

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

Thiago Santos de Almeida Lopes¹; Thyago Nóbrega Silveira²; Olga Elyzabeth Lucena Almeida³; Yohanna Jamilla Vilar de Brito⁴; Weruska Brasileiro Ferreira⁵

¹Universidade Estadual da Paraíba, Dept de Engenharia Sanitária e Ambiental – thiagosantos_al@outlook.com

²Universidade Estadual da Paraíba, Dept de Engenharia Sanitária e Ambiental – thyagonobrega@hotmail.com

³Universidade Estadual da Paraíba, Dept de Engenharia Sanitária e Ambiental – olgaelyzabeth@hotmail.com

⁴Universidade Estadual da Paraíba, Dept de Engenharia Sanitária e Ambiental – yohannajvb@gmail.com

⁵Universidade Estadual da Paraíba, Dept de Engenharia Sanitária e Ambiental – weruska.brasileiro@pq.cnpq.br

RESUMO: O cultivo de microalgas tem se destacado como uma alternativa para geração de biocombustíveis, devido à sua alta produtividade por unidade de área, uso de terras não aráveis e contribuir com a redução dos efeitos do superaquecimento global. Várias espécies de microalgas também possuem a capacidade de sobreviver em ambientes extremos, adaptando o seu metabolismo de acordo com a alteração das condições ambientais. Desse modo, é importante analisar os parâmetros que influenciam seu crescimento, como pH e luminosidade, a fim de definir as condições que melhor favorecem seu desenvolvimento visando a otimização dos cultivos para uma maior produção de biomassa. Dentre as microalgas, a *Chlorella* sp se destaca devido à sua resistência e elevada produtividade de lipídios, o que potencializa a produção de biocombustíveis. Merece destacar o benefício ambiental promovido pelo cultivo das microalgas, em especial a *Chlorella* sp, em razão da mitigação das emissões de CO₂ e possível biorremediação de águas residuárias. No presente estudo realizaram-se cultivos da *Chlorella* sp em pH variando de 5,5 a 8,5, e fornecimento de luz variando de 6h a 24h, verificando-se que as condições mais favoráveis para o cultivo da respectiva microalga visando à produção de biocombustíveis foram pH 7,0 e 8,5 com 12h de luz, que promoveram os maiores números de células alcançados, assim como as melhores velocidades específicas máximas de crescimento e tempos de geração. Estas condições indicam que a *Chlorella* sp pode se adaptar facilmente em efluentes industriais e domésticos que apresentam pH neutro ou alcalino.

Palavras-chave: Microalgas, Biocombustíveis, *Chlorella* sp, Biorremediação.

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

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

As microalgas de espécie *Chlorella* sp apresentam características fundamentais para a produção de biocombustíveis: são verdes, simples, eucarióticas, esféricas, com alta eficiência fotossintética, apresentam excelente produtividade lipídica e de biomassa, e a sua estrutura celular simplifica o processamento dos biocombustíveis quando comparado com outras plantas complexas, podendo substituir os recursos agrícolas (VIEIRA, 2013). Geralmente são encontradas em tanques e lagos.

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

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

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

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

2. METODOLOGIA

2.1. Microalga e aclimação dos cultivos

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Saneamento Ambiental do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual da Paraíba utilizando cepas da microalga de espécie *Chlorella* sp fornecidas pelo Laboratório de Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense e pelo Laboratório de Biotecnologia Alimentar da Universidade Federal de Santa Catarina.

A espécie em estudo foi escolhida devido a sua predominância nos meios aquáticos da região semiárida do nordeste brasileiro, onde foram realizados os experimentos, e devido à sua resistência e elevada produtividade de lipídios, descritos em diversos estudos, favorecendo a produção de biocombustíveis.

A aclimação dos cultivos foi realizada de modo a estabelecer um ambiente propício para a otimização do crescimento da *Chlorella* sp. As culturas foram desenvolvidas em Erlenmeyres, que foram utilizados como fotobioreatores e mantidos a temperatura de $26^{\circ}\text{C}\pm 2$, com agitação de ar comprimido para garantir a homogeneização do meio, e expostos por um período de 12 horas à iluminação de lâmpadas fluorescentes de 40W.

