em modo semicontínuo apresentou as melhores respostas cinéticas quando mantida em concentração de bicarbonato 1,0 g.L⁻¹, concentração celular de corte 1,0 g.L⁻¹ e taxa de renovação de meio 30 ou 50%. Nestas condições os máximos valores para velocidade específica de crescimento, produtividade e número de ciclos foram 0,127 d⁻¹, 0,071 g L⁻¹ d⁻¹ e 10 ciclos, respectivamente.

O cultivo semicontínuo da microalga *Cyanobium* sp. em fotobiorreator tubular fechado mostrou-se satisfatório, possibilitando combinar a concentração celular de corte, taxa de renovação de meio e concentração de bicarbonato de sódio, de forma a atingir maiores produtividades e velocidades específicas de crescimento, bem como a manutenção do microrganismo em fase de crescimento exponencial durante 55 d.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a PETROBRÁS – Petróleo Brasileiro S.A. e ao CENPES – Centro de Pesquisas da Petrobrás pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

6 REFERÊNCIAS

BAILEY, J. E. & OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals 2^a ed. Singapore: McGraw-Hill, 1986.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances, 25, 294-306, 2007.

COSTA, J. A. V., COLLA, L. M., DUARTE FILHO, P. F. *Spirulina platensis* growth in open raceway ponds using fresh water supplemented with carbon, nitrogen and metal ions. Z. Naturforsch, 58, 76-80, 2003.

FÁBREGAS, J., OTERO, A., MASEDA, A., DOMINGUEZ, A. Two-stage cultures for the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. Journal of Biotechnology. 89, 67–71, 2001.

FÁBREGAS, J., PATIÑO, M., MORALES, E. D., CORDERO, B., OTERO, A. Optimal renewal rate and nutrient concentration for the production of the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* in semicontinuous cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (1), 266-268, 1996.

FÁBREGAS, J., PATIÑO, M., ARREDONDO-VEGA, B. O., TOBAR, J. L., OTERO, A. Renewal rate and nutrient concentration as tools to modify productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44, 287-292, 1995a.

FÁBREGAS, J., PATIÑO, M., VECINO, E., CHÁZARO, F., OTERO, A. Productivity and Biochemical Composition of Cyclostat Cultures of the Marine Microalga *Tetraselmis suecica*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, 617-621, 1995b.

GOLDMAN, J. C. Outdoor algal mass cultures: II . photosynthetic yield limitations. *Algae Biomass*, [S.1], v. 11, p. 119-135, 1980.

HENRIKSON, R. Microalga *Spirulina*: Superalimento del futuro. Barcelona: Ediciones S.A. Urano, ISBN: 84-7953-047-2, 1994.

MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V. Photo bioreactor tubular for removing or fixing of carbon dioxide, greenhouse gases using micro algae and cyan bactéria, involves reducing emissions of main gás responsible for global warming and other gases of greenhouse effect. Patent Number: BR200702736-A, 2008.

MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V. Carbon dioxide biofixation with *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. *Biotechnol Letters*. 29, 1349–1352, 2007a.

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*, 129, 439-445, 2007b.

MORAIS, M. G., MIRANDA, M. Z., COSTA, J. A. V. Biscoitos de chocolate enriquecidos com *Spirulina platensis*: Características físicoquímicas, sensoriais e digestibilidade. *Alimentos e Nutrição*, 17, 323-328, 2006.

NAVALHO, J. Biotecnologia de *Danuliella salina* para a produção de beta-caroteno. 1998. 112 f. Dissertação (Mestrado em Aquacultura) – Universidade de Algarve, Algarve, 1998.

RADMANN, E. M., REINEHR, C. O., COSTA, J. A. V. Optimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. *Aquaculture*, 265, 118-126, 2007.

REICHERT, C. C., REINEHR, C. O., COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. *Braz J Chem Eng.* 23, 23-28, 2006.

RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J. W., HERDMAN, M. & STANIER, R. G. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111, 1-61, 1979.

SCHMIDELL, W., LIMA, A. U., AQUARONE, E., BORZANI, W. *Biotechnologia Industrial.* v.2. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

SILVEIRA, S. T., BURKERT, J. F. M., COSTA, J. A. V., BURKERT, C. A. V., KALIL, S. J. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresource Technology*, 98, 1629-1634, 2007.

SMITH, G. J., ZIMMERMAN, R. C., ALBERTE, R. Molecular and physiological responses of diatoms to variable levels of irradiance and nitrogen availability: growth of *Skeletonema costatum* in simulated upwelling conditions. *Limnology and Oceanography*, 37, 989-1302, 1992.

TRAVIESO L., HALL, D. O., RAO, K. K., BENÍTEZ, F., SÁNCHEZ, E., BORJA, R. A helical tubular photobioreactor producing *Spirulina* in a semicontinuous mode. *Int Biodeter Biodegr.* 47, 151 – 155, 2001.

VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira) physiology, cell-biology and biotechnology.* London: Taylor & Francis, ISBN 0-7484-0674-3, 1997.

5.3 ARTIGO 3

CULTIVO SEMICONTÍNUO DA MICROALGA *Chlorella* sp.

EM FOTOBIORREATOR ABERTO

CULTIVO SEMICONTÍNUO DA MICROALGA *Chlorella* sp. EM FOTOBIORREATOR ABERTO

RESUMO

O cultivo de microrganismos fotossintéticos, como microalgas, pode ser utilizado na busca de fontes alternativas de alimentos, na agricultura, no tratamento de águas residuais e na produção de biocombustíveis. O cultivo semicontínuo apresenta melhor relação custo-benefício em relação ao descontínuo, porém é pouco estudado. O objetivo deste trabalho foi estudar a influência da concentração celular de corte, taxa de renovação de meio e concentração de bicarbonato de sódio sobre a velocidade específica de crescimento e a produtividade da *Chlorella* sp. durante cultivos semicontínuos. Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores tipo *raceway* de 6 L durante 40 d a 30°C, 3200 Lux e fotoperíodo 12 h claro/escuro. A máxima velocidade específica de crescimento ($0,149\text{ d}^{-1}$) e produtividade ($0,091\text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) foi obtida quando utilizou-se concentração celular de corte $0,6\text{ g.L}^{-1}$ e $0,8\text{ g.L}^{-1}$, taxa de renovação 40% e 30%, concentração de bicarbonato de sódio $1,6\text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. O cultivo semicontínuo da microalga *Chlorella* sp. em fotobiorreator *raceway* pode ser explorado, obtendo-se as melhores respostas quando cultivada com concentração celular de corte $0,8\text{ g.L}^{-1}$, taxa de renovação de meio 40% e concentração de bicarbonato de sódio $1,6\text{ g.L}^{-1}$.

PALAVRAS-CHAVE: fotobiorreator; *Chlorella*; microalga; *raceway*.

ABSTRACT

The culture of photosynthetic microorganisms such as microalgae can be used in the search of alternative food sources, agriculture, residual water treatment and biofuel production. Semicontinuous cultivation is often used because it presents better cost-benefit ratios, although it is little studied. The aim of this work was to study the influence of the cell concentration, medium renewal rate and sodium bicarbonate concentration on the *Chlorella* sp. specific growth rate and productivity during semicontinuous cultivation. Cultures were carried out in 6 L *raceway* type photobioreactors during 40 d at 30°C, 3200 Lux and 12 h light/dark photoperiod. The maximum specific growth rate ($0,149\text{ d}^{-1}$) and productivity ($0,091\text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) were obtained with cell concentration $0,6\text{ g.L}^{-1}$ and $0,8\text{ g.L}^{-1}$, renewal rate 40% and 30%, sodium bicarbonate concentration $1,6\text{ g.L}^{-1}$, respectively. *Chlorella* sp. semicontinuous culture in *raceway* photobioreactor can be explored, with the best answers were obtained when cultivated with cell concentration $0,8\text{ g.L}^{-1}$, medium renewal rate 40% and sodium bicarbonate concentration $1,6\text{ g.L}^{-1}$.

KEYWORDS: photobioreactor; *Chlorella*; microalgae; *raceway*.

1 INTRODUÇÃO

A busca de alternativas alimentares que possam diminuir o déficit nutricional existente em uma parcela significativa na população, a um custo acessível, envolvem a pesquisa de novos processos e matérias-primas. Por outro lado, pesquisas inovadoras envolvendo a biotecnologia, por meio da utilização de microrganismos ou enzimas para produção de novos produtos, inclusive alimentos, estão revolucionando a sociedade moderna (MULITERNO et al., 2005).

O cultivo comercial de microalgas em larga escala começou nos anos 60 no Japão com a cultura de *Chlorella*, seguida nos anos 70-90 pelo cultivo de *Spirulina* no México, Estados Unidos e China. Uma característica comum da maioria das espécies de microalgas atualmente produzidas comercialmente (*Chlorella*, *Spirulina* e *Dunaliella*) é que elas crescem em meios altamente seletivos, podendo crescer em cultivos abertos e ainda assim permanecerão relativamente livres de contaminação por outros microrganismos (BOROWITZKA, 1999).

A *Chlorella*, assim como a *Spirulina*, possui certificado GRAS (Generally Recognized As Safe) emitido pelo FDA (Food and Drug Administration) podendo ser utilizada como alimento sem apresentar risco à saúde. A biomassa microalgal produzida pode ser explorada como fonte de biocompostos com alto valor nutricional e comercial, como proteínas, ácidos graxos, vitaminas, pigmentos, biocombustíveis, ou na formulação de alimentos e rações (COSTA et al., 2003).

As condições de cultivo influenciam consideravelmente na composição das microalgas. Diversos são os fatores que podem influenciar no crescimento de microalgas, tanto em cultivos abertos quanto fechados: pH, luminosidade, presença de contaminantes, temperatura, tipo de fotobiorreator e concentração inicial de biomassa (PELIZER et al., 2003; DUARTE FILHO et al., 2002; COSTA et al., 2000; MIRÓN et al., 1999; MAREK et al., 1987; VONSHAK et al., 1982).

O modo de operação está diretamente relacionado com o processo biotecnológico, pois o microrganismo necessita de condições adequadas para estimular a síntese do produto que se deseja obter. No modo semicontínuo, o fotobiorreator é carregado no início com meio de cultivo e mantido sob condições ótimas. Depois de determinado período, uma parcela do meio de cultivo com microalgas é removida e substituída por meio de cultura novo, sem células (LOURENÇO, 2006). Este tipo de cultivo apresenta vantagens operacionais, como dispensar a constante troca de inóculo, além de manter o microrganismo em elevadas velocidades de crescimento (FÁBREGAS et al., 1996;

FÁBREGAS et al., 1995a). Apesar de muito utilizado, esse sistema de cultivo é pouco estudado, havendo uma deficiência de trabalhos científicos envolvendo variáveis como concentração celular de corte e taxa de renovação de meio.

O objetivo deste trabalho foi estudar o cultivo semicontínuo da microalga *Chlorella* sp. em fotobiorreator aberto tipo *raceway*, avaliando a influência da concentração de corte, taxa de renovação de meio e concentração de bicarbonato de sódio na velocidade específica de crescimento e produtividade da biomassa.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo e Meio de Cultivo

A microalga utilizada neste estudo foi *Chlorella* sp., mantida e cultivada em meio BG-11 (RIPPKA et al., 1979), contendo (g.L^{-1}): NaNO_3 (1,50); $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0,04); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,075); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,036); Citrato Férrico (0,006); EDTA (0,001); Na_2CO_3 (0,02); Ácido Cítrico (0,006) e micronutrientes. A fonte de carbono adicionada foi bicarbonato de sódio, nas concentrações 0,4; 1,0 e 1,6 g.L^{-1} .

2.2 Condições de Cultivo

Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores abertos tipo *raceway* de 6 L com 5 L de volume útil e concentração celular inicial 0,20 g.L^{-1} . A Figura 1 mostra a configuração do fotobiorreator *raceway* utilizado no cultivo.

A agitação dos cultivos foi realizada através de bombas submersas com vazão de 60 L.h^{-1} fixadas nos fotobiorreatores. A iluminância foi de 3200 Lux fornecida por lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia (40 Watts). O aparato experimental foi mantido durante 40 d em câmara termostatizada não estéril a 30°C, com fotoperíodo de 12 h claro/escuro (REICHERT et al., 2006).

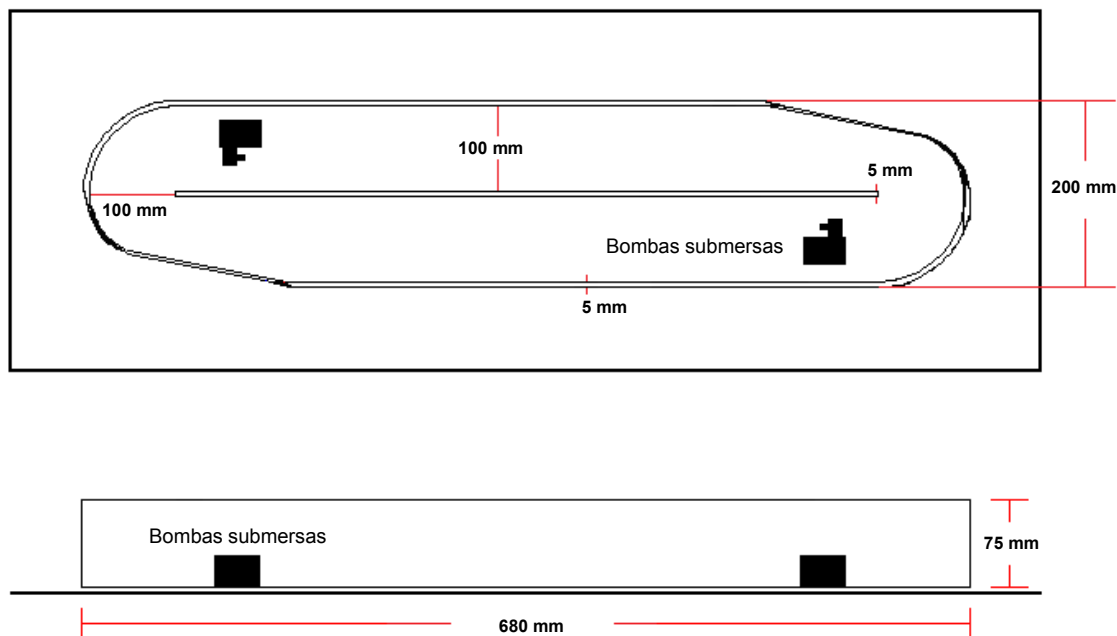


Figura 1 Desenho esquemático do fotobiorreator utilizado nos cultivos semicontínuos.

2.3 Determinações Analíticas

As amostras foram coletadas diariamente para determinação da concentração celular, calculada através da densidade ótica a 670 nm em espectrofotômetro FEMTO modelo Plus 700 (COSTA et al., 2002) utilizando-se curva de calibração relacionando densidade ótica com peso seco de biomassa de *Chlorella* sp. O pH foi determinado a cada 24 h através de pHmetro digital (Quimis Q400H, Brasil).

2.4 Respostas Estudadas

Foram comparadas as respostas velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{médio}}$), produtividade ($P_{\text{médio}}$), tempo de geração (t_g) e concentração de biomassa produzida (X_{biomassa}) quando expostas a diferentes concentrações de bicarbonato de sódio (0,4; 1,0 e 1,6 g.L⁻¹), taxa de renovação (30, 40 e 50%) e concentração de corte (0,4; 0,6 e 0,8 g.L⁻¹). A velocidade específica de crescimento (BAILEY & OLLIS, 1986), foi obtida através da Equação 1.

