



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Thayna Lye Viegas Freitas

EFEITO DA ALCALINIDADE SOBRE O CRESCIMENTO DAS MICROALGAS

Scenedesmus obliquus e Phaeodactylum tricornerutum

Florianópolis

2020

Thayna Lye Viegas Freitas

EFEITO DA ALCALINIDADE SOBRE O CRESCIMENTO DAS MICROALGAS
Scenedesmus obliquus e Phaeodactylum tricornutum

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Orientador: Prof. Roberto Bianchini Derner, Dr.
Coorientador: Rafael Garcia Lopes, Dr.

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Freitas, Thayna Lye Viegas
Efeito da alcalinidade sobre o crescimento das
microalgas *Scenedesmus obliquus* e *Phaeodactylum*
tricornutum / Thayna Lye Viegas Freitas ; orientador,
Roberto Bianchini Derner, coorientador, Rafael Garcia
Lopes, 2020.
35 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Aquicultura, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Aquicultura. 2. Microalga. 3. Alcalinidade. 4.
Carbono. 5. Qualidade de Água. I. Derner, Roberto
Bianchini. II. Lopes, Rafael Garcia. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Aquicultura. IV. Título.

Thayna Lye Viegas Freitas

EFEITO DA ALCALINIDADE SOBRE O CRESCIMENTO DAS MICROALGAS

Scenedesmus obliquus e Phaeodactylum tricornutum

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Roberto Bianchini Derner, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Luis Vinatea Arana, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Leonardo Rubi Rörig, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

Prof. Dra. Leila Hayashi
Coordenação do Programa de Pós Graduação em Aquicultura

Prof. Roberto Bianchini Derner, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2020

Este trabalho é dedicado à minha família, em especial, as minhas tias Rosangela e Suely.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo discernimento e sabedoria investidos a mim para me manter firme diante dos momentos de dificuldades.

À minha Família, a qual sou muito grata a Deus por ter nascido em um meio tão unido e amoroso, pelo apoio incondicional e emocional a todo momento e a cada escolha, à minha mãe maravilhosa que mesmo longe sempre se fez extremamente presente em cada etapa da minha evolução como pessoa, meu consolo, meu colo preferido, minha amiga mais fiel, a ela, Nando, meus irmãos, tios e primos devo todo meu amor, gratidão e minhas vitórias. À minha avó Zéfinha por ter me ensinado tanto e por todo amor que depositou em mim, a ela prometi dedicar cada passo dado.

Ao meu orientador Roberto Bianchini Derner por toda orientação, compreensão, apoio e amizade durante todo o processo. A Rafael Garcia Lopes, que além de meu coorientador foi amigo e apoiador nos momentos em que mais precisei.

À equipe do Laboratório de Cultivo de Algas pelos conhecimentos compartilhados e experiências repassadas. A Tawane, Henrique, Vinícios, Herculano e Juliana gratidão pela receptividade, pela parceria, amizade e acolhimento, vocês foram de extrema importância para me sentir em casa logo quando cheguei.

A Julianna, João, Paulo, Thiago, Sergio, Jota, Ana Paula e Weverson que foram meus amigos mais que amigos, minha família da Ilha, vocês são as pessoas mais lindas que podiam aparecer no meu caminho nessa etapa da minha vida, encontrei em vocês o apoio e a alegria pra seguir em frente sem sentir o peso da distância de casa. Amo vocês.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A qualidade de água é fator indispensável em modelos aquícolas. Visando o maior conhecimento das interações que envolvem a alcalinidade da água no desenvolvimento das culturas de microalgas e na eficiência de biofixação do CO₂, neste trabalho foi realizado um estudo deste parâmetro e seus efeitos empregando diferentes valores de alcalinidade em culturas de microalgas. Foram empregadas as espécies *Scenedesmus obliquus* e *Phaeodactylum tricorutum* em cultivos experimentais desenvolvidos em batelada com o emprego dos meios de cultura LCA-AD e LCA-AM, respectivamente. As culturas foram mantidas em irradiância de 400 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em fotoper\u00edodo cont\u00ednuo (24h), em temperatura de 21 $^{\circ}\text{C}$ para *P. tricorutum* e de 24 $^{\circ}\text{C}$ para *S. obliquus*, sob agita\u00e7\u00e3o constante realizada atrav\u00e9s do borbulhamento de ar atmosf\u00e9rico e adi\u00e7\u00e3o de CO₂ por sistema independente e automatizado. Os tratamentos consistiram em uma adi\u00e7\u00e3o de 0, 3 e 5g de bicarbonato, resultando em uma alcalinidade inicial de 40 mg L⁻¹, 280 mg L⁻¹ ou 480 mg L⁻¹ nas culturas de *S. obliquus*, e de 0, 4 e 6 g de bicarbonato, resultando em uma alcalinidade de 130 mg L⁻¹, 380 mg L⁻¹ ou 560 mg L⁻¹ nas culturas de *P. tricorutum*. Para a determina\u00e7\u00e3o do efeito da alcalinidade nas culturas, foram determinados os par\u00e2metros de crescimento (Biomassa M\u00e1xima Alcan\u00e7ada e Efici\u00eancia da Fixa\u00e7\u00e3o do carbono). Nas culturas de *S. obliquus*, ap\u00f3s 12 dias de cultivo a biomassa m\u00e1xima alcan\u00e7ada foi de 2,61 g L⁻¹; 2,96 g L⁻¹; 2,82 g L⁻¹, com os tratamentos 40 mg L⁻¹, 280 mg L⁻¹ ou 480 mg L⁻¹ respectivamente e nas culturas de *P. tricorutum*, ap\u00f3s 8 dias de cultivo a biomassa m\u00e1xima alcan\u00e7ada foi de 2,01 g L⁻¹; 1,90 g L⁻¹; 2,12 g L⁻¹ com os tratamentos de 130 mg L⁻¹, 380 mg L⁻¹ ou 560 mg L⁻¹. A efici\u00eancia de carbono biofixado obtida variou entre 8,61% e 1,05% nas culturas de *Scenedesmus obliquus* e de 14,67% a 0,91% nas culturas de *Phaeodactylum tricorutum*. Os valores de alcalinidade propostos n\u00e3o apresentaram diferen\u00e7a significativa para os dados de crescimento em biomassa, assim como, para os valores de efici\u00eancia de fixa\u00e7\u00e3o do CO₂.

Palavras-chave: Aquicultura. Microalga. Alcalinidade. Carbono. Qualidade de \u00c1gua.

ABSTRACT

Water quality is an indispensable factor in aquaculture models. Aiming to better understand the interactions that involve water alkalinity in the development of microalgae cultures and in the efficiency of CO₂ biofixation, in this work a study of this parameter and its effects using different values of alkalinity in microalgae cultures was carried out. The species *Scenedesmus obliquus* and *Phaeodactylum tricornutum* were used in experimental crops developed in batch using the culture media LCA-AD and LCA-AM, respectively. The cultures were maintained under irradiance of 400 μmol photons m⁻² s⁻¹ in continuous photoperiod (24: 0), at a temperature of 21 ° C for *P. tricornutum* and 24 ° C for *S. obliquus*, under constant agitation performed through the bubbling of atmospheric air and addition of CO₂ by an independent and automated system. The treatments consisted of an addition of 0, 3 and 5 g of bicarbonate, resulting in an initial alkalinity of 40 mg L⁻¹, 280 mg L⁻¹ or 480 mg L⁻¹ in the cultures of *S. obliquus*, and 0, 4 and 6 g of bicarbonate, resulting in an alkalinity of 130 mg L⁻¹, 380 mg L⁻¹ or 560 mg L⁻¹ in *P. tricornutum* cultures. To determine the effect of alkalinity on the cultures, the parameters of growth (Maximum Achieved Biomass and Carbon Fixation Efficiency). In *S. obliquus* cultures, after 12 days of cultivation the maximum biomass reached was 2.61 g L⁻¹; 2.96 g L⁻¹; 2.82 g L⁻¹, with treatments 40 mg L⁻¹, 280 mg L⁻¹ or 480 mg L⁻¹ respectively and in cultures of *P. tricornutum*, after 8 days of cultivation the maximum biomass reached was 2, 01 g L⁻¹; 1.90 g L⁻¹; 2.12 g L⁻¹ with 130 mg L⁻¹, 380 mg L⁻¹ or 560 mg L⁻¹ treatments. The efficiency of biofixed carbon obtained varied between 8.61% and 1.05% in the cultures of *S. obliquus* and from 14.67% to 0.91% in the cultures of *P. tricornutum*. The proposed alkalinity values showed no significant difference for the biomass growth data, as well as for the CO₂ fixation efficiency values.