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

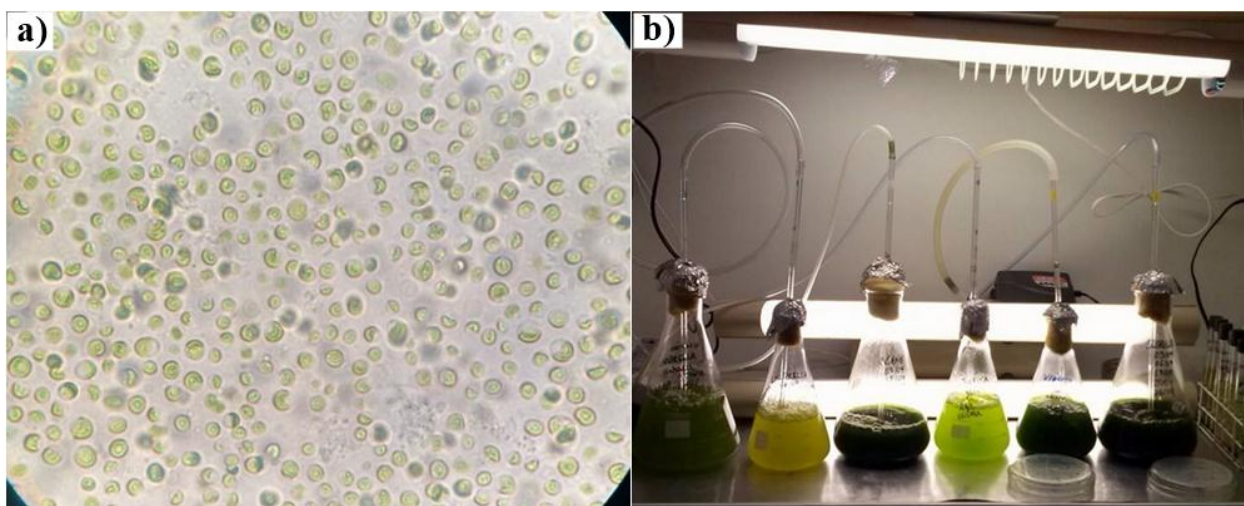


Figura 1 – a) Fotomicrografia da microalga *Chlorella* sp; b) Aclimação dos cultivos

2.2. Estratégia de estudo

Para o cultivo da *Chlorella* sp foi utilizado o meio de cultura *Bold's Basal Medium* (BBM), desenvolvido por Stein (1973), sob diferentes condições de pH e luminosidade, onde buscou-se analisar a influência de tais fatores no desenvolvimento da espécie em estudo.

Inicialmente, elaborou-se um cultivo-base onde não se realizaram alterações no meio de cultura e nas condições de aclimação, objetivando uma melhor análise da influência do pH e da luminosidade sobre o crescimento da *Chlorella* sp. Em seguida, desenvolveram-se cultivos da respectiva microalga em meio de cultura BBM com variadas alterações em seu pH, mantendo-se as condições originais de aclimação (12h de luminosidade). Por fim, realizaram-se cultivos com alteração nas horas de fornecimento de luz.

As Tabelas 1 e 2 apresentam as condições de pH e luminosidade utilizados durante o presente estudo.

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

Valores de pH conferidos ao meio de cultura BBM para o cultivo da <i>Chlorella</i> sp			
5,5	6,5	7,5	8,5

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

Quantidade de horas de luz fornecidas aos cultivos de <i>Chlorella</i> sp em meio BBM			
6,0	12,0	18,0	24,0

2.3. Avaliação do crescimento

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

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

2.4. Avaliação da cinética de crescimento algal

A velocidade de crescimento é diretamente proporcional à concentração de microrganismos em um dado instante. A fração pela qual a população cresce na unidade de tempo é dada por $\mu_{\text{máx}}$, que representa a velocidade específica de crescimento e tem unidade de tempo h⁻¹. Na fase exponencial (ou logarítmica) a velocidade específica de crescimento é constante e máxima, sendo μ_x igual a $\mu_{\text{máx}}$. A velocidade de crescimento foi calculada através da Equação (1).