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

A produtividade da biomassa, definida como a massa celular formada em determinado volume na unidade de tempo (SCHMIDELL et al., 2001), foi calculada segundo a Equação 2.

$$P_x = \left(\frac{X - X_0}{t - t_0} \right) \quad (2)$$

onde, X (g.L^{-1}) é a concentração celular final, X_0 (g.L^{-1}) é a concentração celular inicial do cultivo, t (d) é o tempo final e t_0 é o tempo inicial do cultivo.

O tempo de geração definido como o tempo necessário para que ocorra a duplicação da biomassa (SCHMIDELL et al., 2001), foi obtido através da equação 3.

$$t_g = \frac{\ln(2)}{\mu_{\text{médio}}} \quad (3)$$

A biomassa gerada, definida como o somatório da concentração de biomassa retirada após atingir cada ciclo de crescimento, foi calculada através da equação 4.

$$X_{\text{biomassa}} = \sum [(X_{C1} - X_{i1}) + (X_{C2} - X_{i2}) + (X_{C3} - X_{i3}) \dots + (X_{Cn} - X_{in})] \quad (4)$$

onde, X_{C1} (g.L^{-1}) é a concentração de biomassa final quando obtida a concentração de corte desejada no primeiro ciclo, conforme planejamento fatorial proposto, X_{i1} (g.L^{-1}) é a concentração de biomassa inicial do cultivo, X_{C2} (g.L^{-1}) a concentração final de biomassa quando obtida a concentração de corte no segundo ciclo, e X_{i2} (g.L^{-1}) a concentração inicial de biomassa no cultivo após a realização do corte no primeiro ciclo.

2.5 Delineamento Experimental

Foi proposto um planejamento fatorial do tipo Box-Behnken (RADMANN et al., 2007) modificado com três fatores de estudo variando cada um em três níveis. A modificação no planejamento foi realizada na concentração celular de corte, onde o nível central foi substituído pelo nível superior e vice-versa. A Tabela 1 apresenta a matriz das variáveis codificadas do planejamento fatorial e os respectivos níveis das variáveis.

Quando a concentração de celular atingia 0,40; 0,60 ou 0,80 g.L^{-1} (concentração celular de corte), de acordo com a matriz do planejamento era efetuada a retirada de 30, 40 ou 50% de meio de cultivo (taxa de renovação de meio) e adicionada a mesma quantidade de meio novo. Cada experimento foi realizado durante 40 d.

Tabela 1 Matriz do planejamento fatorial tipo Box-Behnken com as variáveis codificadas e respectivos níveis de variação.

Exp.	X₁	X₂	X₃	X₁ (g.L⁻¹)	X₂ (%)	X₃ (g.L⁻¹)
1	-1	-1	0	0,40	30	1,0
2	0	-1	0	0,60	30	1,0
3	-1	+1	0	0,40	50	1,0
4	0	+1	0	0,60	50	1,0
5	-1	0	-1	0,40	40	0,4
6	0	0	-1	0,60	40	0,4
7	-1	0	+1	0,40	40	1,6
8	0	0	+1	0,60	40	1,6
9	+1	-1	-1	0,80	30	0,4
10	+1	+1	-1	0,80	50	0,4
11	+1	-1	+1	0,80	30	1,6
12	+1	+1	+1	0,80	50	1,6
13	+1	0	0	0,80	40	1,0
14	+1	0	0	0,80	40	1,0
15	+1	0	0	0,80	40	1,0

X₁: Concentração celular de corte, X₂: Taxa de renovação de meio, X₃: Concentração de bicarbonato de sódio.

A velocidade específica de crescimento foi obtida por regressão exponencial na fase logarítmica de multiplicação em cada intervalo de tempo correspondente ao respectivo ciclo de crescimento (corte). A produtividade em biomassa, que é definida como a massa celular formada num determinado volume de unidade de tempo, foi calculada separadamente para cada corte. Para essas respostas foi calculada a média e desvio padrão para cada experimento. A concentração de biomassa gerada é definida como o

somatório da biomassa retirada do cultivo quando atingida a respectiva concentração celular de corte.

2.6 Análise Estatística

Os resultados obtidos a partir dos dados experimentais foram avaliados pela comparação entre as curvas de crescimento e Análise de Variância (ANOVA), com nível de confiança de 90% ($p \leq 0,10$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As maiores velocidades específicas de crescimento ($0,149$; $0,147$ e $0,141 \text{ d}^{-1}$) foram obtidas nos experimentos 8, 12 e 15 (concentrações celulares de corte $0,6$; $0,8$ e $0,8 \text{ g.L}^{-1}$ e taxas de renovação de meio 40 ; 50 e 40% , respectivamente), representando um aumento de 60% sobre o menor valor para velocidade de crescimento, obtido no experimento 9, quando o cultivo foi realizado com concentração celular de corte $0,8 \text{ g.L}^{-1}$, taxa de renovação de meio 30% e concentração de bicarbonato de sódio $0,4 \text{ g.L}^{-1}$, indicando que esse parâmetro sofreu um incremento quando aumentou a concentração de bicarbonato de sódio e taxa de renovação do meio, mantendo níveis máximos na concentração de corte. O uso dessa concentração celular de corte e dessas taxas de renovação permite que as concentrações de biomassa variem entre $0,4$ e $0,8 \text{ g.L}^{-1}$.

Segundo VONSHAK et al. (1982) concentrações celulares entre $0,4$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ para *Spirulina* provocaram um decréscimo no potencial fotossintético desse microorganismo, em virtude da ausência de luz incidente sobre a maioria das células, porém, concentrações próximas a $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, são consideradas como ideais para a máxima eficiência fotossintética. RADMANN et al. (2007) cultivaram *Spirulina platensis* sob modo semicontínuo e verificaram que as maiores velocidades específicas de crescimento e produtividades foram obtidas quando a microalga foi exposta a taxa de renovação de 40 a 60% . Essas observações foram concordantes com os resultados obtidos neste trabalho, pois o experimento com maior velocidade de crescimento foi o que apresentou concentração celular de corte $0,6 \text{ g.L}^{-1}$ e taxa de renovação de meio 40% .

A maior produtividade foi obtida no experimento 11 ($0,091 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), quando a microalga foi cultivada com concentração celular de corte $0,8 \text{ g.L}^{-1}$, taxa de renovação 30% e concentração de bicarbonato de sódio $1,6 \text{ g.L}^{-1}$, indicando um aumento de 190% em relação aos menores valores, que foram obtidos para os experimentos 1, 5 e 7 (concentração celular de corte $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ e concentrações de bicarbonato de sódio $1,0$; $0,4$ e $1,6 \text{ g.L}^{-1}$). Os valores obtidos nos ensaios 1, 5 e 7 foram próximos aos encontrados por

RADMANN et al. (2007) que obtiveram produtividades 0,027 e 0,039 g.L⁻¹.d⁻¹, quando cultivaram *Spirulina platensis* em modo semicontínuo com concentrações celulares de corte 0,4 e 0,8 g.L⁻¹ e taxas de renovação 20 e 40%, respectivamente.

Tabela 2 Número de cortes (N), velocidade específica média de crescimento ($\mu_{\text{médio}}$, d⁻¹), produtividade ($P_{\text{médio}}$, g.L⁻¹.d⁻¹), tempo de geração ($t_{\text{g médio}}$, d) e concentração de biomassa gerada (X_{biomassa} , g.L⁻¹) para a microalga *Chlorella* sp. em fotobiorreator aberto cultivada em modo semicontínuo.

Exp.	N	$\mu_{\text{médio}}$	$P_{\text{médio}}$	$t_{\text{g médio}}$	X_{biomassa}
1	8	0,099 ± 0,122	0,033 ± 0,036	6,98 ± 0,12	0,862
2	6	0,090 ± 0,092	0,040 ± 0,032	7,64 ± 0,09	1,280
3	6	0,130 ± 0,114	0,041 ± 0,034	5,32 ± 0,11	1,117
4	5	0,117 ± 0,054	0,050 ± 0,018	5,90 ± 0,05	1,628
5	7	0,126 ± 0,012	0,038 ± 0,003	5,48 ± 0,01	1,280
6	5	0,124 ± 0,137	0,051 ± 0,049	5,58 ± 0,13	1,372
7	6	0,100 ± 0,018	0,031 ± 0,006	6,91 ± 0,01	1,043
8	10	0,149 ± 0,076	0,069 ± 0,029	4,64 ± 0,07	2,083
9	7	0,087 ± 0,083	0,052 ± 0,031	7,89 ± 0,08	1,765
10	6	0,123 ± 0,107	0,064 ± 0,041	5,62 ± 0,10	2,025
11	12	0,134 ± 0,081	0,091 ± 0,037	5,57 ± 0,09	2,471
12	8	0,147 ± 0,065	0,087 ± 0,026	4,71 ± 0,06	2,839
13	7	0,128 ± 0,041	0,075 ± 0,015	5,41 ± 0,04	2,516
14	8	0,139 ± 0,036	0,084 ± 0,012	4,97 ± 0,03	2,889
15	8	0,141 ± 0,050	0,085 ± 0,016	4,89 ± 0,05	2,801

O experimento 11 caracterizado pela concentração de corte 0,8 g.L⁻¹, taxa de renovação 30% e concentração de bicarbonato de sódio 1,6 g.L⁻¹, apresentou o maior número de ciclos de crescimento (12 ciclos), com 158% a mais de cortes, quando

comparado ao menor número de ciclos de crescimento (5 ciclos), obtidos nos experimentos 4 (concentração de corte $0,6 \text{ g.L}^{-1}$, taxa de renovação 50%, concentração de bicarbonato de sódio $1,0 \text{ g.L}^{-1}$) e 6 (concentração de corte $0,6 \text{ g.L}^{-1}$, taxa de renovação 40%, concentração de bicarbonato de sódio $0,4 \text{ g.L}^{-1}$).

O tempo de geração da microalga variou entre 4,64 e 7,89 d. Esse tempo de geração aproximou-se do valor obtido por RADMANN et al. (2007) que foi 5,2 d, também em cultivo semicontínuo. À medida que a velocidade de duplicação da célula aumenta, o tempo de geração diminui, viabilizando economicamente o cultivo. Assim, menores tempos de geração são esperados. Uma vantagem de cultivar microalgas é que elas podem duplicar sua biomassa em menos de uma semana. Dobrar a biomassa de plantas terrestres pode levar meses, assim como duplicar a concentração de proteínas animais pode levar até anos (HENRIKSON, 1994).

As maiores concentrações de biomassa gerada foram obtidas nos ensaios 12, 14 e 15, quando a microalga *Chlorella* foi cultivada com concentração celular de corte $0,8 \text{ g.L}^{-1}$, taxas de renovação de meio 50, 40 e 40% e concentrações de bicarbonato de sódio $1,6$; $1,0$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente, representando um aumento de 172% em relação aos menores valores, que foram obtidos nos experimentos 1, 3, 5 e 7 quando a microalga foi cultivada com concentração celular de corte $0,4 \text{ g.L}^{-1}$, independente da taxa de renovação de meio e concentração de bicarbonato de sódio utilizada.

A Figura 2 mostra as curvas de crescimento correspondentes aos cultivos 12 e 9 (concentração celular de corte $0,8 \text{ g.L}^{-1}$, taxa de renovação de meio 50 e 30% e concentração de bicarbonato de sódio $1,6$ e $0,4 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente), características do cultivo semicontínuo. No ensaio 12 o microrganismo apresentou uma das maiores produtividades ($0,087 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), apresentando também uma velocidade específica de crescimento elevada e pouco variável durante todo o processo ($0,147 \pm 0,026 \text{ d}^{-1}$). Para o cultivo 9 se pode observar que conforme foram realizadas as renovações de meio (cortes), houve uma redução da velocidade específica de crescimento, passando de $0,275 \text{ d}^{-1}$ no primeiro corte para $0,050 \text{ d}^{-1}$ até o último corte. Como esse meio apresentava concentração de bicarbonato de sódio no nível inferior, a diluição desse nutriente pode ter se tornado pronunciada, diminuindo a velocidade de multiplicação celular. Conforme OTERO et al., (1998), à medida que os cortes vão sendo realizados, substâncias tóxicas, do próprio microrganismo, acabam dificultando seu desenvolvimento no meio. Assim, é conveniente levar o cultivo semicontínuo até um determinado período, quando as condições ideais de cultivo já não se fazem presentes.

FÁBREGAS et al., (1996) realizaram estudo sobre o cultivo semicontínuo da microalga *Chlorella* e verificaram que a velocidade específica de crescimento sofreu um incremento conforme aumentou a taxa de renovação de meio. Os autores verificaram também que, com taxas de renovação de 40 a 50%, a percentagem de transformação de nitrogênio em célula foi inferior a 100%, indicando que não havia limitação de nitrogênio.

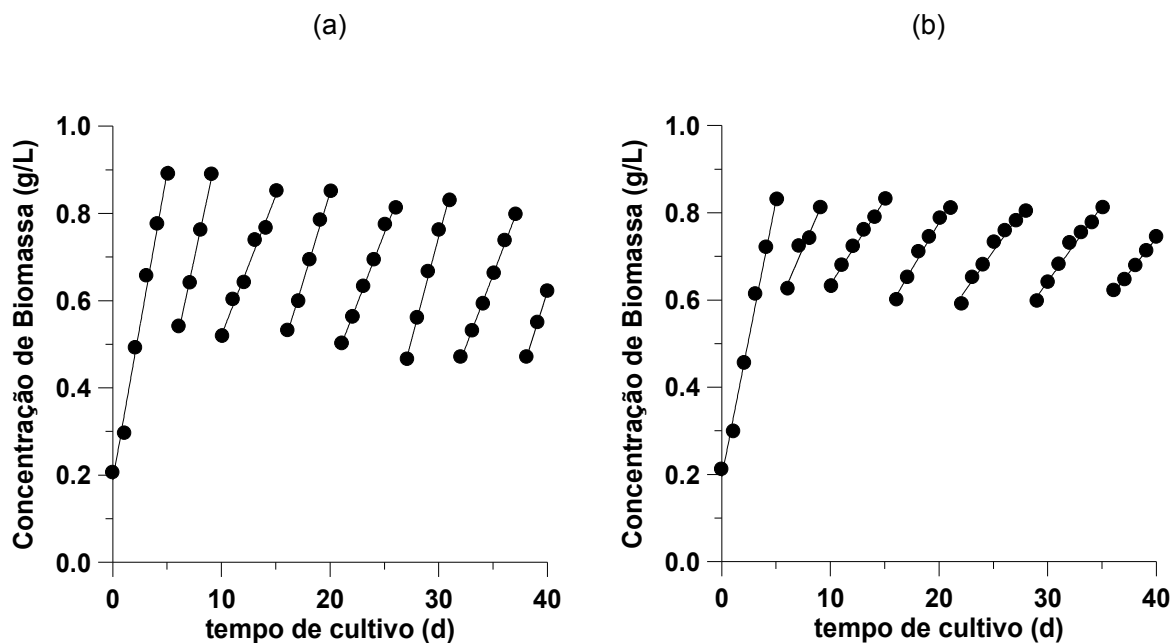


Figura 2 Concentração celular dos cultivos semicontínuos em função do tempo para: (a) Concentração celular de corte $0,8 \text{ g.L}^{-1}$, taxa de renovação de meio 50% e concentração de bicarbonato de sódio $1,6 \text{ g.L}^{-1}$ (experimento 12); (b) Concentração celular de corte $0,8 \text{ g.L}^{-1}$, taxa de renovação de meio 30% e concentração de bicarbonato de sódio $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ (experimento 9).