Keywords: Aquaculture. Microalgae. Alkalinity. Carbon. Water Quality.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formas de carbono inorgânico em função do pH do meio líquido.....	18
Figura 2 – Curvas de crescimento em biomassa (g L^{-1}) de <i>S. obliquus</i> . (Δ) 40 mg L^{-1} ; (\square) 280 mg L^{-1} ;	25
Figura 3 – Curvas de crescimento em biomassa (g L^{-1}) de <i>P. tricornutum</i> . (Δ) 130 mg L^{-1} ; (\square) 380 mg L^{-1} ;	26
Figura 4 – Valores de pH e de alcalinidade nas culturas de <i>S. obliquus</i> . (Δ) 40 mg L^{-1} ; (\square) 280 mg L^{-1} ;	27
Figura 5 - Valores de alcalinidade e de pH para os tratamentos com a espécie <i>P. tricornutum</i> . (Δ) 130 mg L^{-1} ;	28
Figura 6 – Eficiência na biofixação de Carbono em culturas de <i>S. obliquus</i> (A) e <i>P. tricornutum</i> (B).	30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	MICROALGAS E SUAS APLICAÇÕES.....	11
1.2	CULTIVO DE MICROALGAS.....	13
1.3	<i>Phaeodactylum tricornutum e Scenedesmus obliquus</i>.....	15
1.4	CARBONO.....	15
1.5	PARÂMETROS DE QUALIDADE DE ÁGUA.....	18
1.6	OBJETIVOS	19
1.6.1	Objetivo Geral.....	19
1.6.2	Objetivos Específicos	19
2	DESENVOLVIMENTO DO ARTIGO CIENTÍFICO	20
2.1	INTRODUÇÃO.....	20
2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.2.1	Material Biológico.....	21
2.2.2	Condições Experimentais	22
2.2.3	Determinação dos Parâmetros de Crescimento.....	23
2.2.4	Parâmetros de Qualidade de Água	23
2.2.4.1	<i>Análise de Alcalinidade</i>	23
2.2.4.2	<i>Avaliação Da Fixação De Carbono</i>	23
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
2.3.1	Parâmetros de Crescimento.....	24
2.3.2	Alcalinidade e pH.....	26
2.3.3	Eficiência na Fixação de Carbono.....	29
2.6	CONCLUSÃO.....	31
	REFERÊNCIAS	31
	REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO.....	35

1 INTRODUÇÃO

1.1 MICROALGAS E SUAS APLICAÇÕES

As microalgas são micro-organismos unicelulares encontrados em diversos ambientes aquáticos, sendo considerados uma das primeiras formas de vida encontradas na terra (SATHASIVAM *et al.*, 2019). A diversidade de microalgas, dentre cianobactérias procarióticas e microalgas eucarióticas, é vasta, mas essa diversidade ainda não foi totalmente exposta (FEHLING; STOECKER; BALDAUF, 2007; MASSANA *et al.*, 2006; STERN *et al.*, 2010). Estima-se que existam mais de 50.000 diferentes espécies de microalgas presentes em diversos ambientes aquáticos marinhos e de água doce, porém, apenas 30.000 foram estudadas e analisadas (RICHMOND, 2004; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). As microalgas, como os demais organismos fotossintetizantes, convertem energia solar em energia química, que é empregada no processo de fixação do carbono a partir do CO₂, e a eficiência desse processo pode chegar a ser dez vezes maior do que aquela verificada nas plantas terrestres (SATHASIVAM *et al.*, 2019).

As microalgas vêm despertando um grande interesse biotecnológico, principalmente devido à grande quantidade de compostos orgânicos de elevado valor econômico encontrados na biomassa, dentre esses, podemos citar uma ampla gama de produtos, incluindo ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), carotenoides, ficobiliproteínas e polissacarídeos. Os produtos de microalgas têm sido amplamente utilizados e se destacam, por exemplo, como suplementos de alto teor proteico para a nutrição humana, como biomassa de elevado valor nutricional para alimentação de organismos aquáticos (aquicultura) e na elaboração de nutracêuticos, além de estar presente nas indústrias de produtos químicos, farmacêuticos, biofertilizantes, biocombustíveis e biorremediações (RICHMOND, 2004; DERNER, 2006; DEL CAMPO *et al.*, 2007; BAHADUR *et al.*, 2015).

Dentre as diversas aplicações biotecnológicas das microalgas, indiscutivelmente o uso na alimentação de organismos aquáticos cultivados na aquicultura se destaca como sendo a aplicação mais importante a nível mundial em termos de volume de produção (MULLER-FEUGA, 2000 ; BAHADUR *et al.*, 2015). Por fazerem parte do primeiro nível trófico de muitas cadeias alimentares nos ecossistemas aquáticos naturais, o principal emprego das microalgas na aquicultura está associado direta ou indiretamente à nutrição de diversas espécies de animais aquáticos. Por conta de características como tamanho adequado e elevado valor nutricional, uma vez que contém a maioria dos elementos necessários para garantir maior sobrevivência e

crescimento ótimo nas fases iniciais dos organismos aquáticos, as microalgas são atualmente usadas como alimento para larvas de crustáceos, moluscos e peixes, bem como para o cultivo do zooplâncton necessário para alimentação de animais juvenis (CHEN, 2003 ;BAHADUR *et al.*, 2015). Para essa finalidade, são selecionadas espécies que apresentam maiores teores de proteínas e de ácidos graxos poli-insaturados, que são compostos nutricionalmente ideais para um bom desenvolvimento dos organismos. Na larvicultura de animais aquáticos, podemos destacar o emprego de espécies como *Chaetoceros* spp., *Isochrysis* sp., *Pavlova* sp., *Nannochloropsis* sp. e *Tetraselmis* sp. como principais espécies utilizadas neste setor do cultivo, entretanto outros gêneros também são empregados: *Chlorella*, *Phaeodactylum*, *Skeletonema* e *Thalassiosira* (PIÑA *et al.*, 2006).

Outra aplicação das microalgas é na obtenção de pigmentos como os carotenoides, a astaxantina, betacaroteno, luteína e a cantaxantina, provenientes de algas receberam mais atenção nas aplicações de alimentos saudáveis (ZHANG; YANG; SINGH, 2014) isso pode ser explicado porque o uso de compostos bioativos naturais em alimentos funcionais é benéfico, sendo capazes de proteger as células do corpo de danos oxidativos (AMBATI *et al.*, 2014; RAO *et al.*, 2013; AMBATI *et al.*, 2019)

Algumas microalgas, como *Arthrospira* (Spirulina) spp., são cultivadas e comercializadas em países com o objetivo de produzir biomassa para o desenvolvimento de produtos ricos em proteínas para suplemento alimentar (AARONSON, BERNER; DUBINSKY, 1980; DUBACQ, 1995; SPOLAORE *et al.*, 2006). Algumas espécies cultivadas, quando em determinadas condições ambientais, podem alcançar altos teores lipídicos, que além de ser usados em suplementos alimentares, podem ser matéria-prima para a fabricação de bioprodutos como detergentes, borrachas, compostos graxos nitrogenados, graxa, tecidos, cosméticos, medicamentos e ainda, para a produção de biocombustíveis, como o biodiesel (AARONSON, et al 1982; BERTOLDI *et al.*, 2006).