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

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

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. *Chlorella* sp em meio BBM sob diversas condições de pH

Servindo de base para o estudo, elaborou-se um cultivo de *Chlorella* sp em meio BBM onde não se realizou ajuste de pH (pH do BBM = 7) nem alteração na disponibilidade de luz. A Figura 3 apresenta a curva de crescimento da microalga nas respectivas condições, onde o cultivo iniciou com uma concentração de $2,16 \times 10^5$ células.mL⁻¹ e alcançou a concentração máxima de $1,80 \times 10^7$ células.mL⁻¹.

A fim de verificar a influência que a variação de pH exerceu sobre o crescimento da microalga *Chlorella* sp, foram elaborados cultivos variando-se o pH do meio de cultura BBM numa faixa de 5,5 a 8,5, mantendo-se as aclimações físicas estabelecidas inicialmente. A Figura 4 ilustra as curvas de crescimento da respectiva microalga sob diversas condições de pH. Todos os cultivos iniciaram com uma concentração de células na ordem de 10^5 e, apesar da variação de pH, alcançaram quantidades semelhantes de número de células.

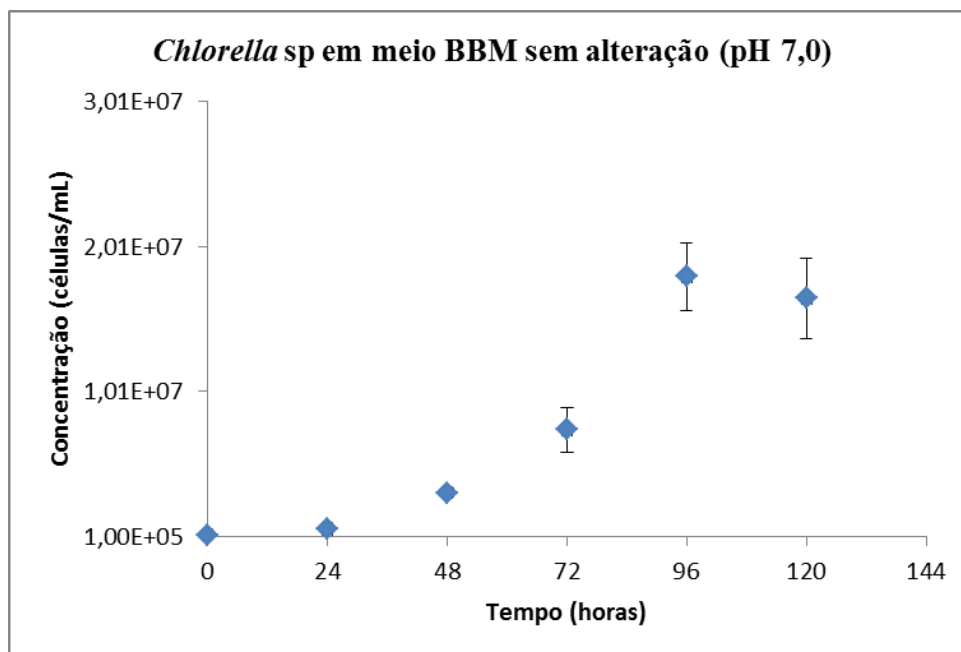


Figura 3 – Curva de crescimento da *Chlorella* sp em meio BBM