A Figura 3 mostra o comportamento da velocidade específica de crescimento e produtividade em função do número de ciclos para os experimentos 6, 9 e 10 (concentrações de corte $0,6$; $0,8$ e $0,8 \text{ g.L}^{-1}$, taxas de renovação 40, 30 e 50%, concentrações de bicarbonato de sódio $0,4 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente). Para os 3 experimentos, observa-se que as maiores velocidades ($0,369$; $0,275$ e $0,336 \text{ d}^{-1}$, respectivamente) e produtividades ($0,139$; $0,129$ e $0,144 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectivamente) foram obtidas no primeiro ciclo de crescimento, diminuindo consideravelmente no ciclo seguinte e permanecendo aproximadamente constante até o fim do cultivo.

A limitação do crescimento em culturas densas pode ocorrer devido ao sombreamento provocado pelas próprias células à medida que há o crescimento, impedindo

que parte de cultura receba a incidência da luz. A fotolimitação é um dos principais problemas no cultivo de microalgas, que ocorre devido ao sombreamento que as células da superfície causam nas células em maiores profundidades no interior de meio de cultivo (FÁBREGAS et al., 2001b; MOHANTY et al., 1997). VONSHAK et al. (1982) encontraram 0,40 – 0,50 g.L⁻¹ como ótima concentração celular para a máxima eficiência fotossintética em cultivos de *Spirulina*, e nesta concentração é estimado que a 20 – 30 mm da superfície cerca de 80% das células seja exposta a escuridão completa durante alguns instantes.

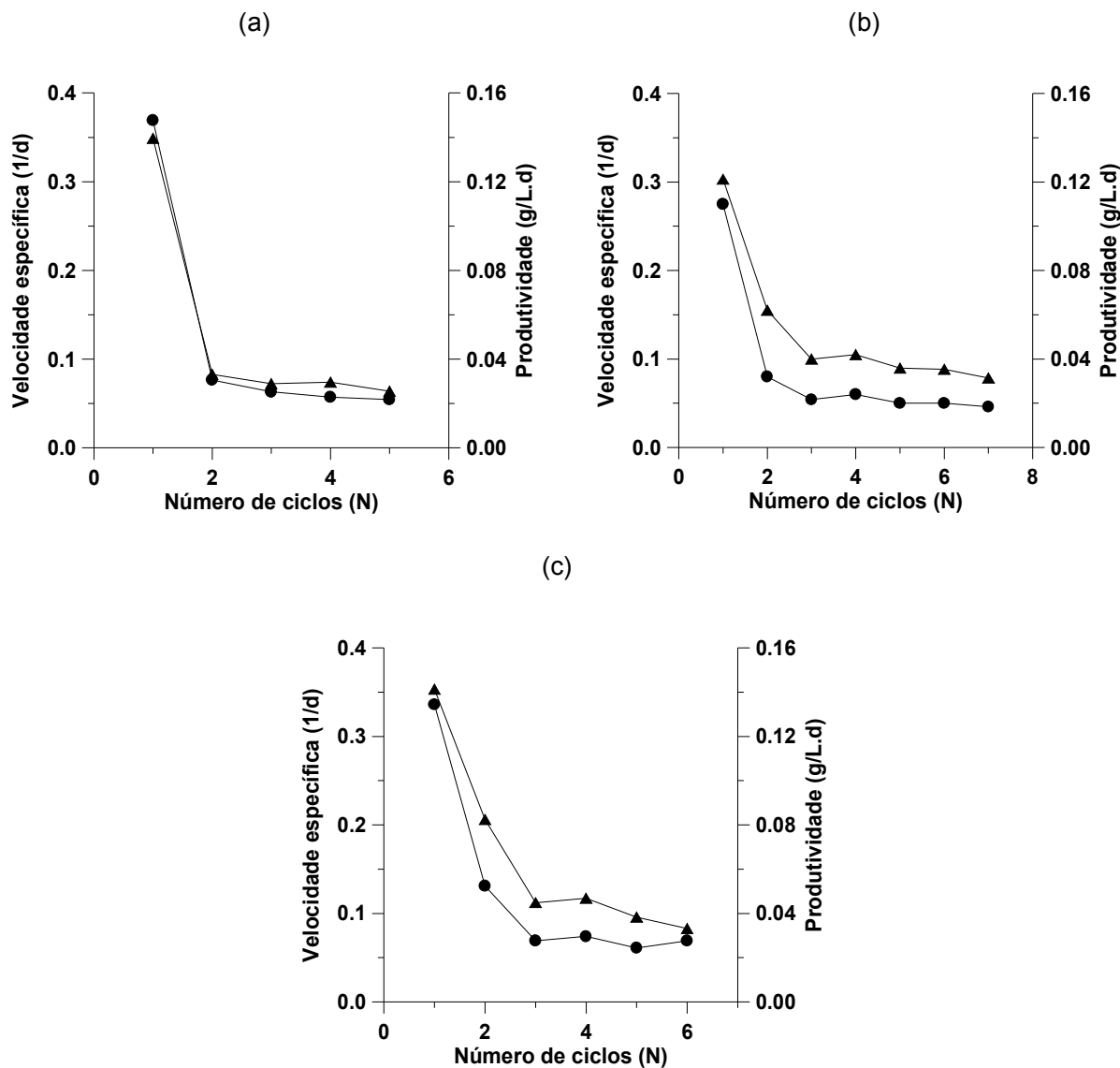


Figura 3 Evolução da velocidade específica de crescimento (●) e da produtividade (▲) em função do número de ciclos para: (a) Concentração celular de corte 0,6 g.L⁻¹, taxa de renovação de meio 40% e concentração de bicarbonato de sódio 0,4 g.L⁻¹ (experimento 6); (b) Concentração celular de corte 0,8 g.L⁻¹, taxa de renovação de meio 30% e concentração de bicarbonato de sódio 0,4 g.L⁻¹ (experimento 9); (c) Concentração celular de corte 0,8 g.L⁻¹

¹, taxa de renovação de meio 50% e concentração de bicarbonato de sódio 0,4 g.L⁻¹ (experimento 10).

RADMANN et al. (2007) avaliaram o cultivo semicontínuo da microalga *Spirulina* em fotobiorreator aberto tipo *raceway*, onde maiores velocidades específicas de crescimento foram 0,134 d⁻¹ e 0,138 d⁻¹ quando cultivaram a microalga em meio Zarrouk padrão e Zarrouk diluído 20%, respectivamente, utilizando taxas de renovação 40 e 60%, durante um período de 62 d de cultivo. COSTA et al. (2003) utilizaram um meio de cultivo natural, com água da Lagoa Mangueira, suplementado com bicarbonato e uréia, para o cultivo descontínuo da microalga *Spirulina platensis* em fotobiorreator aberto, e obtiveram velocidade específica máxima de crescimento de 0,157 d⁻¹, valor superior aos obtidos nos cultivos semicontínuos. Entretanto, a fase de crescimento exponencial durou apenas 15 d, enquanto que, nos cultivos semicontínuos deste trabalho, a velocidade específica de crescimento permaneceu em torno de 0,10 d⁻¹ durante 40 d de cultivo, mostrando a utilidade do cultivo nesse modo.

HENRARD et al. (2008) cultivaram *Cyanobium* sp. em fotobiorreatores tubulares fechados e observaram que cultivos em baixas concentrações celulares a microalga apresentava efeito inibitório para duplicar sua biomassa. Segundo VONSHAK (1997), a fotoinibição é a redução da capacidade fotossintética devido aos danos causados por intensidades luminosas acima da requerida para a realização da fotossíntese. As maiores produtividades adquiridas por HENRARD et al. (2008) foram obtidas quando a microalga foi cultivada nas maiores concentrações de corte (1,0 g.L⁻¹ e 1,2 g.L⁻¹) e níveis máximos de taxa de renovação de meio (50%), além de apresentar o maior número de ciclos (10 cortes) ao longo do cultivo.

Os efeitos e os níveis de significância resultantes da análise de variância para o planejamento fatorial Box-Behnken utilizado no cultivo semicontínuo são apresentados na Tabela 3. A concentração celular de corte e taxa de renovação de meio apresentaram efeito linear significativo ($p < 0,10$). A taxa de renovação de meio apresentou efeito quadrático sobre a resposta velocidade específica de crescimento. Em relação ao efeito da concentração celular sobre a velocidade específica de crescimento, esta foi influenciada positivamente, havendo um aumento da velocidade quando foi utilizada uma concentração de corte 0,8 g.L⁻¹. Como o efeito quadrático da taxa de renovação foi significativo, o comportamento da velocidade específica em função dessa taxa não foi linear, havendo um aumento na velocidade específica no nível central da variável (40%).

A interação entre a concentração celular de corte e a concentração de bicarbonato de sódio ($X_1.X_3$) também foi significativa ($p=0,040$), devendo ser analisada. A

velocidade específica de crescimento aumentou quando se utilizou concentração de corte 0,6 g.L⁻¹ e concentração de bicarbonato 1,6 g.L⁻¹. Além disso, a velocidade específica de crescimento também aumentou com a concentração de bicarbonato de 0,4 para 1,6 g.L⁻¹.

Tabela 3 Significâncias estatísticas (p) e efeitos obtidos da análise do planejamento fatorial utilizado no cultivo semicontínuo da *Chlorella* sp.

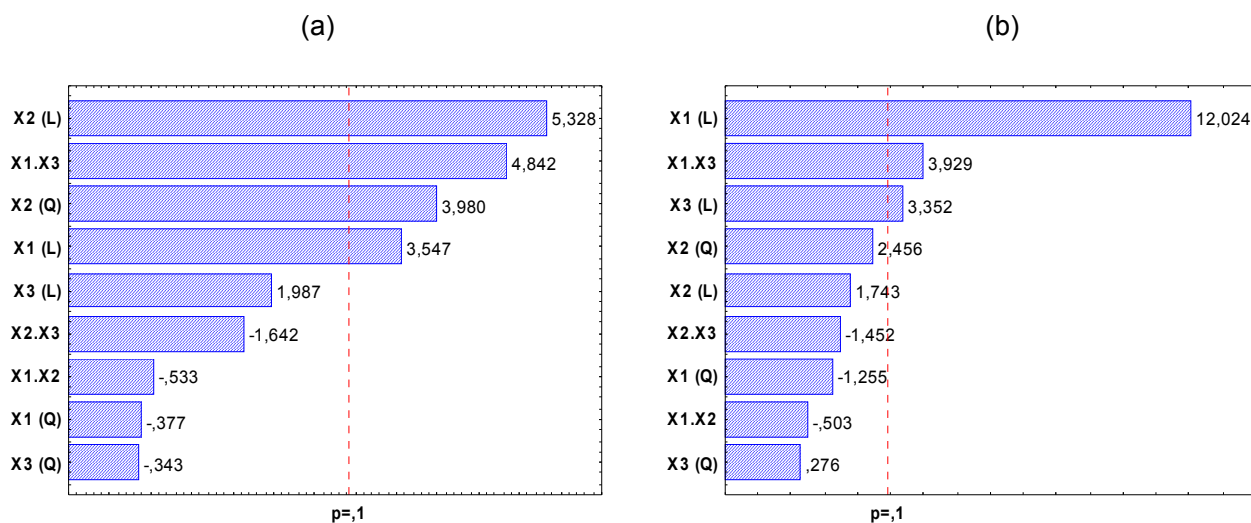
Fator	μ_x (d ⁻¹)		P_x (g.L ⁻¹ .d ⁻¹)		X_{biomassa} (g.L ⁻¹)	
	p	Efeito	P	Efeito	p	Efeito
X₁ (L)	0,0710*	0,0156 ± 0,0044	0,0068*	0,0416 ± 0,0034	<0,0001*	1,4296 ± 0,1111
X₁ (Q)	0,7418	-0,0015 ± 0,0041	0,3362	-0,0040 ± 0,0032	0,1140	-0,1995 ± 0,1043
X₂ (L)	0,0334*	0,0275 ± 0,0051	0,2234	0,0070 ± 0,0040	0,0686*	0,3018 ± 0,1305
X₂ (Q)	0,0577*	0,0145 ± 0,0036	0,1333	0,0070 ± 0,0028	0,0137*	0,3415 ± 0,0919
X₃ (L)	0,1852	0,0102 ± 0,0051	0,0786*	0,0136 ± 0,0040	0,0321*	0,3840 ± 0,1305
X₃ (Q)	0,7642	-0,0012 ± 0,0036	0,8083	0,0008 ± 0,0028	0,2529	0,1187 ± 0,0919
X₁.X₂	0,6473	-0,0031 ± 0,0059	0,6647	-0,0023 ± 0,0046	0,8810	0,0237 ± 0,1506
X₁.X₃	0,0400*	0,0289 ± 0,0059	0,0590*	0,0184 ± 0,0046	0,0288*	0,4576 ± 0,1506
X₂.X₃	0,2421	-0,0115 ± 0,0070	0,2835	-0,0080 ± 0,0055	0,7722	0,0540 ± 0,1767

X₁: Concentração celular de corte; X₂: Taxa de renovação de meio; X₃: Concentração de bicarbonato de sódio; L: Efeito linear; Q: Efeito quadrático; μ_x : Velocidade específica de crescimento; P_x : Produtividade; X_{biomassa} : Concentração de biomassa gerada durante o cultivo. *Estatisticamente significativo para um intervalo de confiança de 90%.

Para a produtividade, os efeitos lineares da concentração celular de corte e concentração de bicarbonato de sódio foram significativos e positivos nos níveis máximos de cada variável (0,8 g.L⁻¹ e 1,6 g.L⁻¹, respectivamente). O efeito de interação entre a concentração celular de corte e a concentração de bicarbonato de sódio (X₁.X₃) foram significativos (p=0,0590). A produtividade foi mais baixa quando a concentração celular de corte foi 0,4 g.L⁻¹, independentemente da concentração de bicarbonato utilizada. Contudo, quando a concentração de bicarbonato de sódio foi 1,6 g.L⁻¹, a produtividade aumentou e a concentração celular de corte passou de 0,4 g.L⁻¹ para 0,8 g.L⁻¹.

Em relação à concentração de biomassa obtida, os efeitos foram significativos e positivos para as 3 variáveis estudadas, tanto na forma linear, quanto na quadrática, com exceção para concentração celular de corte no nível central ($p > 0,10$). Quando a microalga foi cultivada nos níveis máximos de concentração celular de corte ($0,8 \text{ g.L}^{-1}$) e concentração de bicarbonato de sódio ($1,6 \text{ g.L}^{-1}$), a concentração de biomassa gerada aumentou, independente da taxa de renovação de meio.

Na Figura 4 são mostrados os efeitos estimados para a velocidade específica de crescimento, produtividade e concentração de biomassa em função das variáveis em estudo. Nas Figuras 4 (a), (b) e 4(c) observa-se que a concentração celular de corte (X_1) na forma linear apresentou influência significativa ($p < 0,10$) e positiva, sobre as respostas velocidade específica de crescimento, produtividade e concentração de biomassa, havendo um incremento nas respostas quando foi utilizado níveis máximos da variável. O efeito linear da taxa de renovação de meio apresentou efeito significativo e positivo para velocidade específica de crescimento e concentração de biomassa gerada, porém, o efeito quadrático também foi significativo, havendo ponto de máximo entre as taxas de renovação 30 e 50%.