Reconhecidamente, o aquecimento global tornou-se um problema cada vez mais sério, agravado por conta da emissão de grandes quantidades de gases de efeito estufa oriundos do uso excessivo de combustíveis fósseis, levando a uma busca pela redução da emissão de CO₂, assim, este assunto despertou o interesse para a produção de biocombustíveis a partir de matérias-primas renováveis (TU *et al.*, 2018). Neste cenário, o biodiesel a partir das microalgas foi considerado como uma alternativa, uma vez que, estes micro-organismos apresentam altas taxas de crescimento, podem sintetizar quantidades interessantes de lipídios e não necessitam de grandes áreas de terra para o desenvolvimento dos cultivos (SCOTT *et al.*, 2010). A produção, porém, ainda enfrenta algumas dificuldades como o alto custo e a baixa eficiência na

conversão do carbono em biomassa (TU *et al.*, 2018). Tecnologias funcionais e econômicas que possam viabilizar a produção e conseqüentemente a utilização de biomassa microalgal para obtenção de biodiesel estão sendo desenvolvidas e exploradas em diversos estudos que buscam ampliar e melhorar tanto a produção de biomassa quanto a otimização do acúmulo de lipídios pelas células (GARDNER *et al.*, 2012).

A fitorremediação também se apresenta como aplicação para o cultivo de microalgas, visto que essa atividade consiste no uso destes micro-organismos para a remoção ou biotransformação de compostos orgânicos poluentes, incluindo nutrientes e metais pesados de águas residuais considerados problema ambientais graves para saúde humana e CO₂ de ar residual com propagação de biomassa concomitante (OLGUÍN *et al.* 2003, 2004; MULBRY *et al.* 2008; MORENO-GARRIDO 2008). Na aquicultura essa biorremediação é importante para o controle na qualidade de água dos cultivos e para o descarte da água, uma vez que as células algáceas têm capacidade de assimilar nitrogênio e fósforo quando estes compostos se encontram em elevadas concentrações, podendo causar a eutrofização do meio aquático quando descartados diretamente nos corpos d'água. Nestes processos, as microalgas assimilam os produtos nitrogenados, como amônia, nitrato e nitrito, potencialmente tóxicos para os animais aquáticos, assim como, assimilam o dióxido de carbono e promovem a oxigenação do meio aquático, resultando na melhora da qualidade da água (LOURENÇO, 2006; PEREZ-GARCIA *et al.*, 2011).

1.2 CULTIVO DE MICROALGAS

Em escala laboratorial, o cultivo de microalgas é desenvolvido há pelo menos 140 anos, e o seu uso comercial há mais de seis décadas (LOURENÇO, 2006). Vários estudos têm sido realizados a fim de determinar a adequação de diferentes espécies de microalgas aos modos e aos sistemas de cultivo, levando em conta uma variedade de propósitos (CHEW *et al.*, 2018).

O método de cultivo desempenha um papel significativo na produtividade das microalgas, assim como diversos outros aspectos (iluminação, nutrientes, temperatura etc.) e as características biológicas das espécies selecionadas, que também promovem efeitos determinantes para os bons resultados na produtividade da cultura (ACIÉN *et al.*, 2017; CHEW *et al.*, 2018). De modo geral, os sistemas de cultivo de microalgas podem ser classificados em dois tipos: abertos ou fechados. Os sistemas abertos, como *raceways* e sistemas laminares, são caracterizados pelo contato direto da superfície da cultura com o ambiente, enquanto os sistemas fechados, como fotobiorreatores tipo *flat panel* e sistemas tubulares verticais e

horizontais, não apresentam contato direto com a atmosfera (ACIÉN *et al.*, 2017). Ambos os sistemas de cultivo apresentam vantagens e desvantagens: em sistemas abertos, geralmente de menor custo de implantação e de operação, podemos observar maior facilidade na limpeza dos aparatos, exposição direta a iluminação solar, em contrapartida, os sistemas abertos são dependentes do clima externo, maior susceptibilidade a contaminação microbiana, perdas de CO₂, além de necessitar de uma área maior comparado aos sistemas fechados (CHISTI 2012; 2013). Em sistemas fechados o cultivo parte de ambiente mais controlado por não estar diretamente exposto ao ambiente externo, conseqüentemente maior controle na entrada de contaminantes e perdas do CO₂ (ACIÉN *et al.*, 2017).

Nos cultivos de microalgas, as características de crescimento e composição bioquímica das células são significativamente dependentes das condições de cultivo (CHOJNACKA *et al.*, 2004; CHEW *et al.*, 2018). Por apresentar características adaptativas, as microalgas são capazes de realizar mudanças metabólicas dependendo das condições ambientais (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010). Dentro dessas características adaptativas podemos citar quatro principais condições de cultivo: cultivo fotoautotrófico, heterotrófico, mixotrófico e fotoheterotrófico (CHEN *et al.*, 2011). O modo fotoautotrófico é o modo de cultivo mais antigo e mais comumente utilizado, nessa condição de cultivo, por meio da fotossíntese as células algais captam e transformam a energia luminosa em energia química, para a assimilação e fixação do carbono inorgânico proveniente do ar atmosférico ou da injeção artificial de CO₂, transformando este elemento em compostos orgânicos mais reduzidos, principalmente açúcares (HUANG *et al.*, 2010). No cultivo heterotrófico não há emprego de fonte de luz, as microalgas utilizam uma fonte de carbono orgânico para obtenção deste elemento e como fonte energética (CHOJNACKA *et al.*, 2004).

A principal desvantagem do cultivo heterotrófico é a influência nas ocorrências de contaminação microbiana pela utilização da fonte de carbono orgânico além do aumento no custo na produção (CHEN *et al.*, 2011). A condição de cultivo mixotrófico é a junção dos dois modos nutricionais, onde as células algais crescem simultaneamente com a utilização do carbono orgânico e do carbono inorgânico (ABE; IMAMAKI; HIRANO, 2002; ZHAN; RONG; WANG, 2017). Por fim, o cultivo foto-heterotrófico, representa uma condição de cultivo em que microalgas requerem luz como fonte de energia e compostos orgânicos como fonte de carbono (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

1.2.1 *Phaeodactylum tricornutum* e *Scenedesmus obliquus*

As espécies de microalgas selecionadas para este estudo foram a Clorofíceas *Scenedesmus obliquus* e a diatomácea *Phaeodactylum tricornutum*. A classe Bacilariofíceas, ou das diatomáceas, é composta por um notável número de organismos unicelulares, podendo as células estar ligadas umas às outras formando cadeias. São microalgas de grande importância na constituição da base da cadeia alimentar, especialmente marinha, e devido às suas características, as diatomáceas despertam grande interesse biotecnológico e econômico. Dentre as espécies que compõem o grupo, *Phaeodactylum tricornutum* é uma espécie marinha que vem tendo grande destaque e interesse nas pesquisas, devido, principalmente, a presença de alta quantidade de ácido eicosapentaenoico (EPA), além de conter em sua composição outros ácidos graxos monoinsaturados, como o ácido palmitoleico (C16:1 n7), minerais e diferentes carotenoides, como a fucoxantina, um pigmento de elevado valor comercial (REBOLLOSO-FUENTES, NAVARRO-PEREZ, 2000; RYCKEBOSCH *et al.*, 2012; NEUMANN *et al.*, 2018;).

As Clorofíceas, ou algas verdes, são um grupo que apresenta grande variedade morfológica. Dentre os representantes desta classe, os gêneros *Scenedesmus* e *Chlorella* se tornaram organismos-modelo em diversos campos da limnologia e posteriormente na biotecnologia, sendo bastante utilizados em diversas áreas de pesquisa como: aquicultura, biotecnologia e gerenciamento da qualidade de água. Nos últimos anos, as pesquisas fizeram com que estes gêneros fossem apontados como organismos muito eficientes no processo de fixação de CO₂ e que por conta de seu teor lipídico em determinadas condições de cultivo, podem ser classificados como uma matéria-prima promissora para diversas finalidades (BLERSCH *et al.*, 2013; TANG *et al.*, 2012; XIN *et al.*, 2010; MANDAL; MALLICK, 2009; YONGMANITCHAI; WARD, 1991).