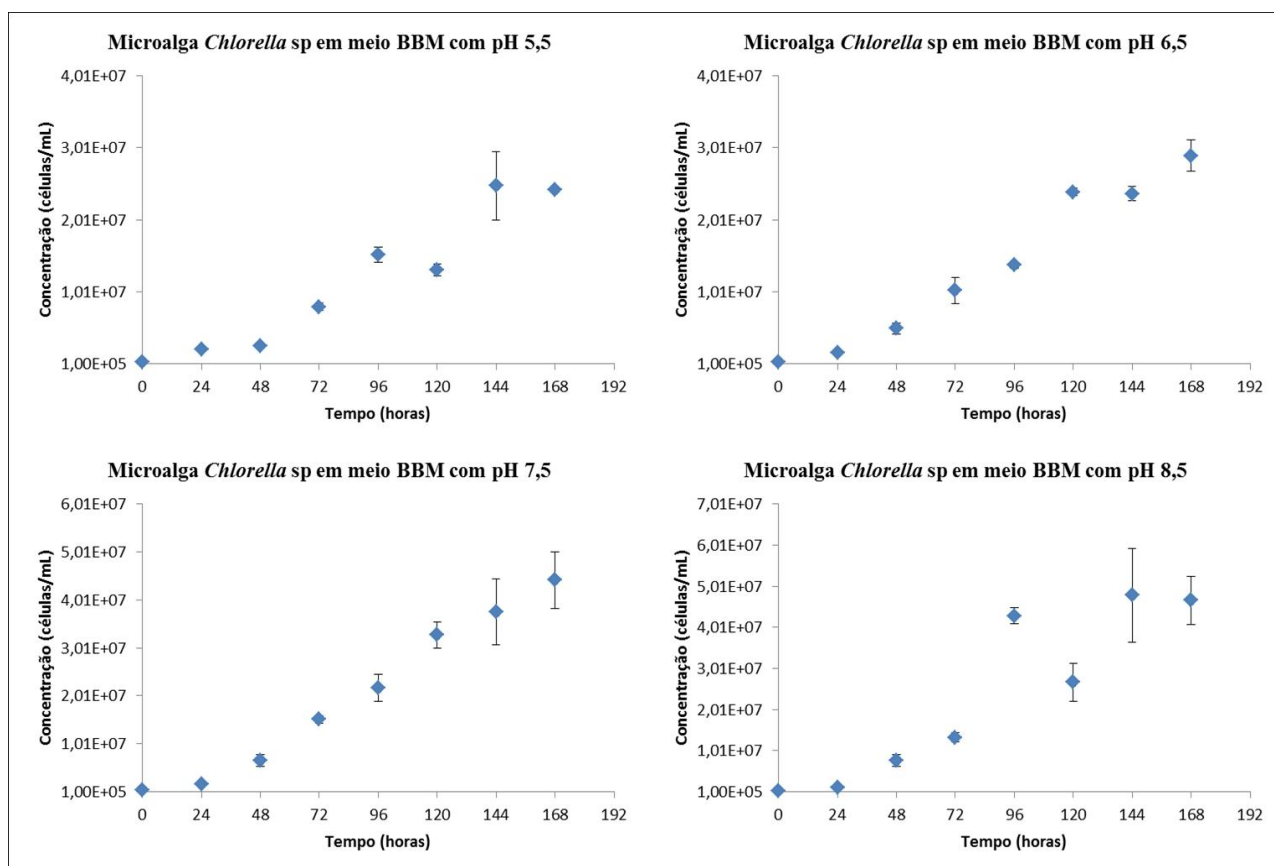


Figura 4 – Curvas de crescimento da *Chlorella* sp sob diversas condições de pH

Dentre os cultivos de *Chlorella* sp, o de pH 8,5 foi o que desenvolveu o maior número de células, assim como os melhores resultados de velocidade específica máxima de crescimento e tempo de geração, apresentados na Tabela 3. Comparando-se esse cultivo com o cultivo-base (pH 7,0), verificou-se pouca diferença entre os valores de número máximo de células alcançado, velocidade específica máxima de crescimento e tempo de geração, indicando que os meios de cultura em pH neutro ou alcalino promoveram melhor adaptação e crescimento da respectiva microalga.

Tabela 3 – Velocidades específicas máximas e tempos de geração dos cultivos de *Chlorella* sp em meio BBM sob diversas condições de pH

pH do meio de cultura	Velocidade específica $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	R ²	Tempo de geração (h)
5,5	0,0293	0,9436	23,6519
6,5	0,0381	0,9851	18,1890
7,0 (cultivo-base)	0,0517	0,9707	13,4042
7,5	0,0470	0,9772	14,7447
8,5	0,0526	0,9048	13,1749

Os valores elevados do coeficiente de determinação (R²), também expressos na Tabela 3, indicam que houve um excelente ajuste amostral ao modelo de estudo utilizado.