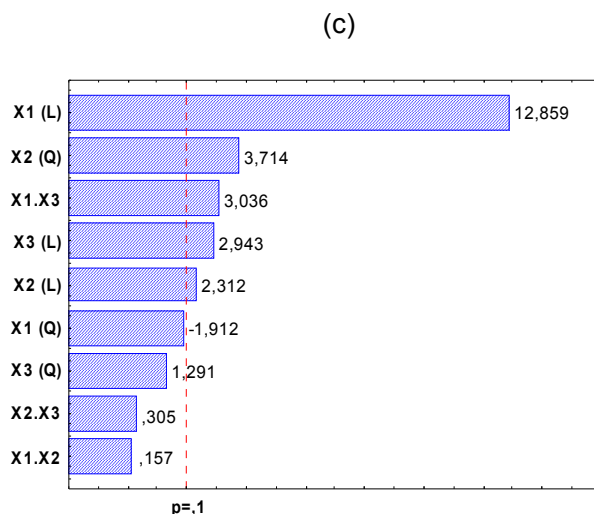
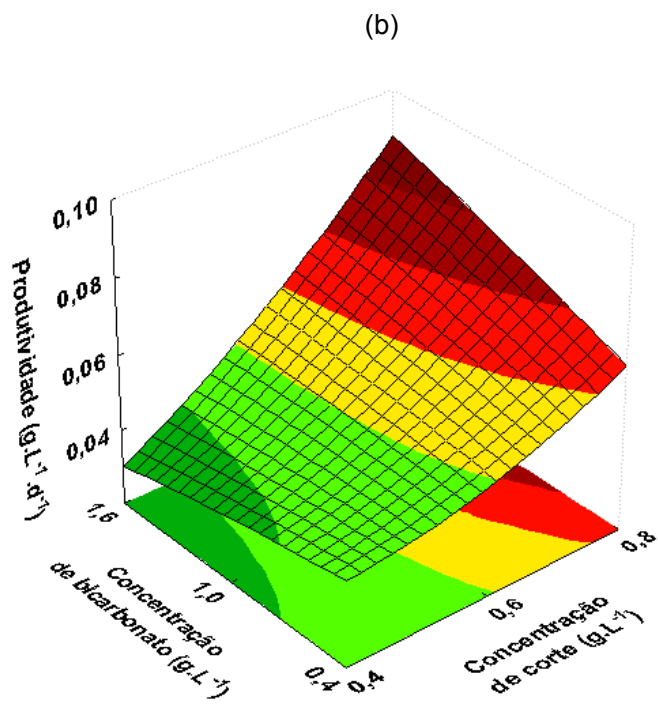
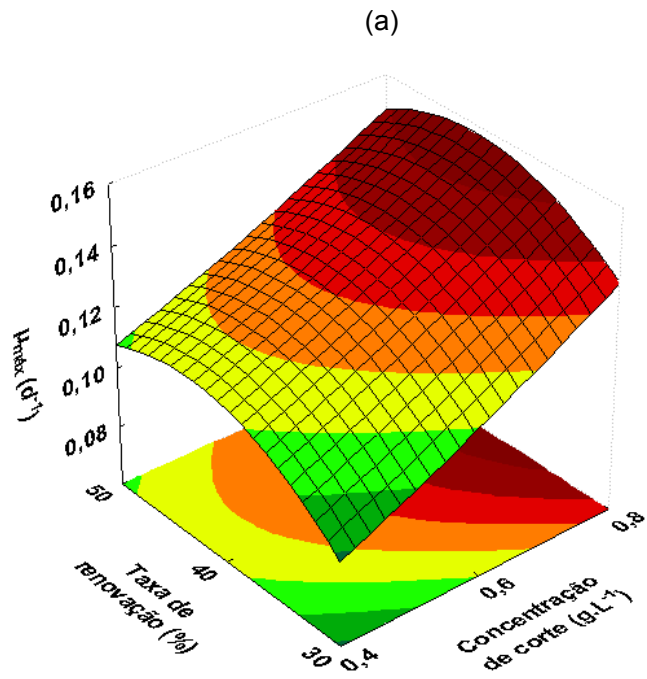


Figura 4 Efeitos principais estimados para (a) velocidade específica de crescimento (μ_x), (b) produtividade (P_x) e (c) concentração de biomassa (X_{biomassa}) em função da concentração celular de corte (X_1), taxa de renovação de meio (X_2) e concentração de bicarbonato de sódio (X_3). Efeito linear (L); Efeito quadrático (Q).

As Figuras 5(a), (b) e (c) mostram as superfícies de resposta para a velocidade específica de crescimento, produtividade e biomassa gerada em função da concentração celular de corte e taxa de renovação de meio utilizando concentração de bicarbonato de sódio $1,6 \text{ g.L}^{-1}$. As máximas velocidades específicas de crescimento foram obtidas com concentração de corte $0,8 \text{ g.L}^{-1}$, taxa de renovação 40% e concentração de bicarbonato de sódio $1,6 \text{ g.L}^{-1}$. Em concentrações mínimas de concentração de corte e concentração de bicarbonato de sódio, associadas à taxa de renovação de meio 40%, verificaram-se as menores velocidades específicas e produtividades. Em relação à biomassa gerada durante o cultivo, as máximas concentrações de biomassa foram obtidas quando a microalga foi cultivada com concentração celular de corte $0,8 \text{ g.L}^{-1}$, taxa de renovação de meio 40% e concentração de bicarbonato de sódio $1,6 \text{ g.L}^{-1}$. Quando a microalga foi cultivada em condições mínimas de concentração de corte ($0,4$ e $0,6 \text{ g.L}^{-1}$) e concentrações de bicarbonato de sódio ($0,4 \text{ g.L}^{-1}$) associadas à condições extremas para taxas de renovação de meio (30 e 50%), foram obtidas as menores concentrações de biomassa.



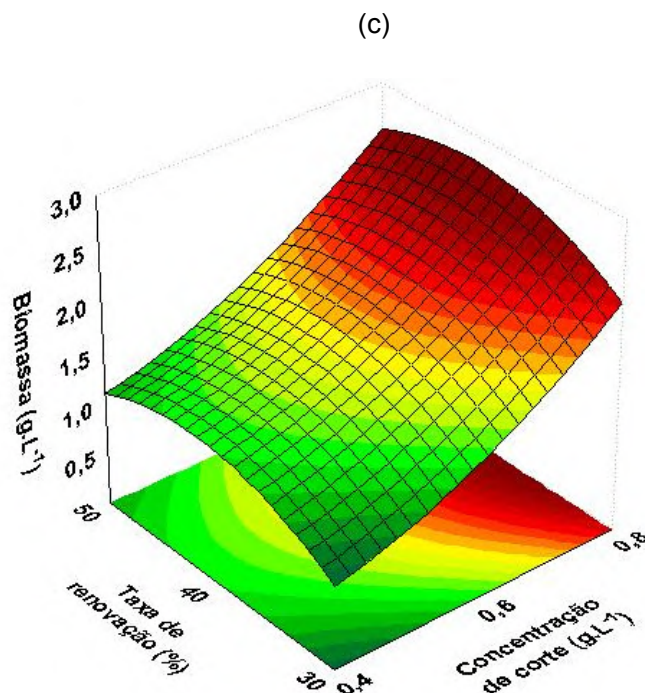


Figura 5 Superfícies de resposta e linhas de contorno para (a) velocidade específica em função da concentração de corte e taxa de renovação de meio utilizando 1,6 g.L⁻¹ de bicarbonato de sódio; (b) produtividade em função da concentração de bicarbonato de sódio e concentração de corte utilizando taxa de renovação de meio 40%; (c) concentração de biomassa gerada durante o cultivo em função da taxa de renovação de meio e concentração de corte utilizando concentração de bicarbonato de sódio 1,6 g.L⁻¹.

O carbono é o elemento necessário em maiores concentrações para microalgas. Sua elevada demanda decorre do fato de que o carbono constitui-se no componente mais importante de todas as substâncias orgânicas sintetizadas pelas células (LOURENÇO, 2006). O ar contém 0,038% de CO₂, sendo necessária a adição de CO₂ ou outra forma de carbono ao cultivo para se obter maiores velocidades específicas de crescimento e produtividades.

RADMANN et al. (2007) obtiveram velocidade específica de crescimento 0,138 d⁻¹ cultivando a microalga *Spirulina* com concentração de corte 0,4 g.L⁻¹, taxa de renovação 40 e 20% meio Zarrouk diluído em água destilada, sendo que, o aumento da concentração de corte para 0,6 g.L⁻¹, concentração de Zarrouk para 50% e redução da taxa de renovação para 20%, causou decréscimo na velocidade específica de crescimento para 0,038 d⁻¹. Os resultados estão parcialmente de acordo com os obtidos neste trabalho, pois conforme reduziu a taxa de renovação de meio de 40% e 50% para 30% e concentração de

bicarbonato de sódio de $1,6 \text{ g.L}^{-1}$ para $0,4 \text{ g.L}^{-1}$, ocorreu um decréscimo na velocidade específica de crescimento, passando de $0,149 \text{ d}^{-1}$ para $0,087 \text{ d}^{-1}$.

REICHERT et al. (2006) estudaram o cultivo semicontínuo da *Spirulina platensis* com meio Zarrouk em fotobiorreator fechado, e obtiveram produtividades máximas de $0,042 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e $0,041 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$, quando utilizaram concentração de corte $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ e taxa de renovação de meio 25% e 50%, respectivamente. Os dados obtidos neste trabalho foram concordantes e superiores aos obtidos por REICHERT et al. (2006), onde as maiores produtividades $0,091 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ e $0,087 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$ foram obtidas com taxas de renovação de meio 30% e 50%, porém com concentração de corte $0,8 \text{ g.L}^{-1}$.

4 CONCLUSÕES

O cultivo semicontínuo da microalga *Chlorella* sp. em fotobiorreator aberto pode ser explorado, combinando fatores, como a concentração celular de corte, taxa de renovação de meio e concentração de bicarbonato de sódio, de forma a atingir as melhores taxas de crescimento para a produção de biomassa da microalga.

A microalga *Chlorella* apresentou as melhores respostas cinéticas para velocidade específica de crescimento e produtividade quando foram mantidas a maior concentração celular de corte ($0,8 \text{ g.L}^{-1}$) e concentração de bicarbonato de sódio ($1,6 \text{ g.L}^{-1}$), associando-se à taxa de renovação de meio 40%.

A maior velocidade específica de crescimento ($0,149 \text{ d}^{-1}$) e produtividade ($0,091 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) foi obtida quando utilizou-se concentração celular de corte $0,6$ e $0,8 \text{ g.L}^{-1}$, taxa de renovação 40 e 30%, concentração de bicarbonato de sódio $1,6 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente.

As variáveis concentração celular de corte, taxa de renovação de meio e concentração de bicarbonato de sódio influenciaram na concentração final de biomassa, sendo alcançados $2,88 \text{ g.L}^{-1}$ ao longo dos 40 d de cultivo, quando a microalga foi cultivada com concentração celular de corte $0,8 \text{ g.L}^{-1}$, taxa de renovação de meio 40% e concentração de bicarbonato de sódio $1,0 \text{ g.L}^{-1}$.

5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a PETROBRÁS – Petróleo Brasileiro S.A. e ao CENPES – Centro de Pesquisas da Petrobrás pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

6 REFERÊNCIAS

BAILEY, J. E. & OLLIS, D. F. Biochemical Engineering Fundamentals 2ª ed. Singapore: McGraw-Hill, 1986.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. J Biotechnol. 70, 313-321, 1999.

COSTA, J. A. V., COLLA, L. M., DUARTE FILHO, P. F. *Spirulina platensis* growth in open raceway ponds using fresh water supplemented with carbon, nitrogen and metal ions. Z. Naturforsch, 58, 76-80, 2003.

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. 18, 603-607, 2002.

COSTA, J. A. V.; LINDE, G. A.; ATALA, D. I. P.; MIBIELLI, G. M.; KRUGER, R. T. Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 16, 15-18, 2000.

DUARTE FILHO, P., COLLA, L., RADMANN, E., COSTA, J. A. V. Estudo do crescimento da microalga *Spirulina platensis* em diferentes agitações, densidades populacionais, temperaturas e meios de cultura. In: Anais do XVIII CBCTA, Porto Alegre, Brasil, 2002.

FÁBREGAS, J., OTERO, A., MASEDA, A., DOMÍNGUEZ, A. Two-stage cultures for the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. Journal of Biotechnology, 89, 65-71, 2001b.

FÁBREGAS, J., PATIÑO, M., MORALES, E. D., CORDERO, B., OTERO, A. Optimal renewal rate and nutrient concentration for the production of the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum* in semicontinuous cultures. Applied and Environmental Microbiology, 62 (1), 266-268, 1996.

FÁBREGAS, J., PATIÑO, M., ARREDONDO-VEGA, B. O., TOBAR, J. L., OTERO, A. Renewal rate and nutrient concentration as tools to modify productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. Applied Microbiology and Biotechnology, 44, 287-292, 1995a.

HENRARD, A. A., MORAIS, M. G., FERNANDES, K. B., COSTA, J. A. V. Cultivo de *Cyanobium* sp. em fotofotobiorreator tubular vertical em modo semicontínuo. In: Anais do XVII COBEQ, Recife, Brasil, 2008.

HENRIKSON, R. Microalga *Spirulina*: Superalimento del futuro. Barcelona: Ediciones S.A. Urano, ISBN: 84-7953-047-2, 1994.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de Microalgas Marinhas – Princípios e Aplicações – São Carlos: RiMa, 2006.

MAREK, R. W., BAZIN, M. J., HOHN, P. Computer control of carbon-nitrogen ratio in *Spirulina platensis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 29, 520-528, 1987.

MIRÓN, A. S., GÓMEZ, A. C., CAMACHO, F. G., GRIMA, E. M., CHISTI, Y. Comparative evolution of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. *Journal of Biotechnology*, 70, 249-270, 1999.

MOHANTY, P., SRIVASTAVA, M., KRISHNA, K. B. The photosynthetic apparatus of *Spirulina*: electron transport and energy transfer. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira)*. Physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997. ISBN 0-7484-0674-3.

MULITERNO, A., MOSELE, P. C., COSTA, J. A. V., HEMKEMEIER, M., BERTOLIN, T. E., COLLA, L. M. Cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina platensis* em batelada alimentada. *Ciênc. Agrotec. Lavras*, 29, 1132–1138, 2005.

OTERO, A., FÁBREGAS, J. Changes in the nutrient composition of *Tetraselmis suecica* cultured semicontinuously with different nutrient concentrations and renewal rates. *Aquaculture*, 159, 111-123, 1997.

PELIZER, L. H., DANESI, E. D. G., RANGEL, C. O., SASSANO, C. E. N., CARVALHO, J. C. M., SATO, S., MORAES, I. O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. *Journal of Food Engineering*, 56 (4), 371-375, 2003.

RADMANN, E. M., REINEHR, C. O., COSTA, J. A. V. Otimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. *Aquaculture*, 265, 118-126, 2007.

REICHERT, C. C., REINEHR, C. O., COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. *Braz J Chem Eng.* 23, 23–28, 2006.

RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J. W., HERDMAN, M. & STANIER, R. G. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111, 1-61, 1979.

SCHMIDELL, W., LIMA, A. U., AQUARONE, E., BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial*. v.2. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira) physiology, cell-biology and biotechnology*. London: Taylor & Francis, ISBN 0-7484-0674-3, 1997.