1.3 CARBONO

No cultivo de microalgas, o carbono é considerado o macronutriente mais importante em termos de quantidade, uma vez que aproximadamente 50% da biomassa microalgal seca é composta por este elemento, que tem papel importante no crescimento da cultura (SÁNCHEZ MIRÓN *et al.*, 2003; CHISTI, 2007).

O processo de fotossíntese consiste na conversão da energia luminosa em energia química na forma de ATP (adenosina trifosfato) e de NADPH (nicotinamida adenina

dinucleotídeo fosfato). Utilizando esse potencial redox da fase fotoquímica, as microalgas têm a capacidade de reduzir o CO₂ para sintetizar compostos orgânicos como carboidratos, proteínas, assim como outros compostos orgânicos celulares (RICHMOND, 2004).

No meio aquoso, o carbono inorgânico pode ser encontrado nas seguintes formas: dióxido de carbono (CO₂), ácido carbônico (H₂CO₃), bicarbonato (HCO₃⁻) e carbonato (CO₃²⁻). De acordo com a Lei de Henry, a concentração de CO₂ dissolvido no meio de cultura em equilíbrio (saturação) é diretamente proporcional à pressão parcial de CO₂, à temperatura e à salinidade (SCHMIDELL, 2001). A solubilidade do CO₂ na água aumenta com o aumento da pressão parcial de CO₂, e diminui com o aumento da temperatura, conforme equação (2). A forma em que o carbono será armazenado pela célula pode variar entre as classes de microalgas, e a quantidade desse composto que será armazenada é dependente das condições ambientais, principalmente do pH (FALKOWSKI; RAVEN, 1997). Essas reações podem ser exemplificadas pela Equação 1:



$$C_s = H \cdot P_g \quad (2)$$

Onde:

C_s = concentração de CO₂ na saturação (gCO₂/l)

H = constante de Henry (gCO₂/l · atm)

p_g = pressão parcial de CO₂ na fase gasosa (atm) = ^xCO₂.P

^xCO₂ = fração molar ou volumétrica do CO₂ no gás.

P_g = pressão total do gás (atm)

O CO₂, quando em contato com a água, reage formando o ácido carbônico, o qual pode ser dissociado em íons de bicarbonato e H⁺. O bicarbonato, por sua vez, pode ser dissociado em íons carbonato e H⁺. Essas reações são dependentes do pH do meio de cultivo (NEVES *et al.*, 2018).

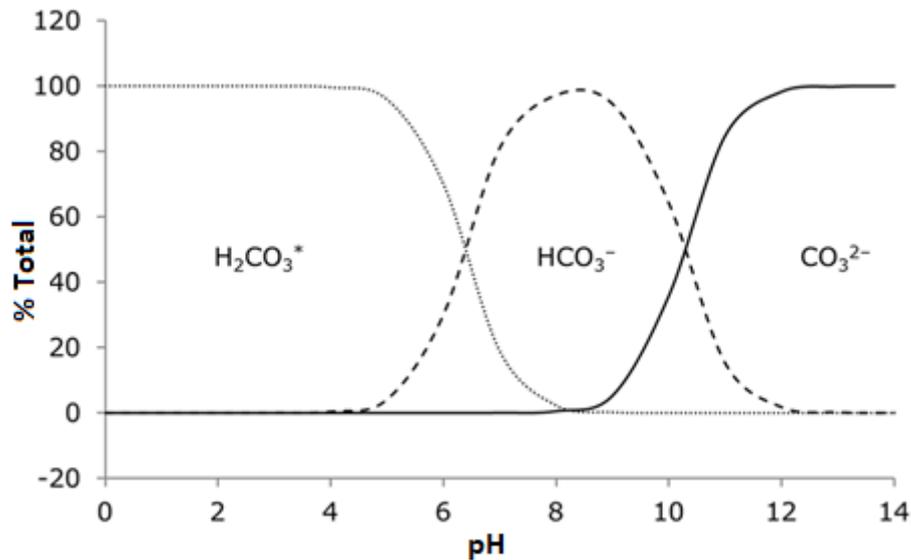
Para a maioria das microalgas, o CO₂ é a fonte preferencial de carbono inorgânico, uma vez que este gás tem uma rápida difusão (difusão passiva) da água para o interior das células e é usado diretamente nos processos de biofixação, com gasto energético reduzido. Quando utilizado, o bicarbonato é incorporado de forma ativa, gerando um maior gasto energético para suportar este processo da redução da molécula (TU *et al.*, 2018).

Apenas 0,038% do ar atmosférico é composto por dióxido de carbono, visto que apenas a difusão natural do ar atmosférico para o meio de cultura não satisfaz as necessidades de carbono em cultivos intensivos de alta produtividade, faz-se necessária a introdução de CO₂ nas culturas. Por ser a fonte de carbono mais utilizada para as culturas de microalgas, o CO₂ é um dos insumos que mais encarecem a produção em larga escala. De Godos *et al.* (2014), reportam que a utilização de CO₂ como fonte de carbono nos cultivos pode ser responsável por valores entre 8% e 27% dos custos de produção da biomassa. A injeção de CO₂ nos cultivos de microalgas pode ser feita através de ar atmosférico enriquecido com este gás proveniente de cilindros pressurizados de CO₂ puro (MORAIS; COSTA, 2008; JACOBLOPEZ *et al.*, 2008; CHIU *et al.*, 2008; CHIU *et al.*, 2009; BILANOVC *et al.*, 2009; NEVES *et al.*, 2018).

Em meio líquido, o dióxido de carbono tem reação diferente daquela verificada com outros gases, como o oxigênio e o nitrogênio, isso, porque a sua concentração na água é determinada pela relação de equilíbrio gás-líquido, além de ser levado em consideração as reações ácido-base no meio. Esse equilíbrio entre gás-líquido influencia na transferência de CO₂ entre o ar e o meio de cultura, enquanto as reações ácido-base determinam em qual forma química o carbono inorgânico dissolvido estará presente na água. Somados, o CO₂, H₂CO₃, HCO₃⁻ e CO₃²⁻, resultam na quantificação do carbono disponível para fotossíntese das microalgas (WETZEL; LIKENS, 2000).

Reconhecidamente, a concentração de dióxido de carbono dissolvido está diretamente relacionada a parâmetros como o pH e a alcalinidade (TIMMONS; EBELING, 2007). Quanto mais ácido o meio, maior a proporção de CO₂ livre, e quanto mais básico, maior as proporções de bicarbonato e carbonato na água. A partir do conhecimento de dois destes três compostos (dióxido de carbono, bicarbonato e carbonato) é possível determinar a alcalinidade total e a concentração de equilíbrio do CO₂ (TIMMONS; EBELING, 2007; NEVES *et al.*, 2018).

Figura 1 - Formas de carbono inorgânico em função do pH do meio líquido.



(BELTRÁN-ROCHA *et al.*, 2017).

1.4 PARÂMETROS DE QUALIDADE DE ÁGUA

Na aquicultura, a qualidade de água engloba diversos parâmetros físicos, químicos e biológicos, sendo que, a maioria dos procedimentos de manejo nos cultivos é dependente destas condições ambientais para melhorar a produção aquícola (BOYD, 1990). A alcalinidade total da água é um desses importantes parâmetros, e se refere à capacidade de neutralização de ácidos fracos, sendo considerada de elevada alcalinidade uma água com riqueza em íons de bicarbonato e carbonato.