Tripathi et al. (2015) cultivaram *Scenedesmus* sp em meio de cultura BG-11, com pH 7,4 e 18 h de luz, e analisou a influência do pH alterando-o numa faixa entre 7 e 10, onde a microalga obteve sua maior produtividade em pH 8, apresentando melhor crescimento em meio alcalino. Chiranjeevi e Mohan (2016) também verificaram maior produção de biomassa em pH alcalino (8,5), que em pH ácido (6). Fato análogo ao do presente estudo, onde a microalga *Chlorella* sp apresentou melhor cinética de crescimento em decorrência do aumento do pH.

Sutherland et al. (2015) investigaram os efeitos da adição de CO₂ no cultivo de microalgas em águas residuárias, ao longo de um gradiente de pH, e observaram melhor eficiência fotossintética quando o pH das culturas foram reduzidos para 8 e 6,5, onde o pH 6,5 promoveu o melhor rendimento de biomassa das microalgas *Micractinium bornhemense* e *Pediastrum boryanum*, porém reduziu de forma significativa a eficiência na absorção de nutrientes. Isso mostra que, para o tratamento de águas residuárias, o pH alcalino favorece a remoção de nutrientes, de modo que a microalga *Chlorella* sp, ao desenvolver melhor cinética de crescimento em pH 8,5, é uma forte candidata para remediação de efluentes alcalinos.

3.2. *Chlorella* sp em meio BBM sob diferentes condições de luminosidade

A Figura 5 ilustra as curvas de crescimento da microalga *Chlorella* sp em 6h, 18h e 24h de luz, juntamente com a do cultivo de 12h de luz, já apresentada na Figura 3 (cultivo-base). Os cultivos foram realizados sem alteração de pH do meio de cultura e iniciaram com uma concentração de células na ordem de 10⁵.

Verificou-se que os cultivos com menor luminosidade apresentaram uma maior fase lag, o que corresponde a um lento crescimento nos primeiros dias após o inóculo. Já os cultivos com maior disponibilidade de luz rapidamente chegaram à fase exponencial, apresentando acelerado crescimento já no segundo dia após o inóculo.