VONSHAK, A., ABELIOVICH, A., BOUSSIBA, S., ARAD, S., RICHMOND, A. Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. *Biomass*, 2, 175–185, 1982.

6 CONCLUSÕES GERAIS

As microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp. quando cultivadas em meio de cultivo BG11 com suplementação de $0,4 \text{ g.L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio alcançaram as máximas concentrações celulares ($0,56$ e $0,66 \text{ g.L}^{-1}$, velocidades específicas ($0,303$ e $0,166 \text{ d}^{-1}$) e produtividades ($0,120$ e $0,089 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), respectivamente.

Nos cultivos em diferentes tipos de agitações as melhores respostas foram observadas nos ensaios em que se utilizou 2 bombas submersas, apresentando concentrações celulares de $1,21 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,93 \text{ g.L}^{-1}$ e velocidade específica máxima de crescimento $0,183 \text{ d}^{-1}$ e $0,266 \text{ d}^{-1}$, respectivamente. A máxima produtividade ($0,113 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) foi obtida com a microalga *Cyanobium* sp. quando cultivada com apenas 1 bomba submersa.

No cultivo semicontínuo da microalga *Cyanobium* sp. em fotobiorreator tubular vertical fechado, as melhores respostas para velocidades específicas de crescimento e produtividades foram obtidas com concentração celular de corte $1,0 \text{ g.L}^{-1}$, taxa de renovação de meio 30% ou 50% e concentração de bicarbonato de sódio $1,0 \text{ g.L}^{-1}$. Nestas condições os máximos valores para velocidade específica de crescimento, produtividade e número de ciclos foram $0,127 \text{ d}^{-1}$, $0,071 \text{ g.L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e 10 ciclos, respectivamente.

No cultivo da microalga *Chlorella* sp. em fotobiorreator aberto tipo *raceway* em modo semicontínuo, a concentração celular de corte, taxa de renovação de meio e concentração de bicarbonato de sódio apresentaram influência sobre as respostas, sendo que a microalga apresentou as melhores respostas cinéticas quando foram mantidas a maior concentração celular de corte ($0,8 \text{ g.L}^{-1}$) e concentração de bicarbonato de sódio ($1,6 \text{ g.L}^{-1}$), associando-se à taxa de renovação de meio 40%. A máxima velocidade específica de crescimento ($0,149 \text{ d}^{-1}$) e produtividade ($0,091 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) foi obtida quando utilizou-se concentração celular de corte $0,6$ e $0,8 \text{ g.L}^{-1}$, taxa de renovação 40 e 30%, concentração de bicarbonato de sódio $1,6 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Para a concentração final de biomassa foram alcançados $2,88 \text{ g.L}^{-1}$ ao longo dos 40 d de cultivo, quando a microalga foi cultivada com concentração celular de corte $0,8 \text{ g.L}^{-1}$, taxa de renovação de meio 40% e concentração de bicarbonato de sódio $1,0 \text{ g.L}^{-1}$.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A biomassa microalgal vem ganhando destaque no mercado mundial, por apresentarem substâncias de elevado valor nutricional benéficas à saúde. Com isso, muitos sistemas têm sido propostos a fim de otimizar os rendimentos em biomassa. Neste sentido, as condições necessárias de crescimento como, nutrientes que devem ser adicionados no cultivo, concentração inicial de biomassa, e a melhor configuração do fotobiorreator no cultivo de microalgas devem ser exaustivamente estudadas, para se obter as melhores respostas para uma possível otimização do processo.

O cultivo das microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp. em fotobiorreator fechado e aberto, sob modo semicontínuo é uma alternativa para maximizar a produção de microalgas, além disso, o sistema de cultivo deve ser escolhido não apenas pela maior produtividade, mas também de acordo com as características desejadas do produto. Esse processo semicontínuo também possibilita a obtenção de aumento na velocidade específica de crescimento e produtividade, bem como a manutenção do microrganismo em fase de crescimento por um período mais prolongado em relação a cultivos descontínuos.

Trabalhos relacionados ao cultivo semicontínuo de microalgas são desenvolvidos por muitos autores, porém, realizam estudos somente em escala laboratorial, limitando-se apenas a avaliar o efeito de diferentes concentrações de nitrogênio no meio e de diferentes taxas de renovação aplicadas. Além disso, na maioria dos trabalhos os cortes são realizados diariamente. Neste sentido, o processo semicontínuo deve ser estudado em grande escala, variando-se a concentração celular de corte e taxa de renovação de meio, fazendo-se necessário o estudo quanto a viabilidade da sua aplicação, considerando custos com os nutrientes adicionados, quando comparados com cultivos em modo descontínuo.

8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudar o cultivo semicontínuo das microalgas em condições não controladas utilizando a luz do sol como fonte de energia;

Testar o CO₂ como fonte de carbono nos processos semicontínuos, utilizando gás de combustão, a fim de diminuir custos nos cultivos;

Realizar análise da composição de biomassa das microalgas cultivadas nos diferentes modos de cultivo;

Avaliar o perfil de ácidos graxos da *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp.;

Estudar o potencial para produção de biocombustíveis utilizando as microalgas estudadas;

Modelagem matemática da cinética de crescimento das microalgas estudadas nos cultivos semicontínuos, em função da concentração celular de corte, taxa de renovação de meio e concentração de bicarbonato de sódio adicionado no cultivo.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J. RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D., *Biologia molecular da célula*. Editora Artes Médicas, 3 ed., Porto Alegre, RS. 1997.

ANDRADE, M. R., COSTA, J. A. V. Outdoor and indoor cultivation of *Spirulina platensis* in the extreme south of Brazil. *Zeitschrift Naturforschung*, 63, 85-90, 2008.

ANDRADE, M. R., COSTA, J. A. V. Mixotrophic cultivation of Microalga *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. *Aquaculture (Amsterdam)*, 264, 130-134, 2007.

ANDRADE, M. R. Cultivos autotrófico e mixotrófico de *Spirulina platensis* em diferentes escalas e condições ambientais no extremo sul do Brasil. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2005.

BAILEY, J. E. & OLLIS, D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals* 2ª ed. Singapore: McGraw-Hill, 1986.

BAKKER, D. C. E.; BOZEC, Y.; NIGHTINGALE, P. D.; GOLDSON, L.; MESSIAS, M. J.; DE BAAR, H. J. W.; LIDDICOAR, M.; SKJEALVAN, I.; STRASS, V. & WATSON, A. J. Iron and mixing affect biological carbon uptake in Soiree and EisenEx, two Southern Ocean iron fertilization experiments. *Deep-Sea Res. I*, 52, 1001-1019, 2005.

BECKER, E. W. Microalgal in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. (ed) *Handbook of microalgal culture: biochnology and applied phycology*. London: Black Well Science, 312-351, 2004.

BENEMAN, J. R., HUGHES, E. *Energy Convers. Manage.* 38, S467, 1997.

BINAGHI, L., BORGHI, A. D., LODI, A., CONVERTI, A., BORGHI, M. D. Batch and fed-batch uptake of carbon dioxide by *Spirulina platensis*. *Process Biochem.* 38, 1341–1346, 2003.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *J Biotechnol.* 70, 313-321, 1999.

BORZANI, W., SHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E. *Biotecnología Industrial*. v.II. São Paulo - SP. Editora Edgard Blucher Ltda., 541 pp ISBN 04531-012, 2001.

BROWN, M. L. & ZEILER, K. G. Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. *Energy Convers Manage.* 34, 1005-1013, 1993.

BROWN, M. R., JEFFREY, S. W., GARLAND, C. D. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review. *CSIRO Marine Laboratories* 205, 34, 1989.

CAMACHO, F. G., GRIMA, E. M., MIRÓN, A. S., PASCUAL, V. G., CHISTI, Y. Carboxymethyl cellulose protects algal cells against hydrodynamic stress. *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 602–610, 2001.

CAMPO, J. A., GONZÁLEZ, M. G., GUERRERO, M. G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, 1163-1174, 2007.

CEBALLOS, B. J., CERECEDO, R. C., VILLARREAL, H. Use of *Spirulina platensis* meal as feed attractant in diets for shrimp *Litopenaeus schmitti*. *Hidrobiologia*, 17, 113-117, 2007.

CHANG, E.H., YANG, S.S., Some characteristics of microalgae isolated in Taiwan for biofixation of carbon dioxide. *Bot. Bull. Acad. Sin.* v.44, p.43-52, 2003.

CHEN, F. & ZHANG, Y. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. *Enzyme and Microbial Technology*, 20, 221 - 224, 1997.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25, 294-306, 2007a.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, 26, 126-131, 2007b.

COLLA, L. M., MUCCILLO-BAISCH, A. L., COSTA, J. A. V. *Spirulina platensis* effects on the levels of total cholesterol, HDL and triacylglycerols in rabbits fed with a hypercholesterolemic diet. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51, 405-411, 2008.

COLLA, L. M., REINEHR, C. O., REICHERT, C., COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. *Bioresource Technology*, 98, 1489-1493, 2007a.

COLLA, L. M., FURLONG, E. B., COSTA, J. A. V. Antioxidant properties of *Spirulina (Arthospira) platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. *Brazilian archives of biology and technology*, 50, 161-167, 2007b.

COLLA, L. M., BERTOLIN, T. E., COSTA, J. A. V. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. *Z. Naturforsch.* 59c, 55–59, 2004.

COLLA, L., RUIZ, W. A., COSTA, J. A. V. Metabolismo de carbono e nitrogênio em microalgas. *Vetor*, 12, 61 - 78, 2002.

CORNET, J. F., DUSSAP, C. G., GROS, J. B. A simplified monodimensional approach for modeling coupling between radiant light transfer and growth kinetics in photobioreactors. *Chemical Engineering Science*, 50 (9), 1489-1500, 1995.

COSTA, J., SANTANA, F., ANDRADE, M., LIMA, M., FRANCK, D. Microalga biomass and biomethane production in the south of Brazil. *Journal of Biotechnology*, 136S, S402-S459, 2008.

COSTA, J. A. V., MORAIS, M. G., DALCANTON, F., REICHERT, C. C., DURANTE, A. J. Simultaneous cultivation of *Spirulina* and the toxigenic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. *Z Naturforsch.* 61c, 105-110, 2006.

COSTA, J. A. V., COLLA, L. M., DUARTE FILHO, P. F. Improving *Spirulina platensis* biomass yield using a fed-batch process. *Bioresource Technology*, 92, 237-241, 2004.

COSTA, J. A. V., COLLA, L. M., DUARTE FILHO, P. F. *Spirulina platensis* growth in open raceway ponds using fresh water supplemented with carbon, nitrogen and metal ions. *Z. Naturforsch.* 58, 76-80, 2003.

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.* 18, 603-607, 2002.

COSTA, J. A. V., COZZA, K. L., OLIVEIRA, L., MAGAGNIN, G. Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 17, 439-442, 2001.

COSTA, J. A. V.; LINDE, G. A.; ATALA, D. I. P.; MIBIELLI, G. M.; KRUGER, R. T. Modelling of growth conditions for cyanobacterium *Spirulina platensis* in microcosms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 16, 15-18, 2000.

COUTTEAU, P. Micro-algae In: PLAVENS; SORGELOOS, P. Manual on the production and use of live food for aquaculture, FAO Fisheries Technical Paper 361, 7-48, 1996.

COZZA, K. L. *Spirulina platensis* em meios naturais e sintéticos: fatores nutricionais e custos. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos – FURG, Rio Grande, 1999.

DANESI, E. D. G., RANGEL-YAGUI, C. O., CARVALHO, J. C. M., SATO, S. Na investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass and Bioenergy*, 23, 261-269, 2002.

DERNER, R. B. Crescimento da microalga *Thalassiosira fluviatilis* (classe *Bacillariophyceae*) sob diferentes regimes de iluminação, na região sul do Brasil. Dissertação de Mestrado – Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 108, 1995.

DUARTE FILHO, P. F. M. Crescimento da cianobactéria *Spirulina platensis* em diferentes configurações de fotofotobiorreator e condições de cultivo. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos – FURG, Rio Grande, 2002.

DUARTE FILHO, P., COLLA, L., RADMANN, E., COSTA, J. A. V. Estudo do crescimento da microalga *Spirulina platensis* em diferentes agitações, densidades populacionais, temperaturas e meios de cultura. In: Anais do XVIII CBCTA, Porto Alegre, Brasil, 2002.

EHRENFELD, J., COUSIN, J. L. Ionic regulation of the unicellular green alga *Dunaliella tertiolecta*: response to hypertonic shock. *Journal of Membrane Biology*, 77, 45-52, 1984.

FÁBREGAS, J., MASEDA, A., DOMINGUES, A., OTERO, A. The cell composition of *Nannochloropsis* sp. changes under different irradiances in semicontinuous culture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 20, 31–35, 2004.

FABREGAS, J., OTERO, A., DOMINGUEZ, A., PATINO, M., Growth rate of the microalga *Tetraselmis suecica* changes the biochemical composition of *Artemia* species. *Mar. Biotechnol.* 3, 256–263, 2001a.

FÁBREGAS, J., OTERO, A., MASEDA, A., DOMÍNGUEZ, A. Two-stage cultures for the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Biotechnology*, 89, 65-71, 2001b.

FÁBREGAS, J., PATIÑO, M., MORALES, E. D., CORDERO, B., OTERO, A. Optimal renewal rate and nutrient concentration for the production of the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum* in semicontinuous cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (1), 266-268, 1996.

FÁBREGAS, J., PATIÑO, M., ARREDONDO-VEGA, B. O., TOBAR, J. L., OTERO, A. Renewal rate and nutrient concentration as tools to modify productivity and biochemical composition of cyclostat cultures of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44, 287-292, 1995a.

FÁBREGAS, J., PATIÑO, M., VECINO, E., CHÁZARO, F., OTERO, A. Productivity and Biochemical Composition of Cyclostat Cultures of the Marine Microalga *Tetraselmis suecica*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, 617-621, 1995b.

- FOX, R. D. *Spirulina* production & potential. França: Edisud, 1996. ISBN 2-84744-883-X.
- GORHAM, P. R., MCLACHLAN, J., HARMER, U. T. & KIM, W. H. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lingb.). Verh. Internat. Verein Limnol. (15): 769-780, 1964.
- GOLDMAN, J. C. Outdoor algal mass cultures: II . photosynthetic yield limitations. Algae Biomass, [S.1], v. 11, p. 119-135, 1980.
- GOODWIN, T. W. Functions of carotenoids. In Goodwin, T. W. (ed.), The biochemistry of the carotenoids, Chapter 3. Chapman and Halkl, New York. 77-95. 1980.
- GOUVEIA, L., CHOUBERT, G., GOMES, E., REMA, P., EMPIS, J. Use of *Chlorella vulgaris* as a carotenoid source for rainbow trout: effect of dietary lipid content on pigmentation, digestibility and retention in the muscle tissue. Aquaculture International, 6, 269-279, 1998.
- GRIMA, E. M., SEVILLA, J. M. F., PÉREZ, J. A. S., CAMACHO, F. G. A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. Journal of Biotechnology, 45, 59-69, 1996.
- GRINSTEAD, G. S., TOKACH, M. D., DRITZ, S. S., GOODBAND, R. D., NELSSSEN, J. L. Effects of *Spirulina platensis* on growth performance of weanling pigs. Animal Feed Science and Technology, 83, 237-247, 2000.
- GROBBELAAR, J. U. Photosynthetic characteristics of *Spirulina platensis* grown in commercial-scale open outdoor raceway ponds: what do the organisms tell us? Journal of Applied Phycology, 19, 591-598, 2007.
- GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. pp 26-60. In Smith, W. L. and Chanley, M. H. (eds.) Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press, New York, USA, 1975.
- GUILLARD, R. R. L. & RYTHER, J. H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. Can. J. Microbiol. 8: 229-239, 1962.
- HENRARD, A. A., MORAIS, M. G., FERNANDES, K. B., COSTA, J. A. V. Cultivo de *Cyanobium* sp. em fotofotobiorreator tubular vertical em modo semicontínuo. In: Anais do XVII COBEQ, Recife, Brasil, 2008.
- HENRIKSON, R. Microalga *Spirulina*: Superalimento del futuro. Barcelona: Ediciones S.A. Urano, ISBN: 84-7953-047-2, 1994.