O equilíbrio ácido-base se destaca dentre as características limnológicas e de qualidade de água, por estar diretamente relacionado ao pH e à alcalinidade, esses compostos são responsáveis pelo tamponamento da água em relação ao pH, agindo contra grandes oscilações deste parâmetro. A atividade fotossintética é um importante fator biológico que pode afetar o pH e a alcalinidade nos cultivos, isso porque o CO₂ é removido pelas células algais durante a fotossíntese, e conseqüentemente ocorre acúmulo de carbonato e hidrólises na água resultando no aumento do pH, porém, essa elevação é dependente de outros fatores como a alcalinidade (BOYD, 1990; SÁ, 2012; ARIDE *et al.*, 2007; ANDRADE *et al.*, 2007). Parâmetros como alcalinidade e pH estão diretamente relacionadas à concentração e à forma química do carbono encontrada em meio líquido, podendo tanto alterar quanto ser alterados pela atividade microalgal (BOYD, 1990).

Os bicarbonatos e os carbonatos são responsáveis pelo tamponamento da água, prevenindo grandes variações no pH, tanto para mais como para menos. Com a remoção do CO₂ da água durante o processo da fotossíntese, há elevação do pH da água pelo consequente consumo de íons H⁺, como na seguinte reação descrita por BOYD (1979).



A elevação do pH por ação da fotossíntese dependerá, dentre outros fatores, da alcalinidade da água, assim, em águas de baixa alcalinidade espera-se uma alcalinização do meio (BOYD, 2000). Embora o efeito da fotossíntese sobre o pH da água já esteja bem demonstrado pela literatura, há ausência de estudos sobre o efeito da alcalinidade sobre o crescimento das culturas de microalgas. Neste trabalho foi realizado um estudo visando um maior conhecimento das interações que envolvem a alcalinidade no crescimento das culturas de microalgas e na eficiência da biofixação de CO₂.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo Geral

Determinar o efeito da alcalinidade do meio de cultura no cultivo das microalgas *Phaeodactylum tricornutum* e *Scenedesmus obliquus*.

1.5.2 Objetivos Específicos

- Determinar o efeito da alcalinidade nos parâmetros de crescimento nas culturas de *P. tricornutum* e *S. obliquus*;
- Determinar o efeito da alcalinidade na eficiência da fixação do CO₂ pela biomassa microalgal nas culturas de *P. tricornutum* e *S. obliquus*;

2 DESENVOLVIMENTO DO ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo a ser submetido à Revista Journal of Applied Phycology (ISSN: 0921-8971, Qualis: A2, Área: Zootecnia e Recursos Pesqueiros).

EFEITO DA ALCALINIDADE SOBRE O CRESCIMENTO DAS MICROALGAS

Scenedesmus obliquus e Phaeodactylum tricornutum.

Thayna Lye Viegas Freitas*, Carlos Yure Barbosa de Oliveira, Rafael da Silva Menezes, Rafael Garcia Lopes¹ & Roberto Bianchini Derner¹

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Aquicultura, Laboratório de Cultivo de Algas, Florianópolis, Brasil

*Autor correspondente: Thaynaviegas_132@hotmail.com

2.1 INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos que vem despertando um grande interesse biotecnológico, devido à grande quantidade de compostos orgânicos encontrados na biomassa, dentre esses, podemos citar uma ampla gama de produtos altamente valiosos, incluindo ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), carotenoides, ficobiliproteínas e polissacarídeos (RICHMOND, 2004; DERNER, 2006; DEL CAMPO *et al.*, 2007; BAHADUR *et al.*, 2015).

Na aquicultura, a qualidade de água engloba diversas variáveis físicas, químicas e biológicas, na qual a maioria dos procedimentos de manejo dos cultivos é dependente destas condições para melhorar a produção aquícola (BOYD, 1990). Grande parte do sucesso dos empreendimentos aquícolas depende da qualidade da água na qual os organismos vivem. Dentre os aspectos limnológicos de importância para vida aquática, destaca-se o equilíbrio ácido-base da água, que está diretamente relacionado com seu pH (ARIDE *et al.*, 2007) e alcalinidade (ANDRADE *et al.*, 2007). A alcalinidade total da água se refere à sua capacidade de neutralização de ácidos fracos, ou seja, uma água com riqueza em íons de bicarbonato e carbonato, principalmente, descrita em equivalentes de carbonato de cálcio. Os bicarbonatos e os carbonatos são responsáveis pelo tamponamento do pH da água, prevenindo grandes variações neste parâmetro, tanto para mais como para menos.

O equilíbrio ácido-base, se destaca dentre as características limnológicas, porque está diretamente relacionado ao pH e à alcalinidade. A atividade fotossintética é um importante fator

biológico que pode afetar estas variáveis nos cultivos. No processo, o CO₂ é removido pelas algas durante a fotossíntese resultando no aumento do pH, porém, essa elevação é dependente de outros fatores como a alcalinidade (BOYD, 1990; SÁ, 2012).

Para a maioria das microalgas o CO₂ é a principal fonte de carbono utilizada, uma vez que este gás tem uma rápida difusão (difusão passiva) da água para o interior das células e é usado diretamente nos processos de biofixação, com gasto energético reduzido. Quando utilizado, o bicarbonato é incorporado de forma ativa, gerando um maior gasto energético para suportar este processo da redução da molécula. A forma que o carbono será armazenado pela célula pode ser variada entre as classes de microalgas e a quantidade que esse composto será armazenado é dependente das condições ambientais (FALKOWSKI; RAVEN, 1997). Existem diferentes vias metabólicas possíveis para a redução e fixação do carbono, dentre essas, o carbono pode ser armazenado na forma de lipídios ou carboidratos (SHEEHAN *et al.*, 1998). O carbono inorgânico pode ser encontrado no meio nas seguintes formas: dióxido de carbono (CO₂), ácido carbônico (H₂CO₃), o bicarbonato (HCO₃⁻) e carbonato (CO₃²⁻). De acordo com a Lei de Henry, a concentração de CO₂ dissolvido no meio de cultura em equilíbrio (saturação) é diretamente proporcional à pressão parcial de CO₂, à temperatura e à salinidade (SCHMIDELL, 2001).

Parâmetros como Alcalinidade e pH estão relacionados à concentração e à forma química do carbono no meio líquido, podendo tanto alterar quanto ser alterados pela atividade microalgal (BOYD, 1990). Estudos relacionados ao efeito e a relação da Alcalinidade e pH com produtividade nos cultivos de microalgas são pouco conhecidos. Nesse estudo, a diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* e a clorofícea *Scenedesmus obliquus* foram escolhidas como organismos modelos para avaliar o efeito da alcalinidade e da adição de bicarbonato em culturas experimentais destas microalgas. Visando um maior conhecimento das interações que envolve a alcalinidade (adição do bicarbonato) no desenvolvimento das culturas de microalgas e na eficiência da biofixação de CO₂ pelas culturas, este trabalho propôs um estudo aprofundado deste parâmetro e seus efeitos nos cultivos de microalgas.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Material Biológico

Para o desenvolvimento deste estudo foram utilizadas duas espécies de microalgas: *Scenedesmus obliquus*, cepa isolada e mantida pelo laboratório de Cultivo de Algas (LCA) da

Universidade Federal de Santa Catarina e *Phaeodactylum tricornutum* (cepa CCAP1055/1). Para produção dos inóculos foram desenvolvidas culturas empregando meio LCA-AD modificado do meio BBM (Stein, 1973) para *S. obliquus* e meio LCA-AM modificado do meio Conway (Walne, 1966) para *P. tricornutum* (OLIVEIRA *et al.*, 2020; SALES; DERNER; TSUZUKI, 2019).

2.2.2 Condições Experimentais

As culturas experimentais foram desenvolvidas em frascos tipo Schott de borossilicato, contendo 1 L de meio de cultura. Foram estabelecidos três tratamentos, sendo um controle (três réplicas) em diferentes alcalinidades: para *S. obliquus*, as culturas foram conduzidas com 0, 3 e 5g de HCO_3^- correspondentes as alcalinidades de 40 mg L^{-1} , 280 mg L^{-1} , 480 mg L^{-1} , respectivamente e para *P. tricornutum* os valores foram de 0, 4 e 6g de HCO_3^- correspondente as alcalinidades de 130 mg L^{-1} , 380 mg L^{-1} e 560 mg L^{-1} respectivamente. A alcalinidade das culturas foi alterada no início do experimento em cada uma das unidades experimentais, sem correção diária.