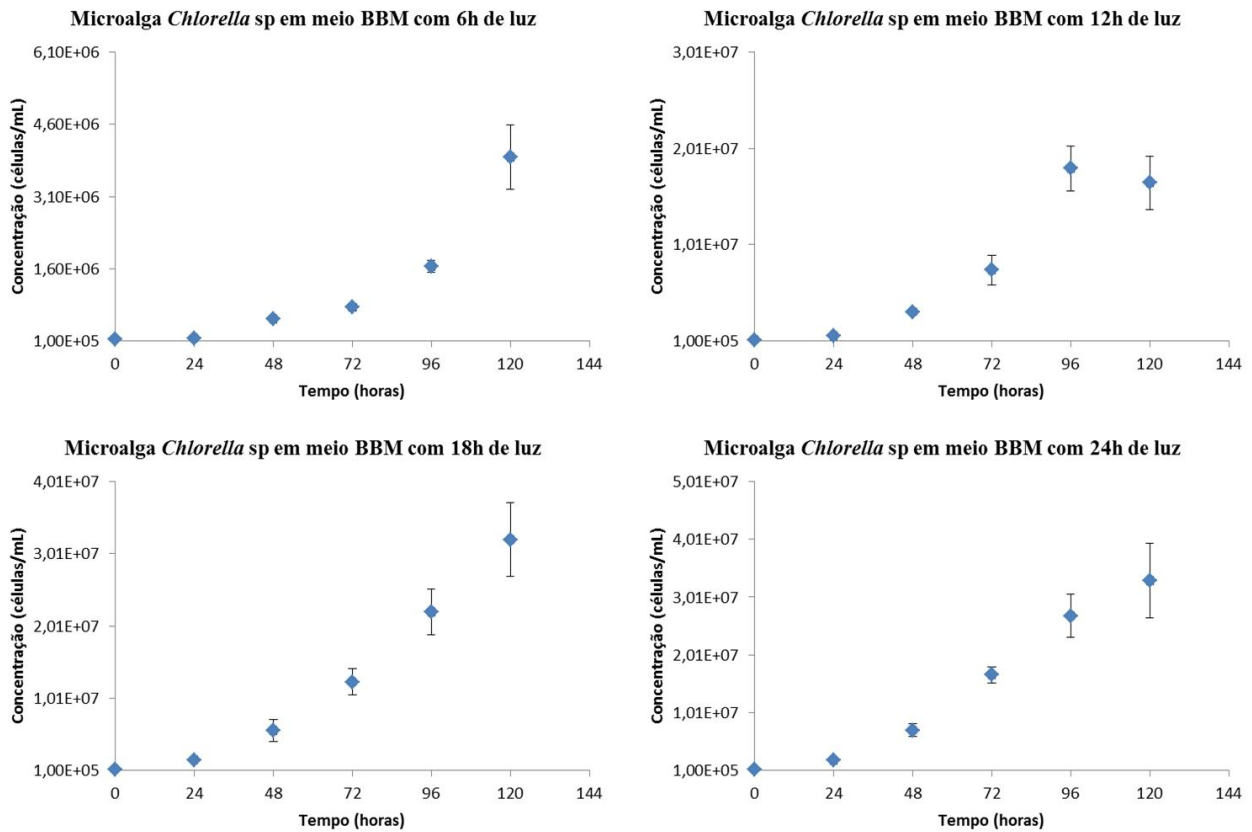


Figura 5 – Curvas de crescimento da microalga *Chlorella* sp em meio BBM (sem alteração de pH) com variação na disponibilidade de luz

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

Tabela 4 – Velocidades específicas máximas e tempos de geração dos cultivos de *Chlorella* sp sob diversas condições de luminosidade

Horas de luz (h)	Velocidade específica $\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	R ²	Tempo de geração (h)
6,0	0,0227	0,9626	30,5286
12,0	0,0517	0,9707	13,4042
18,0	0,0436	0,9804	15,8945
24,0	0,0464	0,9831	14,9353

Observou-se que a baixa disponibilidade de luz reduziu o desempenho da microalga, que apresentou menor cinética de crescimento em decorrência da iluminação de 6h. Fato comprovado em estudos realizados por Chiranjeevi e Mohan (2016), que mostraram uma maior produtividade de biomassa de microalgas na presença de luz que na ausência.

Han et al. (2015) estudaram a influência da luz no crescimento da *Chlorella* sp, fornecendo energia com intensidade na faixa de 2.000-10.000 lux, e observaram que a taxa de crescimento e o rendimento de biomassa seca melhoravam à medida que se aumentava a intensidade luminosa, porém, 6.000 lux satisfaz completamente a necessidade das microalgas. Comparando-se com o atual estudo, verifica-se que um fornecimento de luz intermediário é suficiente para as necessidades microalgais, pois promoveu a melhor cinética de crescimento. Além disso, em larga escala se pretende simular as condições externas do meio ambiente, o que reforça o a utilização do tempo de luminosidade de 12h para o cultivo de *Chlorella* sp.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

- Valores de pH do meio de cultura BBM entre a faixa 5,5-8,5 proporcionaram um bom desenvolvimento da microalga *Chlorella* sp, que desenvolveu melhores velocidades específicas de crescimento e tempos de geração em pH neutro (7) e alcalino (8,5).
- A disponibilidade de luz se apresentou como fator essencial para o desenvolvimento da microalga em estudo, sendo o tempo de 12h de luz definido como condição ideal para o cultivo em larga escala, uma vez que promoveu melhor cinética de crescimento microalgal e possibilita o aproveitamento da energia solar, dispensando a iluminação artificial.

Agradecimentos

Ao CNPq pelo financiamento do projeto.

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

STEIN, Janet R. (Ed.). **Handbook of Psychological Methods: Culture Methods and Growth Measurements**. Cambridge University Press, 1973.

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

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

VIEIRA, T. Q. Uso de resíduos líquidos no cultivo da microalga *Chlorella sp* com potencial para produção de biocombustíveis. Trabalho de Conclusão de Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, 2013.