HOSAKA, K., HIOKI, T., FURUUNE, H., TANISHITA, K., Augmentation of microalgae growth due to hydrodynamic activation. *Energy Conversion Management*, 36 (6-9), 725–728, 1995.

HUANG, Z., LI, L., HUANG, G., YAN, Q., SHI, B., XU, X. Growth – inhibitory and metal – binding proteins in *Chlorella vulgaris* exposed to cadmium or zinc. *Aquatic Toxicology* 91, 54–61, 2009.

ILLMAN, A.M., SCRAGG, A.H., SHALES, S.W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when in low nitrogen medium. *Enzyme Microb Tech.* 27, 631-635, 2000.

JANSSEN, M., SLENDERS, P., TRAMPER, J., MUR, L. R., WIJFFELS, R. H. Photosynthetic efficiency of *Dunaliella tertiolecta* under short light/dark cycles. *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 298–305, 2001.

JIMÉNEZ, C., COSSIO, B., LABELLA, D., NIELL, F. X. The feasibility of industrial production of *Spirulina (Arthrospira)* in Southern Spain. *Aquaculture* 217, 179–190, 2003.

KAPLAN, A., REINHOLD, L. CO₂ concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular*, 50, 539-570, 1999.

KAPLAN, D., RICHMOND, A. E., DUBINSKY, Z., AARONSON, S. Algal Nutrition. In: RICHMOND, A. *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Boston: CRC Press, 1990.

KOMÁREK, J., KOPECKÝ, J., CEPÁK, V. Generic characters of the simplest cyanoprokaryotes *Cyanobium*, *Cyanobacterium* and *Synechococcus*. *Cryptogamie, Algol.*, 20 (3), 209-222, 1999.

KOTZABASIS, K., HATZIATHANASIOU, A., RUIGOMEZ, M.V.B., KENTOURI, M., DIVANACH, P. Methanol as alternative carbon source for quicker efficient production of the microalgae *Chlorella minutissima*: Role of the concentration and frequency of administration. *Journal of Biotechnology*. v.70, p.357-362, 1999.

KRINSKY, N. I. Carotenoid protection against oxidation. *Pure and Applied Chemistry*. 51, 649-660. 1979.

LAWS, E. A., TERRY, K. L., WICKMAM, J., CVHALUP, M. S. A simple algal production system deigned to utilize the flashing light effect. *The Biological and bioengineering*. 25:2319-2336, 1983.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L., COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 2a. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. ISBN 85-7378-026-6.

LOPES, T. M., COSTA, J. A. V., TRINDADE, G. S. Differences in the sensibility of multi-drug resistant (MDR) and non-MDR human tumor cells to different concentrations of *Spirulina platensis*. In: Les Cyanobactéries pour la Santé, la Science et le Développement, Embiez Island, p. 42, 2004.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de Microalgas Marinhas – Princípios e Aplicações – São Carlos: RiMa, 2006.

LOURENÇO, S. O., BARBARINO, E., LAVÍN, P. L., MARQUEZ, U. M. L. & AIDAR, E. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae. Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. Eur. J. Phycol., 39 (1), 17-32, 2004.

LOURENÇO, S. O. Variação da Composição Bioquímica de Microalgas Marinhas em Cultivo, com Ênfase nos Efeitos da Disponibilidade do Elemento Nitrogênio. Tese de doutorado em Oceanografia Biológica. USP, São Paulo, Brasil. 1996.

MAREK, R. W., BAZIN, M. J., HOHN, P. Computer control of carbon-nitrogen ratio in *Spirulina platensis*. Biotechnology and Bioengineering, 29, 520-528, 1987.

MARGULIS, L., SCHWARTZ, K. V. Cinco reinos: Um Guia Ilustrado dos Filos da Vida na Terra, Terceira Edição. Editora Guanabara Koogan, 2001.

MENDIOLA, J. A., MARTÍNEZ, D. G., RUPÉREZ, F. J., ÁLVAREZ, P. J. M., REGLERO, G., CIFUENTES, A., BARBAS, C., IBAÑES, E., SEÑORÁNS, F. J. Enrichment of vitamin E from *Spirulina platensis* microalga by SFE. Journal of Supercritical Fluids, 43, 484-489, 2008.

MIRÓN, A. S., GÓMEZ, A. C., CAMACHO, F. G., GRIMA, E. M., CHISTI, Y. Comparative evolution of compact photobioreactors for large-scale monoculture of microalgae. Journal of Biotechnology, 70, 249-270, 1999.

MITSUHASHI, S., FUJIMOTO, M., MURAMATSU, H., TANISHITA, K. Effect of simple shear flow on photosynthesis rate and morphology of micro algae. Acta Astronautica, 33, 179-187, 1994.

MOHANTY, P., SRIVASTAVA, M., KRISHNA, K. B. The photosynthetic apparatus of *Spirulina*: electron transport and energy transfer. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*). Physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997. ISBN 0-7484-0674-3.

MOLINA, E. G., FERNADEZ, F. G. A., CAMACHO, F. G., SEVILLA, J. M. F. Fotobiorreactores. In: Biotecnologia Algal, 1., 2004, Buenos Aires- Argentina. Biotecnologia Algal. Buenos Aires-Argentina, 2004.

MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V. Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, 32, 1245-1251, 2008a.

MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V. Bioprocessos para remoção de dióxido de carbono e óxido de nitrogênio por microalgas. Química Nova, 31, 1038-1042, 2008b.

MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V. Photo bioreactor tubular for removing or fixing of carbon dioxide, greenhouse gases using micro algae and cyan bactéria, involves reducing emissions of main gás responsible for global warming and other gases of greenhouse effect. Patent Number: BR200702736-A, 2008c.

MORAIS, M. G., DALCANTON, F., REICHERT, C. C., MARINS, L. F., DURANTE, A. J., COSTA, J. A. V. Isolation and cultivation of a new strain of *Arthrospira* from Mangueira Lagoon in Southern Brazil. Zeitschrift für Naturforschung. C, A Journal of Biosciences, 63, 144-150, 2008.

MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V. Carbon dioxide biofixation with *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. Biotechnol Letters. 29, 1349–1352, 2007a.

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, 129, 439-445, 2007b.

MORAIS, M. G., COSTA, J. A. V. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. Energy Conversion & Management, 48, 2169-2173, 2007c.

MORAIS, M. G., MIRANDA, M. Z., COSTA, J. A. V. Biscoitos de chocolate enriquecidos com *Spirulina platensis*: Características físicoquímicas, sensoriais e digestibilidade. Alimentos e Nutrição, 17, 323-328, 2006.

MULITERNO, A., MOSELE, P. C., COSTA, J. A. V., HEMKEMEIER, M., BERTOLIN, T. E., COLLA, L. M. Cultivo mixotrófico da microalga *Spirulina platensis* em batelada alimentada. Ciênc. Agrotec. Lavras, 29, 1132–1138, 2005.

- NAVALHO, J. Biotecnologia de *Danuliella salina* para a produção de beta-caroteno. 1998. 112 f. Dissertação (Mestrado em Aquacultura) – Universidade de Algarve, Algarve, 1998.
- OGBONNA, J. C., TANAKA, H. Light requirement and photosynthetic cell cultivation: development of processes for efficient light utilization in photobioreactors. *J Appl Phycol.* 12, 201 – 207, 2000.
- OGBONNA, J. C., TANAKA, H. Cyclic autotrophic/heterotrophic cultivation of photosynthetic cells: a method of achieving continuous cell growth under light/dark cycles. *Bioresource Technol.* 65, 65-72, 1998.
- OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*, 20, 459–466, 2003.
- OLIVEIRA, A. Crescimento das diatomáceas *Bacillariophyceae Chaetoceros* sp., *Skeletonema costatum* e *Thalassiosira fluviatilis* em diferentes meios de cultivo e em condições controladas de temperatura e salinidade. Dissertação de Mestrado-Centro de Ciências Agrárias. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, p. 64, 1995.
- ONO, E. & CUELLO, J. L. Design parameters of solar concentrating systems for CO₂-mitigating algal photobioreactors. *Energy.* 29, 1651–1657, 2004.
- OTERO, A., FÁBREGAS, J. Changes in the nutrient composition of *Tetraselmis suecica* cultured semicontinuously with different nutrient concentrations and renewal rates. *Aquaculture*, 159, 111-123, 1997.
- PATIL, G., CHETHANA, S., MADHUSUDHAN, M. C., RAGHAVARAO, K. S. M. S. Fractionation and purification of the phycobiliproteins from *Spirulina platensis*. *Bioresource Technology*, 99, 7353-7396, 2008.
- PIORRECK, M., BAASCH, K. H., POHL, P. Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry*, 23 (2), 207-216, 1984.
- PIRT, S. J. The thermodynamic efficiency (quantum demand) and dynamics of photosynthetic growth. *New Phytologist*, 102, 3-37, 1986.
- POLI, C. R., POLI, A. T., ANDRATTA, E., BELTRAME, E. *Aqüicultura Experiências Brasileira*. Florianópolis, SC. Multitarefa Editora Ltda, CDD: 639,30981, 2004.
- POWELL, C. K., CHADDOCK, J. B., DIXON, J. R. The motion of algae in turbulent flow. *Biotechnology and Bioengineering*, 7, 295-308, 1965.

PULZ, O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl microbiol biotechnol*, 57, 287–293. 2001.

RADMANN, E. M., COSTA, J. A. V. Lipid content and fatty acids composition variation of microalgae exposed to CO₂, SO₂ and NO. *Química Nova*, 31, 1609-1612, 2008.

RADMANN, E. M., REINEHR, C. O., COSTA, J. A. V. Otimization of the repeated batch cultivation of microalga *Spirulina platensis* in open raceway ponds. *Aquaculture*, 265, 118-126, 2007.

REICHERT, C. C., REINEHR, C. O., COSTA, J. A. V. Semicontinuous cultivation of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in a closed photobioreactor. *Braz J Chem Eng.* 23, 23–28, 2006.

REINEHR, C. O. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em modo semicontínuo. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – FURG, Rio Grande, 2003.

RICHMOND, A. Handbook of microalgal mass culture. Boston: CRC Press. ISBN 0-8493-3240-0, 1990.

RICHMOND, A., GROBBELAAR, J. U. Factors affecting the output rate of *Spirulina platensis* with reference to mass cultivation. *Biomass*, 10, 253–264, 1986.

RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J. W., HERDMAN, M. & STANIER, R. G. Genetic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111, 1-61, 1979.

ROMANO, I., BELLITTI, R., NICOLAUS, B., LICIA LAMA, M., MANCA, M. C., PAGNOTTA, E., GAMBACORTA, A. Lipid profile: a chemotaxonomic marker for classification of a new cyanobacterium in *Spirulina* genus. *Phytochemistry*, 54, 289-294, 2000.

RORRER, G. L., CHENEY, D. P. Bioprocess engineering of cell and tissue cultures for marine seaweeds. *Aquacultural Engineering*, 32, 11-41, 2004.

ROUBICEK, R.V., PATTON, J. T., MCCORKLE, J. H., RAKOW, A.L. Novel pond designs. In *algal biomass technologies: an interdisciplinary perspective* (Edited by Barclay, W., Mcintosh, R) 218-221, 1985.

SAJILATA, M. G., SINGHAL, R. S., KAMAT, M. Y. Fractionation of lipids and purification of γ - linolenic acid (GLA) from *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*, 109, 580-586, 2008.

SAKAI, N., SAKAMOTO, Y., KISHIMOTO, N., CHIHARA, M., KARUBE, I. *Chlorella* strains from hot springs tolerant to high temperature and high CO₂. *Energ Convers Manage.* 16, 693-696, 1995.

SANTOS, R. C. Influência da temperatura, iluminância e taxa de aeração na concentração de biomassa da cianobactéria *Spirulina platensis*. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos – FURG, Rio Grande, 2001.

SASSANO, C. E. N., GIOIELLI, L. A., ALMEIDA, K. A., SATO, S., PEREGO, P., CONVERTI, A., CARVALHO, J. C. M. Cultivation of *Spirulina platensis* by continuous process using ammonium chloride as nitrogen source. *Biomass and Bioenergy*, 31, 593-598, 2007.

SCHMIDELL, W., LIMA, A. U., AQUARONE, E., BORZANI, W. *Biotechnologia Industrial.* v.2. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

SCRAGG, A. H., MORRISON, J., SHALES, S. W. The use of a fuel containing *Chlorella vulgaris* in a diesel engine. *Enzyme Microb Tech.* 33, 884 - 889, 2003.

SCRAGG, A. H., ILLMAN, A. M., CARDEN, A., SHALES, S. W. Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. *Biomass and Bioenergy*, 23, 67–73, 2002.

SIEFERMANN-HARMS, D. The role of carotenoids in chloroplasts of higher plants. *Biogenesis and function of plant lipids.* Elsevier North-holland. Biochemical Press, Amsterdam. 331-340, 1980.

SMITH, G. J., ZIMMERMAN, R. C., ALBERTE, R. Molecular and physiological responses of diatoms to variable levels of irradiance and nitrogen availability: growth of *Skeletonema costatum* in simulated upwelling conditions. *Limnology and Oceanography*, 37, 989-1302, 1992.

SILVEIRA, S. T., BURKERT, J. F. M., COSTA, J. A. V., BURKERT, C. A. V., KALIL, S. J. Optimization of phycocyanin extraction from *Spirulina platensis* using factorial design. *Bioresource Technology*, 98, 1629-1634, 2007.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H., PELICIONE, L. C., OLIVEIRA, A. Use of inorganic (NPK) and the Chu₁₂ medium for cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* in laboratory. *Brazilian Journal of Ecology.* 3, 32-37, 1999.

SOLETTI, D., BINAGHI, L., LODI, A., CARVALHO, J. C. M., CONVERTI, A. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. *Aquaculture*, 243, 217-224, 2005.

STEWART, C., HESSAMI, M. A. A study of methods of carbon dioxide capture and sequestration – the sustainability of a photosynthetic bioreactor approach. *Energy Conversion and Management*, 46, 403–420, 2005.

SUNDA, W. G.; PRICE, N. M.; & MOREL, F. M. M. Trace metal ion buffers and their use in culture studies. In: *Algal Culturing Techniques*, San Diego, 35-63, 2005.

TOMASELLI, I. Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira (Spirulina)*. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira)*. Physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997. ISBN 0-7484-0674-3.

TOMASELLI, L., GIOVANNETTI, L., TORZILLO, G. Physiology of stress response in *Spirulina* sp. *Bulletin de l'Institut Océanographique Monaco*, 12, 1993.

TORZILLO, G. Tubular bioreactors. In: Vonshak, A. *Spirulina platensis (Arthrospira)* Physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, 1997.

TORZILLO, G., SACCHI, A., MATERASI, R. Temperature as an important factor affecting productivity and night biomass loss in *Spirulina platensis* grown outdoors in tubular photobioreactors. *Bioresource Technology*, 38, 95-100, 1991.