As unidades experimentais foram inoculadas com biomassa de $0,15 \text{ g L}^{-1}$ e de $0,50 \text{ g L}^{-1}$ para *S. obliquus* e *P. tricornutum*, respectivamente, em meio de cultura LCA-AD ou LCA-AM, de acordo com a espécie. As culturas foram mantidas em irradiância de $400 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ em fotoper\u00edodo cont\u00ednuo (24:0), em temperatura de $24 \text{ }^\circ\text{C}$ para *S.obliquus* e de $21 \text{ }^\circ\text{C}$ para *P. tricornutum*. As culturas foram constantemente agitadas atrav\u00e9s do borbulhamento do ar atmosf\u00e9rico e um sistema independente deste para inje\u00e7\u00e3o do CO_2 , que por sua vez tamb\u00e9m foi monitorada e controlada pelo sistema automatizado Apex Neptune System.

Diariamente, e at\u00e9 o segundo dia da fase estacion\u00e1ria, foram coletadas amostras das culturas para a determina\u00e7\u00e3o dos par\u00e2metros de cultivo (alcalinidade, pH, consumo de CO_2 e concentra\u00e7\u00e3o de nutrientes) e dos par\u00e2metros de crescimento (biomassa e densidade celular). Foi utilizada a aera\u00e7\u00e3o por ar comprimido independente do sistema de inje\u00e7\u00e3o sob demanda do CO_2 , que por sua vez tamb\u00e9m foi monitorada e controlada pelo sistema automatizado Apex Neptune System. Deste modo, cada unidade experimental foi \u00fanica, sem interfer\u00eancia dos demais tratamentos. Para o controle e monitoramento do pH, foi empregado um sistema automatizado – APEX (Neptune System). Este sistema permite o acompanhamento em tempo real das vari\u00e1veis desejadas das culturas em andamento, inclusive atrav\u00e9s de aplicativo de celular, oferecendo um maior controle e seguran\u00e7a aos experimentos e outras formas de cultivos.

2.2.3 Determinação dos Parâmetros de Crescimento

Diariamente, e até o segundo dia da fase estacionária, foram coletadas amostras das culturas para a determinação dos parâmetros de crescimento: biomassa em massa seca (g L^{-1}) e densidade celular em número de células por volume (cel mL^{-1}). Para a determinação da biomassa por gravimetria, foram filtrados 10 mL de cultura em microfiltros de fibra de vidro (porosidade de $0,7 \mu\text{m}$) e a seguir os filtros foram secados em estufa a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h. Para a determinação da densidade celular, foi empregado Câmara de Neubauer e microscópio óptico.

2.2.4 Parâmetros de Qualidade de Água

2.2.4.1 Análise de Alcalinidade

Diariamente, e até o segundo dia da fase estacionária, foram coletadas amostras das culturas para a determinação da alcalinidade. Para determinação da alcalinidade total da água (carbonatos e bicarbonatos, em mg L^{-1}) foram coletadas amostras de 10 mL que foram submetidas ao método titulométrico, utilizando solução de Ácido clorídrico 0,02 N e um indicador misto (APHA, 2005).

2.2.4.2 Avaliação Da Fixação De Carbono

A taxa máxima da fixação do carbono é representada pela relação entre a quantidade ofertada de CO_2 e a quantidade de carbono fixada em termos de biomassa (%). A quantidade de CO_2 ofertado foi determinada com os dados obtidos com auxílio da Central de Controle APEX. Para o cálculo da eficiência foram empregadas as seguintes equações (APEL *et al.*, 2017):

$$m_{\text{CO}_2} = m_{(c.\text{fixado})} \cdot m_{(c.\text{ofertado})}^{-1} \quad (4)$$

$$m_{(c.\text{fixado})} = 0,5 \cdot (CDW_{(t_2)} - CDD_{(T_1)}) \cdot V_{\text{cultivo}} \quad (5)$$

$$m_{(c.\text{ofertado})} = \left((F_{\text{CO}_2} \cdot T_{\text{ON}}) \cdot 22,47 \right) \cdot 12^{-1} \quad (6)$$

Onde:

m_{CO_2} = massa de CO_2

$(m_{(C, \text{fixado})})$ = Massa do carbono fixado

$(m_{(C, \text{ofertado})})$ = Massa do carbono total ofertado

Para o cálculo de conversão, foi considerado que o conteúdo de carbono na biomassa seca foi de 50% (TANG *et al.*, 2011). A conversão do CO_2 gasoso em massa de carbono foi desenvolvida pela aplicação da Lei ideal dos gases de Boyle-Mariotte, onde, em 1 atm e a 25 °C, 22,47 L de CO_2 gasoso correspondem a 1 mol de dióxido de carbono, e cada mol de CO_2 corresponde a 12 g de carbono. Aplicando a seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência de fixação de } CO_2 = C_C P (M_{CO_2} M_C) V_{CO_2} 100 \quad (7)$$

$$V_{CO_2} = \text{taxa de } CO_2 \text{ injetada na cultura (g L}^{-1} \text{h}^{-1}\text{)}$$

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

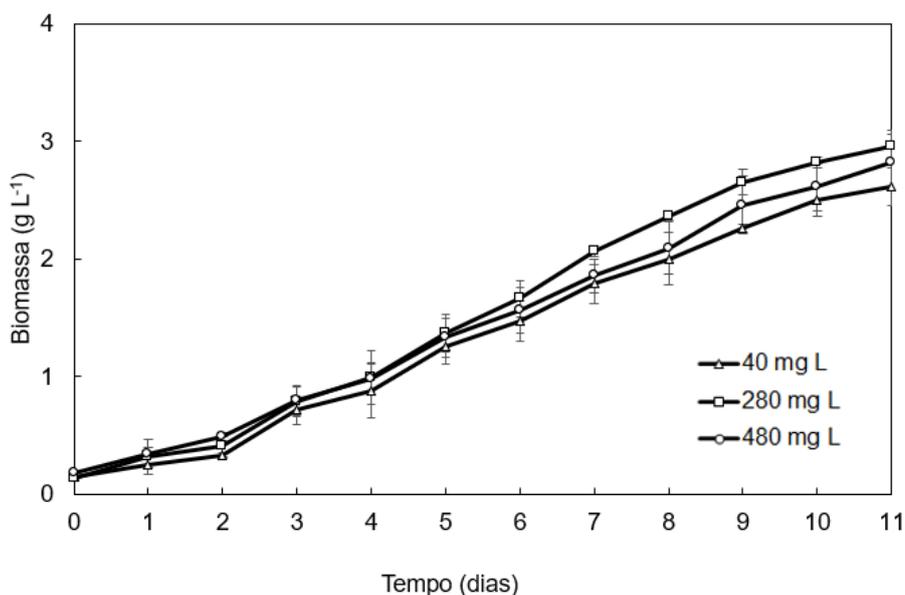
2.3.1 Parâmetros de Crescimento

Na Figura 2 são apresentadas as curvas de crescimento de *S. obliquus* em biomassa. As culturas alcançaram a fase exponencial em doze dias de cultivo, quando no tratamento controle (alcalinidade de 40 mg L⁻¹) a biomassa máxima alcançada foi de 2,61 g L⁻¹, no tratamento com alcalinidade 280 mg L⁻¹ a biomassa máxima alcançada foi de 2,96 g L⁻¹ e 2,82 g L⁻¹ no tratamento com alcalinidade 480 mg L⁻¹. Não apresentando diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos propostos.

No presente estudo foi possível observar uma tendência de maiores valores de biomassa de *S. obliquus* para o tratamento com alcalinidade correspondente a 280 mg L⁻¹. Uma hipótese para essa resposta pode estar relacionada a disponibilidade de CO_2 em maior volume, necessária para a regulação do pH nos tratamentos com maior alcalinidade, estes resultados corroboram com os resultados descritos por Xue *et al.* (2015), onde foram obtidas melhores taxas de crescimento em maiores concentrações de CO_2 e com Pancha *et al.* (2015), que em seu estudo com a adição de bicarbonato de sódio em doses entre 0,6-1,5 g L⁻¹ obtiveram maior produtividade com 1,2 g L⁻¹ sendo superior à cultura cultivada com BG-11 (sem utilização do

bicarbonato), encontrando respostas positivas para a suplementação do meio. Por sua vez, Gardner *et al.* (2012) vai de encontro ao descrito nos estudos citados acima, onde os resultados de seu estudo demonstraram que a adição de bicarbonato após o quarto dia de cultivo causou interrupção da replicação celular em *Scenedesmus* sp. Estes dados podem justificar a tendência nos valores de biomassa mais baixos para o tratamento com maior alcalinidade (480 mg L⁻¹).

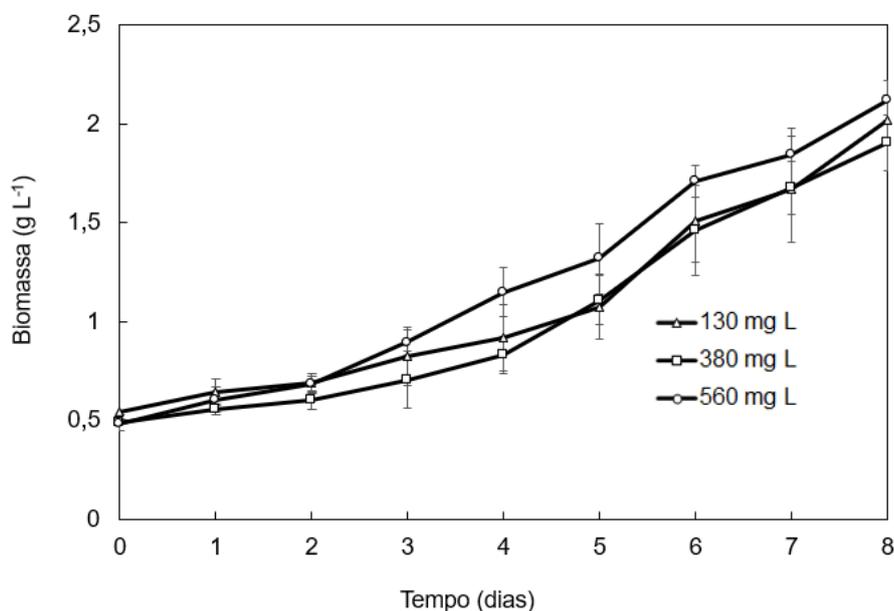
Figura 2 – Curvas de crescimento em biomassa (g L⁻¹) de *S. obliquus*. (Δ) 40 mg L⁻¹; (□) 280 mg L⁻¹; (o) 480 mg L⁻¹.



A biomassa máxima alcançada nas culturas de *P. tricornutum* com alcalinidade 560 mg L⁻¹ foi de 2,12 g L⁻¹, não apresentando diferenças significativas ($p < 0,05$) dos demais tratamentos que foi de 2,01 g L⁻¹ e de 1,90 g L⁻¹, respectivamente nos tratamentos com alcalinidade 130 mg L⁻¹ e 380 mg L⁻¹.

Na Figura 3 é possível observar que nas culturas de *P. tricornutum* a aplicação das diferentes alcalinidades iniciais do meio não apresentou efeitos estatisticamente significativos sobre as biomassas máximas alcançadas.

Figura 3 – Curvas de crescimento em biomassa (g L^{-1}) de *P. tricornutum*. (Δ) 130 mg L^{-1} ; (\square) 380 mg L^{-1} ; (\circ) 560 mg L^{-1} .



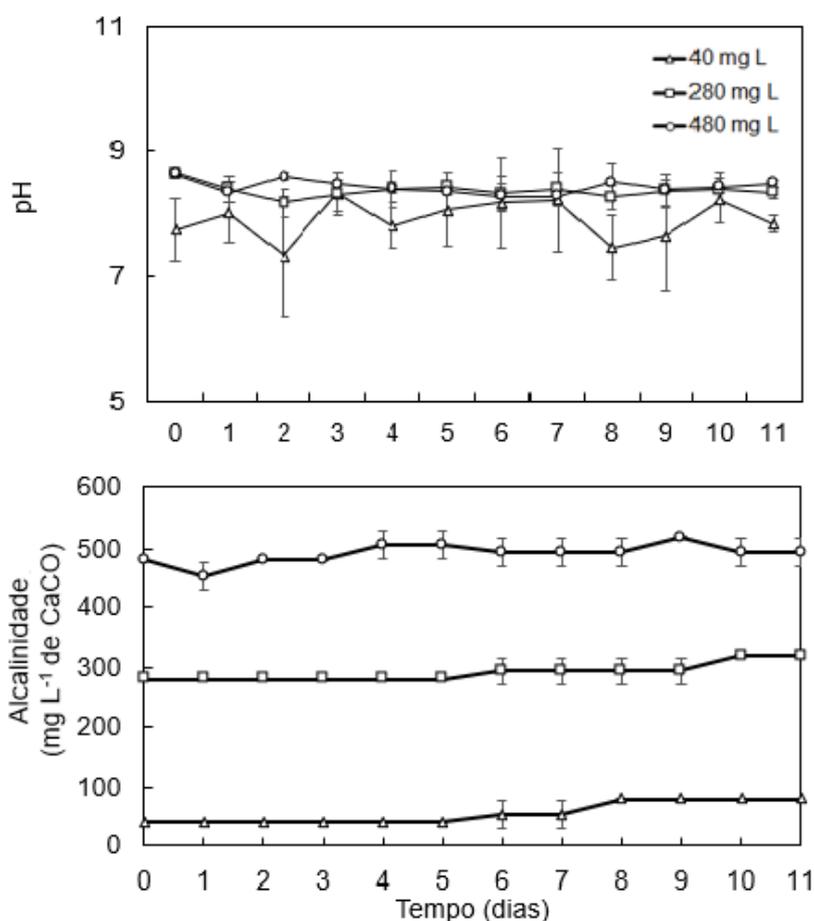
Estudos desenvolvidos com a mesma espécie por Peng *et al.* (2014) vão de encontro a este resultado, onde foi encontrada maior produção de biomassa em culturas cultivadas na presença de bicarbonato de sódio. Já os resultados de White *et al.* (2013) sugerem que a maior adição de bicarbonato de sódio (2 g L^{-1}) resultou em crescimento reduzido para a espécie *Nannochloropsis salina*, e teve efeitos não significativos sobre taxas de crescimento no mesmo estudo para a espécie *Tetraselmis suecica*. Estes diferentes resultados, parecem sugerir a ocorrência de respostas próprias de cada espécie em relação à adição de bicarbonato sobre a divisão celular e biomassa alcançada.

2.3.2 Alcalinidade e pH

Na Figura 4 são apresentados os dados da alcalinidade e do pH (média e desvio padrão) nas culturas de *S. obliquus*, onde é possível observar que a alcalinidade se manteve estabilizada e conforme os tratamentos durante todo o período de cultivo experimental. Estudos sugerem que para a maioria das microalgas o CO_2 é a fonte de carbono preferida, já que se difunde rapidamente da água para o interior das células. Já o bicarbonato, por sua vez dependendo da espécie, deve ser convertido em CO_2 para assimilação, gerando um maior gasto energético para este processo (GOLDMAN *et al.*, 1972; TREVAN, 2007). Essa seria possivelmente uma

hipótese para os resultados de alcalinidade do presente estudo, não tendo ocorrido variações nos valores durante o cultivo para *S. obliquus*. Ao contrário dos resultados obtidos, outros estudos relatam que a adição de bicarbonato de sódio ao meio de cultura apresentou um aumento significativo na biomassa em culturas de microalgas do gênero *Scenedesmus* (WHITE *et al.*, 2013; PANCHA *et al.*, 2015).