TRAVIESO L., HALL, D. O., RAO, K. K., BENÍTEZ, F., SÁNCHEZ, E., BORJA, R. A helical tubular photobioreactor producing *Spirulina* in a semicontinuous mode. *Int Biodeter Biodegr*. 47, 151 – 155, 2001.

TREVAN, M. D., BOFFEY, S., GOULDING, K. H., STANBURY, P. *Biotechnology: princípios biológicos*. Zaragoza: Ed. Acríbia, 1990.

VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira)* physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, ISBN 0-7484-0674-3, 1997.

VONSHAK, A., ABELIOVICH, A., BOUSSIBA, S., ARAD, S., RICHMOND, A. Production of *Spirulina* biomass: effects of environmental factors and population density. *Biomass*, 2, 175–185, 1982.

WATANABE, A. List of algal strains in collection at the Institute of Applied Microbiology University of Tokyo. *J Gen Appl Microbiol*. 6, 1–4, 1960.

WEBER, A., KABKE, K., COLLA, L. M., DUARTE FILHO, P. Estudo da viabilidade técnica da utilização da água da Lagoa Mangueira para a produção de microalgas de valor comercial. Trabalho de graduação em Engenharia de Alimentos – FURG, Rio Grande, 1999.

ZHANG, X. W., ZHANG, Y. M., CHEN, F. Application of mathematical models to the determination optimal glucose concentration and light intensity for mixotrophic culture of *Spirulina platensis*. *Process Biochemistry*, 34, 477-481, 1999.

10 ANEXOS

10.1 Fotografias dos experimentos



Figura A1 Cultivos realizados em fotobiorreatores tipo erlenmeyer de 0,5 L.



Figura A2 Fotobiorreatores abertos tipo *raceway* utilizados no cultivo das microalgas *Cyanobium* e *Chlorella*.



Figura A3 Cultivos com a microalga *Cyanobium* realizados em fotobiorreatores tubulares de 2 L.

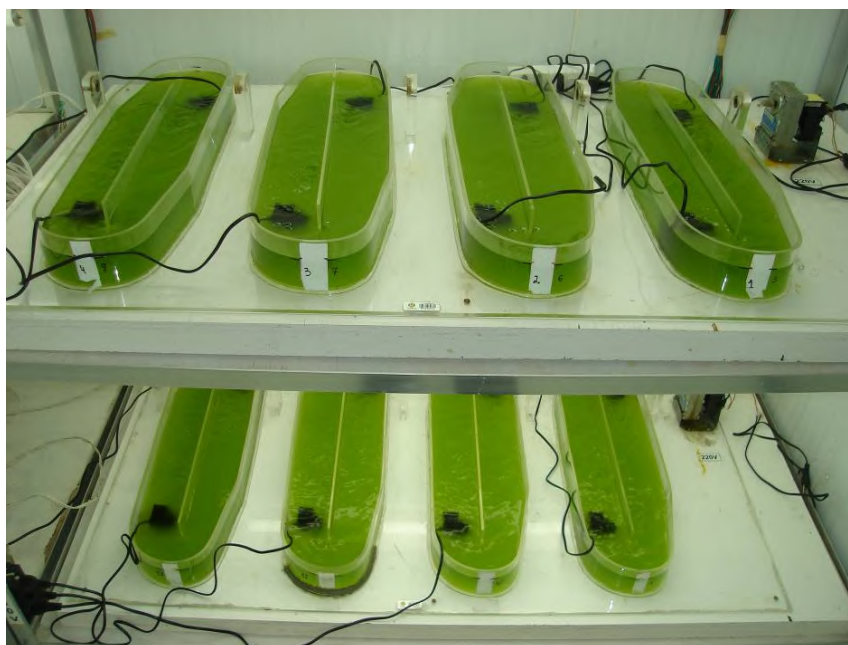


Figura A4 Cultivos com a microalga *Chlorella* realizados em fotobiorreatores abertos tipo *raceway* de 6 L.

10.2 Meios de cultivo

10.2.1 Meio ASM (GORHAM, 1964)

Tabela A1 Composição do Meio ASM

Reagentes	Quantidade (g.L ⁻¹)	
Solução A (20 mL.L⁻¹)	NaNO ₃	8,5
	MgSO ₄	2,45
	MgCl ₂	2,05
	CaCl ₂	1,45
Solução B (2 mL.L⁻¹)	K ₂ HPO ₄	8,7
	Na ₂ HPO ₄	17,8
Solução C (0,1 mL.L⁻¹)	H ₃ BO ₃	24,8
	MnCl ₂	13,9
	FeCl ₃	10,8
	ZnCl ₂	3,35
	CoCl ₂	0,19
	CuSO ₄	0,014
Solução D (0,4 mL.L⁻¹)	Na ₂ EDTA	18,6

Fonte: GORHAM, 1964.

10.2.2 Meio BG11 (RIPPKA et al., 1979).

Tabela A2 Composição do meio BG11.

Reagente	Quantidade (g.L ⁻¹)
NaNO ₃	1,50
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,036
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,075
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	0,04
Citrato férrico	0,006
EDTA	0,001
Na ₂ CO ₃	0,02
Ácido cítrico	0,006

Fonte: RIPPKA, 1979.

Solução A5: (g.L⁻¹): H₃BO₃: 2,86.10⁻³; MnSO₄.H₂O: 1,70.10⁻³; ZnSO₄. 7H₂O: 0,222.10⁻³; Na₂MoO₄.2H₂O: 0,39.10⁻³; CuCO₄.5H₂O: 0,079.10⁻³; CoCl₂.6H₂O: 0,04.10⁻³.

10.2.3 Meio H/2 (GUILLARD & RYTHER, 1975).

Tabela A3 Composição do meio H/2.

	Reagentes	Quantidade (g.L ⁻¹)	Quantidade (mL)
Solução (1) traço metais	FeCl ₃ ·6H ₂ O	3,15	-
	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	4,36	-
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	9,8	1,0
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	6,3	1,0
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	22,0	1,0
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	10,0	1,0
	MnCl ₂ ·4H ₂ O	180,0	1,0
	água destilada	-	1000
Solução (2) vitaminas	Vitamina B ₁₂	1,0	1,0
	Biotina	0,1	10,0
	Tiamina	-	200,0 mg
	água destilada	-	1000
Meio H/2	NaNO ₃	75,0	1,0
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	5,0	1,0
	NH ₄ Cl	26,8	1,0
	Solução (1)	-	1,0
	Solução (2)	-	0,5
	água destilada (qsp)	-	1000

Fonte: GUILLARD & RYTHER, 1975.

10.2.4 Meio Bristol's Modificado MBM (WATANABE, 1960).

Tabela A4 Composição do meio MBM.

Reagente	Quantidade (g.L ⁻¹)
KNO ₃	0,25
CaCl ₂	0,01
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,075
K ₂ HPO ₄	0,075
KH ₂ PO ₄	0,175
NaCl	0,025
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,02
Solução A5	1 mL

Fonte: WATANABE, 1960.

Solução A5: (g.L⁻¹): H₃BO₃: 2,86; MnCl₂. 4H₂O: 1,81; ZnSO₄. 7H₂O: 0,222; CuCO₄.5H₂O:0,079; MnO₃: 0,015.

10.2.5 Meio MC (WATANABE, 1960)

Tabela A5 Composição do meio MC.

Reagente	Quantidade (g.L ⁻¹)
KNO ₃	1,25
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,25
KH ₂ PO ₄	1,25
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,02
Solução A5	1 mL

Fonte: WATANABE, 1960.

Solução A5: (g.L⁻¹): H₃BO₃: 2,86; MnCl₂. 4H₂O: 1,81; ZnSO₄. 7H₂O: 0,222; CuCO₄.5H₂O:0,079; MnO₃: 0,015.

10.3 Planilhas de acompanhamento da concentração celular das microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp. nos cultivos

Tabela A6 Acompanhamento diário da concentração celular (g.L^{-1}) para a microalga *Cyanobium* sp. Artigo Cultivo das microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp. em diferentes condições nutricionais e de processo.

tempo (d)	ASM	BG11	BG11 + NaHCO ₃	H/2	H/2 + NaHCO ₃
0	0,080	0,101	0,104	0,096	0,108
1	0,105	0,143	0,209	0,124	0,202
2	0,246	0,183	0,236	0,223	0,231
3	0,297	0,248	0,329	0,242	0,287
4	0,348	0,301	0,358	0,295	0,312
5	0,357	0,373	0,383	0,317	0,357
6	0,290	0,420	0,496	0,314	0,400
7	0,164	0,452	0,524	0,324	0,460
8	0,135	0,428	0,528	0,297	0,466
9	0,155	0,447	0,543	0,322	0,469
10	0,160	0,449	0,559	0,312	0,456

Tabela A7 Acompanhamento diário da concentração celular (g.L^{-1}) para a microalga *Chlorella* sp. Artigo Cultivo das microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp. em diferentes condições nutricionais e de processo.

Tempo d)	BG11	BG11 + NaHCO₃	H/2	H/2 + NaHCO₃	MBM	MBM + NaHCO₃	MC	MC + NaHCO₃
0	0,204	0,201	0,207	0,210	0,203	0,209	0,212	0,208
1	0,291	0,294	0,245	0,239	0,243	0,285	0,254	0,261
2	0,334	0,336	0,281	0,274	0,256	0,324	0,267	0,288
3	0,358	0,384	0,319	0,316	0,288	0,319	0,311	0,279
4	0,403	0,451	0,322	0,322	0,311	0,342	0,367	0,334
5	0,392	0,470	0,338	0,329	0,339	0,368	0,345	0,326
6	0,433	0,493	0,359	0,361	0,347	0,382	0,372	0,353
7	0,475	0,557	0,302	0,370	0,362	0,406	0,398	0,376
8	0,482	0,608	0,298	0,369	0,346	0,428	0,388	0,365
9	0,522	0,623	0,273	0,391	0,366	0,443	0,355	0,399
10	0,536	0,663	0,225	0,382	0,375	0,472	0,372	0,421

Tabela A8 Acompanhamento diário da concentração celular (g.L^{-1}) para a microalga *Cyanobium* sp. Artigo Cultivo das microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp. em diferentes condições nutricionais e de processo.

Tempo (d)	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7	Exp. 8
0	0,341	0,332	0,322	0,329	0,357	0,359	0,348	0,341
1	0,263	0,289	0,291	0,278	0,469	0,473	0,331	0,332
2	0,220	0,263	0,179	0,272	0,592	0,605	0,355	0,344
3	0,221	0,149	0,181	0,194	0,638	0,692	0,392	0,342
4	0,222	0,161	0,163	0,180	0,695	0,762	0,433	0,339
5	0,253	0,170	0,225	0,211	0,769	0,832	0,459	0,358
6	0,269	0,102	0,278	0,257	0,810	0,856	0,443	0,340
7	0,268	0,080	0,310	0,301	0,878	0,881	0,427	0,321
8	0,242	0,079	0,354	0,352	0,960	0,979	0,507	0,318
9	0,221	0,081	0,382	0,379	1,078	1,037	0,582	0,354
10	0,230	0,072	0,409	0,402	1,214	1,119	0,687	0,402

1: pás rotativas; **2:** pás rotativas e cortina porosa; **3:** pás rotativas e pedras alongadas; **4:** pás rotativas e pedras cilíndricas; **5:** 2 bombas submersas; **6:** 1 bomba submersa; **7:** cortina porosa; **8:** pedras alongadas.

Tabela A9 Acompanhamento diário da concentração celular (g.L^{-1}) para a microalga *Chlorella* sp. Artigo Cultivo das microalgas *Cyanobium* sp. e *Chlorella* sp. em diferentes condições nutricionais e de processo.

Tempo (d)	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7	Exp. 8
0	0,211	0,208	0,199	0,202	0,203	0,205	0,204	0,211
1	0,278	0,267	0,285	0,189	0,297	0,275	0,221	0,225
2	0,311	0,298	0,226	0,248	0,398	0,299	0,235	0,233
3	0,325	0,341	0,278	0,284	0,509	0,347	0,246	0,229
4	0,351	0,312	0,251	0,311	0,651	0,399	0,259	0,218
5	0,382	0,391	0,299	0,309	0,733	0,418	0,255	0,207
6	0,399	0,388	0,342	0,364	0,728	0,501	0,272	0,199
7	0,378	0,421	0,318	0,392	0,805	0,566	0,281	0,213
8	0,447	0,452	0,372	0,411	0,874	0,643	0,263	0,187
9	0,466	0,417	0,402	0,427	0,891	0,674	0,242	0,208
10	0,481	0,410	0,438	0,409	0,935	0,712	0,231	0,210

1: pás rotativas; **2:** pás rotativas e cortina porosa; **3:** pás rotativas e pedras alongadas; **4:** pás rotativas e pedras cilíndricas; **5:** 2 bombas submersas; **6:** 1 bomba submersa; **7:** cortina porosa; **8:** pedras alongadas.

Tabela A10 Acompanhamento diário da concentração celular (g.L^{-1}) para a microalga *Cyanobium* sp. Artigo Fotobiorreator tubular vertical para cultivo de microalga em modo semicontínuo.

tempo (d)	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7	Exp. 8
0	0,411	0,378	0,400	0,399	0,408	0,396	0,394	0,372
1	0,428	0,426	0,421	0,511	0,402	0,404	0,277	0,300
2	0,416	0,463	0,449	0,494	0,385	0,440	0,267	0,301
3	0,497	0,565	0,537	0,590	0,421	0,465	0,284	0,274
4	0,503	0,663	0,639	0,673	0,475	0,578	0,322	0,367
5	0,469	0,647	0,636	0,637	0,439	0,490	0,326	0,384
6	0,531	0,710	0,710	0,723	0,474	0,513	0,404	0,384
7	0,584	0,745	0,746	0,707	0,498	0,544	0,429	0,421
8	0,648	0,807	0,672	0,744	0,534	0,556	0,434	0,427
9	0,658	0,817	0,659	0,659	0,562	0,576	0,455	0,454
10	0,713	0,869	0,726	0,726	0,540	0,586	0,483	0,443
11	0,740	0,924	0,771	0,764	0,507	0,568	0,518	0,429
12	0,747	1,127	0,833	0,785	0,487	0,597	0,361	0,437
13	0,756	0,781	0,382	0,775	0,512	0,575	0,384	0,550
14	0,764	1,035	0,463	0,849	0,628	0,723	0,526	0,577
15	0,778	0,757	0,569	0,929	0,716	0,794	0,528	0,610
16	0,785	0,871	0,649	1,016	0,738	0,871	0,573	0,636
17	0,796	1,000	0,722	1,129	0,851	0,983	0,602	0,666
18	0,506	0,766	0,818	0,703	0,651	1,086	0,642	0,714
19	0,622	0,903	0,423	0,731	0,663	0,879	0,675	0,744
20	0,653	0,983	0,458	0,804	0,556	0,919	0,648	0,872
21	0,707	1,226	0,557	0,833	0,645	1,017	0,755	0,891
22	0,736	1,254	0,606	0,921	0,688	1,081	0,790	0,879
23	0,747	0,961	0,636	0,898	0,727	0,632	0,530	0,867
24	0,769	0,929	0,711	0,902	0,810	0,721	0,497	0,851
25	0,769	0,977	0,732	0,958	0,652	0,798	0,517	0,871
26	0,807	1,120	0,782	0,970	0,622	0,854	0,511	0,890
27	0,472	1,125	0,463	0,578	0,617	0,906	0,511	0,926
28	0,537	1,055	0,489	0,672	0,618	1,023	0,594	0,996

Continuação Tabela A10 Acompanhamento diário da concentração celular (g.L^{-1}) para a microalga *Cyanobium* sp. Artigo Fotobiorreator tubular vertical para cultivo de microalga em modo semicontínuo

tempo (d)	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7	Exp. 8
29	0,593	0,806	0,413	0,597	0,683	0,707	0,613	0,587
30	0,627	0,850	0,377	0,612	0,473	0,745	0,727	0,626
31	0,652	1,012	0,534	0,780	0,625	0,771	0,739	0,636
32	0,670	0,884	0,600	0,899	0,762	0,774	0,756	0,729
33	0,694	0,937	0,678	0,887	0,675	0,833	0,746	0,732
34	0,702	0,910	0,688	0,929	0,714	0,884	0,819	0,797
35	0,717	0,974	0,747	0,972	0,772	0,966	0,638	0,911
36	0,833	1,017	0,820	1,051	0,794	1,062	0,614	0,952
37	0,505	0,656	0,482	0,695	0,821	0,773	0,486	1,023
38	0,668	0,764	0,540	0,804	0,903	0,879	0,531	0,784
39	0,762	0,806	0,564	0,835	0,624	0,917	0,473	0,824
40	0,787	0,902	0,628	0,904	0,633	0,977	0,411	0,855
41	0,805	0,936	0,748	0,986	0,676	1,072	0,715	0,923
42	0,824	1,046	0,853	1,087	0,681	0,842	0,737	0,974
43	0,847	0,907	0,594	0,720	0,684	0,942	0,776	0,994
44	0,509	1,177	0,630	0,797	0,688	0,989	0,833	1,046
45	0,570	1,240	0,594	0,835	0,716	1,068	0,670	0,807
46	0,602	0,846	0,676	0,970	0,793	0,750	0,601	0,887
47	0,628	0,830	0,653	0,942	0,593	0,795	0,532	0,862
48	0,691	0,880	0,641	1,048	0,633	0,856	0,523	0,910
49	0,721	1,069	0,653	0,708	0,724	0,936	0,585	0,969
50	0,694	0,871	0,622	0,716	0,744	0,907	0,612	0,999
51	0,708	0,909	0,614	0,701	0,771	0,909	0,627	0,674
52	0,772	0,913	0,658	0,782	0,843	0,966	0,704	0,733
53	0,824	0,942	0,628	0,850	0,584	1,042	0,754	0,749
54	0,846	0,961	0,726	0,895	0,601	0,773	0,799	0,771
55	0,879	1,077	0,856	0,962	0,688	0,774	0,807	0,828
56	0,867	1,060	0,723	1,038	0,760	0,795	0,522	0,860
57	0,737	0,853	0,743	0,655	0,813	0,884	0,609	0,955

Continuação Tabela A10 Acompanhamento diário da concentração celular (g.L^{-1}) para a microalga *Cyanobium* sp. Artigo Fotobiorreator tubular vertical para cultivo de microalga em modo semicontínuo.

tempo (d)	Exp. 9	Exp. 10	Exp. 11	Exp. 12	Exp. 13	Exp. 14	Exp. 15
0	0,384	0,385	0,388	0,412	0,423	0,416	0,395
1	0,466	0,435	0,391	0,373	0,392	0,407	0,428
2	0,513	0,484	0,448	0,422	0,423	0,449	0,404
3	0,594	0,515	0,532	0,443	0,467	0,559	0,445
4	0,623	0,543	0,651	0,465	0,539	0,637	0,637
5	0,587	0,547	0,635	0,475	0,489	0,607	0,557
6	0,614	0,621	0,687	0,490	0,532	0,677	0,622
7	0,677	0,663	0,723	0,496	0,502	0,696	0,691
8	0,742	0,723	0,773	0,510	0,534	0,738	0,758
9	0,761	0,763	0,773	0,515	0,592	0,675	0,802
10	0,808	0,853	0,808	0,530	0,707	0,746	0,853
11	0,838	0,913	0,827	0,547	0,778	0,788	0,928
12	0,837	1,008	0,941	0,586	0,910	0,818	1,091
13	0,977	1,107	1,011	0,635	0,941	0,871	1,166
14	1,143	1,175	1,093	0,668	1,144	0,940	1,257
15	1,235	0,807	1,198	0,723	1,218	0,988	1,280
16	0,931	0,860	0,949	0,788	0,881	1,025	1,131
17	0,949	0,882	1,003	0,806	1,018	1,095	1,121
18	1,003	0,904	1,069	0,819	1,145	1,151	1,158
19	1,051	0,881	1,230	0,873	1,244	1,177	1,301
20	1,073	0,931	0,938	0,879	0,879	1,183	0,782
21	1,082	0,950	1,035	0,955	1,011	1,273	0,863
22	1,194	1,138	1,065	1,064	1,098	0,903	0,935
23	0,867	1,214	1,199	1,188	1,223	0,921	0,970
24	0,933	0,747	0,944	0,863	0,971	1,076	1,043
25	0,992	0,750	0,978	0,864	1,062	1,132	1,053
26	1,120	0,759	1,072	0,929	1,108	1,173	1,101
27	1,130	0,780	1,081	0,936	1,250	0,764	1,121
28	0,958	0,791	1,108	1,112	1,005	0,876	1,094

Continuação Tabela A10 Acompanhamento diário da concentração celular (g.L^{-1}) para a microalga *Cyanobium* sp. Artigo Fotobiorreator tubular vertical para cultivo de microalga em modo semicontínuo.

tempo (d)	Exp. 9	Exp. 10	Exp. 11	Exp. 12	Exp. 13	Exp. 14	Exp. 15
29	0,843	0,821	1,135	1,159	1,015	0,813	1,223
30	0,813	0,940	1,215	1,205	1,202	0,894	0,973
31	0,845	1,039	1,006	0,795	0,976	0,941	1,047
32	0,937	1,045	1,070	0,842	0,984	1,013	1,183
33	0,889	1,019	1,041	0,835	0,974	0,937	1,193
34	0,863	1,089	1,162	0,967	1,080	1,022	1,351
35	0,892	1,157	1,253	1,103	1,179	1,113	1,176
36	0,906	1,210	0,977	1,217	1,279	1,194	1,243
37	0,910	0,795	0,984	0,833	0,921	1,262	0,941
38	0,969	0,838	1,115	0,896	1,062	0,969	1,018
39	1,018	0,912	1,154	0,942	1,187	1,025	1,158
40	1,085	0,982	1,213	1,020	1,232	1,063	1,225
41	1,139	1,074	0,865	1,093	0,941	1,135	0,972
42	1,187	1,047	0,883	1,160	0,997	1,155	0,987
43	0,986	1,084	0,983	1,273	1,049	1,363	1,168
44	1,004	1,091	0,996	0,840	1,041	0,988	1,165
45	1,015	1,198	0,990	0,916	1,093	1,057	1,187
46	1,121	0,729	1,054	0,961	1,234	1,212	1,313
47	1,117	0,642	1,055	0,942	0,850	0,857	0,899
48	1,156	0,758	1,106	1,025	0,947	0,931	1,043
49	1,067	0,774	1,161	1,102	1,094	1,067	1,146
50	1,235	0,740	1,235	1,174	1,151	1,112	1,186
51	0,959	0,685	0,851	1,152	1,148	1,154	0,840
52	1,009	0,676	0,892	1,224	1,264	1,251	0,873
53	1,041	0,704	0,907	0,710	0,890	0,936	0,912
54	1,085	0,743	0,925	0,747	0,938	0,981	0,938
55	1,096	0,752	0,918	0,907	1,019	1,130	1,070
56	1,187	0,875	1,018	1,020	1,092	1,264	1,206
57	1,252	0,947	1,060	1,098	1,181	0,871	0,875

Tabela A11 Acompanhamento diário da concentração celular (g.L^{-1}) para a microalga *Chlorella* sp. Artigo Cultivo semicontínuo da microalga *Chlorella* sp. em fotobiorreator aberto.

tempo (d)	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7	Exp. 8
0	0,202	0,200	0,202	0,201	0,194	0,213	0,220	0,214
1	0,318	0,324	0,320	0,319	0,223	0,303	0,271	0,302
2	0,447	0,477	0,447	0,427	0,237	0,490	0,313	0,461
3	0,321	0,558	0,318	0,508	0,298	0,646	0,365	0,625
4	0,356	0,646	0,346	0,577	0,356	0,342	0,387	0,470
5	0,387	0,432	0,379	0,632	0,374	0,374	0,408	0,559
6	0,423	0,491	0,421	0,335	0,408	0,402	0,231	0,619
7	0,321	0,508	0,231	0,387	0,251	0,425	0,262	0,482
8	0,346	0,531	0,265	0,456	0,264	0,458	0,344	0,576
9	0,366	0,557	0,302	0,492	0,308	0,542	0,368	0,685
10	0,379	0,606	0,342	0,548	0,329	0,561	0,389	0,450
11	0,399	0,419	0,369	0,582	0,373	0,587	0,411	0,509
12	0,297	0,428	0,388	0,602	0,418	0,607	0,234	0,546
13	0,334	0,455	0,414	0,297	0,250	0,370	0,292	0,602
14	0,358	0,484	0,219	0,342	0,298	0,383	0,348	0,396
15	0,367	0,531	0,245	0,375	0,342	0,460	0,370	0,468
16	0,388	0,559	0,267	0,421	0,371	0,467	0,383	0,566
17	0,413	0,568	0,299	0,445	0,413	0,522	0,417	0,624
18	0,304	0,591	0,315	0,503	0,239	0,543	0,238	0,443
19	0,324	0,421	0,338	0,546	0,281	0,566	0,262	0,517
20	0,338	0,488	0,352	0,579	0,321	0,586	0,311	0,579
21	0,352	0,503	0,368	0,622	0,357	0,602	0,342	0,618
22	0,368	0,532	0,387	0,318	0,379	0,366	0,357	0,429
23	0,381	0,561	0,413	0,364	0,405	0,421	0,378	0,458

Continuação Tabela A11 Acompanhamento diário da concentração celular (g.L^{-1}) para a microalga *Chlorella* sp. Artigo Cultivo semicontínuo da microalga *Chlorella* sp. em fotobiorreator aberto.

tempo (d)	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5	Exp. 6	Exp. 7	Exp. 8
24	0,389	0,582	0,220	0,399	0,241	0,464	0,403	0,551
25	0,406	0,607	0,231	0,451	0,277	0,489	0,235	0,622
26	0,316	0,433	0,257	0,489	0,319	0,502	0,261	0,410
27	0,339	0,452	0,278	0,534	0,366	0,543	0,278	0,462
28	0,357	0,479	0,309	0,587	0,406	0,558	0,318	0,505
29	0,381	0,499	0,322	0,608	0,234	0,580	0,342	0,552
30	0,407	0,534	0,356	0,309	0,258	0,603	0,366	0,614
31	0,322	0,568	0,385	0,348	0,318	0,384	0,380	0,358
32	0,344	0,604	0,423	0,389	0,359	0,405	0,405	0,442
33	0,359	0,418	0,218	0,443	0,401	0,441	0,242	0,491
34	0,366	0,422	0,245	0,487	0,231	0,452	0,264	0,537
35	0,397	0,436	0,266	0,523	0,266	0,456	0,291	0,553
36	0,318	0,447	0,279	0,569	0,315	0,482	0,334	0,578
37	0,336	0,460	0,313	0,589	0,357	0,537	0,358	0,609
38	0,354	0,489	0,348	0,624	0,400	0,579	0,379	0,348
39	0,371	0,512	0,371	0,608	0,230	0,588	0,399	0,377
40		0,536	0,388	0,608	0,272	0,579		0,421

Continuação Tabela A11 Acompanhamento diário da concentração celular (g.L^{-1}) para a microalga *Chlorella* sp. Artigo Cultivo semicontínuo da microalga *Chlorella* sp. em fotobiorreator aberto.

tempo (d)	Exp. 9	Exp. 10	Exp. 11	Exp. 12	Exp. 13	Exp. 14	Exp. 15
0	0,212	0,212	0,202	0,206	0,202	0,205	0,200
1	0,299	0,298	0,305	0,296	0,336	0,341	0,339
2	0,456	0,487	0,511	0,492	0,478	0,474	0,468
3	0,614	0,660	0,684	0,657	0,574	0,588	0,602
4	0,721	0,792	0,832	0,776	0,686	0,675	0,688
5	0,831	0,511	0,674	0,891	0,765	0,772	0,797
6	0,626	0,579	0,794	0,541	0,831	0,843	0,496
7	0,724	0,693	0,682	0,641	0,498	0,512	0,543
8	0,742	0,789	0,836	0,762	0,579	0,588	0,605
9	0,812	0,841	0,711	0,890	0,654	0,663	0,687
10	0,632	0,484	0,806	0,519	0,712	0,746	0,765
11	0,680	0,548	0,642	0,603	0,769	0,805	0,833
12	0,723	0,588	0,699	0,642	0,782	0,517	0,523
13	0,761	0,637	0,756	0,739	0,826	0,598	0,599
14	0,790	0,663	0,838	0,767	0,488	0,687	0,721
15	0,832	0,711	0,659	0,852	0,538	0,757	0,814
16	0,601	0,766	0,732	0,532	0,599	0,833	0,495
17	0,652	0,798	0,869	0,599	0,674	0,499	0,588
18	0,711	0,470	0,640	0,694	0,743	0,579	0,659
19	0,745	0,519	0,667	0,785	0,805	0,685	0,690
20	0,788	0,554	0,701	0,851	0,545	0,789	0,801
21	0,811	0,581	0,772	0,502	0,624	0,854	0,496
22	0,591	0,629	0,860	0,563	0,702	0,522	0,547
23	0,652	0,680	0,665	0,633	0,768	0,618	0,623

Continuação Tabela A11 Acompanhamento diário da concentração celular (g.L^{-1}) para a microalga *Chlorella* sp. Artigo Cultivo semicontínuo da microalga *Chlorella* sp. em fotobiorreator aberto.

tempo (d)	Exp. 9	Exp. 10	Exp. 11	Exp. 12	Exp. 13	Exp. 14	Exp. 15
24	0,681	0,743	0,760	0,694	0,832	0,697	0,705
25	0,733	0,796	0,886	0,775	0,507	0,787	0,812
26	0,759	0,459	0,699	0,813	0,589	0,847	0,486
27	0,782	0,508	0,735	0,466	0,675	0,497	0,534
28	0,804	0,564	0,848	0,561	0,766	0,585	0,585
29	0,598	0,618	0,631	0,667	0,838	0,679	0,678
30	0,641	0,685	0,688	0,762	0,523	0,778	0,781
31	0,682	0,714	0,752	0,830	0,598	0,835	0,828
32	0,731	0,739	0,799	0,471	0,676	0,522	0,510
33	0,755	0,751	0,631	0,531	0,782	0,598	0,587
34	0,778	0,775	0,703	0,593	0,844	0,664	0,675
35	0,812	0,804	0,749	0,663	0,511	0,745	0,749
36	0,622	0,442	0,783	0,738	0,586	0,829	0,837
37	0,647	0,477	0,831	0,798	0,653	0,510	0,532
38	0,679	0,519	0,657	0,471	0,725	0,664	0,684
39	0,713	0,560	0,739	0,550	0,814	0,756	0,766
40	0,745	0,572	0,765	0,622	0,000	0,827	0,817