Figura 4 – Valores de pH e de alcalinidade nas culturas de *S. obliquus*. (Δ) 40 mg L⁻¹; (\square) 280 mg L⁻¹; (\circ) 480 mg L⁻¹.

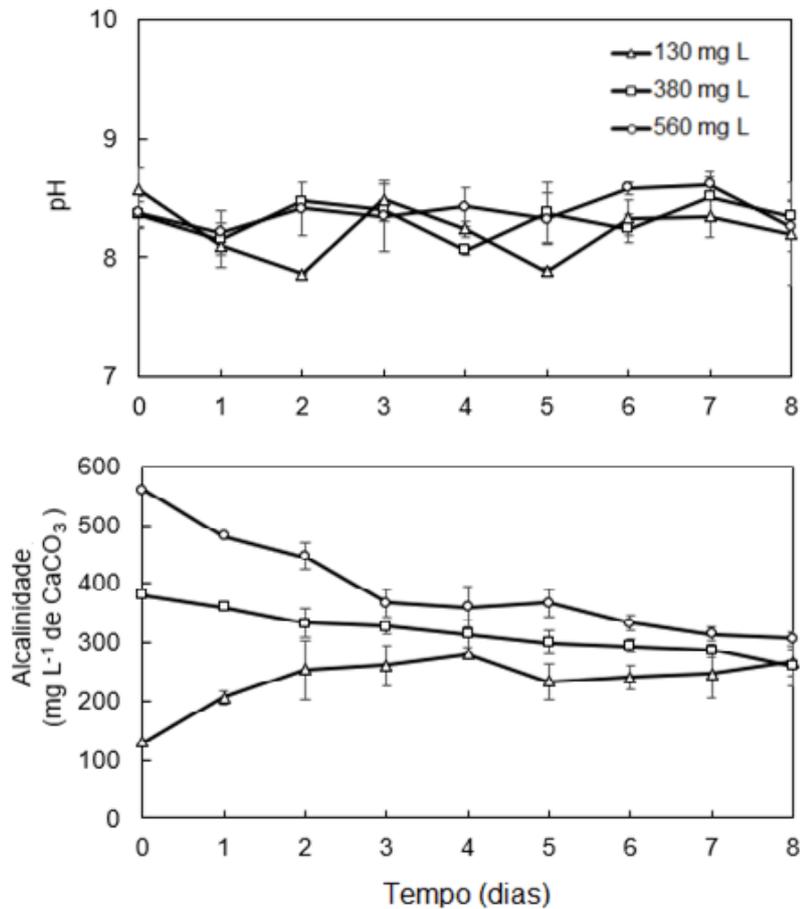


É possível observar na Figura 4 que no tratamento controle com 40 mg L⁻¹ ocorreu uma maior variação do pH, apresentando valores mais baixos, parecendo indicar uma menor capacidade de tamponamento. Em contraponto, essa característica foi determinante para uma menor necessidade de CO₂ durante o desenvolvimento do cultivo. Segundo WU; GAO; RIEBESELL (2010), concentrações aumentadas de CO₂, associadas à diminuição do pH, influenciaram significativamente as taxas de crescimento de três espécies de microalgas de água doce. Neste trabalho no cultivo de *P. tricornutum* ocorreu uma queda nos valores de alcalinidade de cerca de 130 mg L⁻¹ durante o experimento nos tratamentos com a inclusão de

bicarbonato para ajuste inicial da alcalinidade, este resultado pode indicar um provável aproveitamento do bicarbonato disponível como fonte de carbono combinado ao CO₂ ofertado, ou até mesmo uma ciclagem do carbono em função do pH da cultura.

Na Figura 5 são apresentados os valores da alcalinidade nas culturas de *P. tricornutum*, onde é possível observar uma faixa menor de variação. Os menores valores encontrados de pH para todos os tratamentos foram de 7,8; 8,06; 8,21 para o controle (sem adição de bicarbonato), 380 mg L⁻¹ e 560 mg L⁻¹ respectivamente, isso pode estar relacionado à capacidade de tamponamento, ou seja, quanto maior a alcalinidade, maior a capacidade de tamponamento, assim, devido a essa alta capacidade foi possível observar que os valores de pH não apresentaram grandes variações. Nos tratamentos com alcalinidade mais alta houve uma maior resistência do meio em relação à alteração do pH, com isso, foi necessária maior injeção de CO₂ em termos de volume e em maior frequência.

Figura 5 - Valores de alcalinidade e de pH para os tratamentos com a espécie *P. tricornutum*. (Δ) 130 mg L⁻¹; (□) 380 mg L⁻¹; (o) 560 mg L⁻¹.



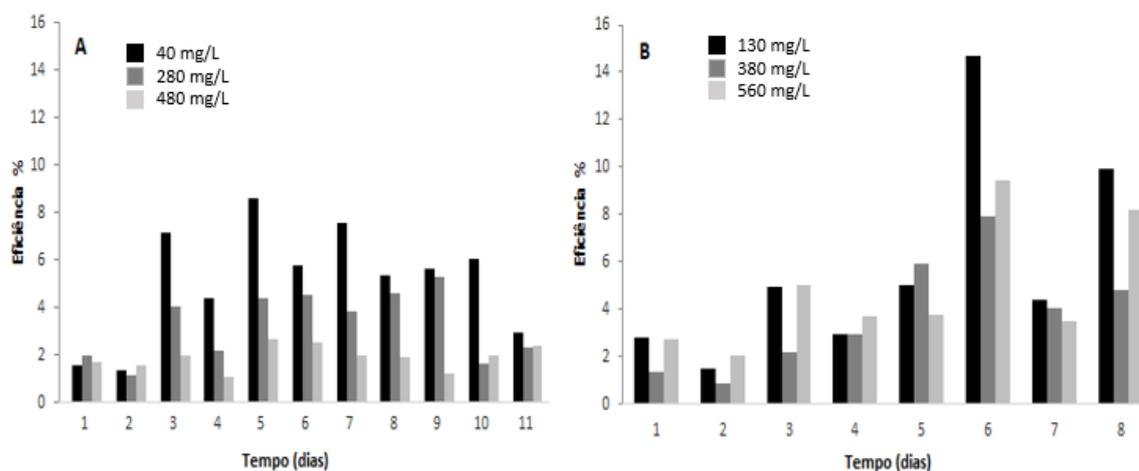
2.3.3 Eficiência na Fixação de Carbono

A eficiência na fixação do CO₂ para as células das microalgas é um importante parâmetro a ser avaliado nos cultivos, para que se torne possível a otimização do gasto com CO₂ e a diminuição na quantidade perdida para atmosfera após a saturação do sistema (meio de cultura). Os valores de eficiência na fixação de carbono verificadas no presente estudo variaram entre 8,61% e 1,05% nas culturas de *S. obliquus* e de 14,67% a 0,91% nas culturas de *P. tricornutum*. Na Figura 6 são apresentados os dados de eficiência na biofixação do carbono, e podemos observar que no segundo dia de cultivo houve uma eficiência mais baixa para todos os valores. Esse comportamento parece estar relacionado à fase de aclimatação das culturas, onde a duplicação celular ainda é pequena por conta das possíveis mudanças nas condições ambientais de cultivo. Os valores máximos de eficiência foram verificados no oitavo dia nas culturas de *S. obliquus* e no sexto dia nas culturas de *P. tricornutum* nos tratamentos sem alteração de alcalinidade. Levando em consideração a maior necessidade de injeção de CO₂ para os tratamentos com maior alcalinidade, os resultados do presente estudo corroboram com aqueles encontrados por Neves *et al.* (2019), nos quais o tratamento com menor entrada de CO₂ apresentou melhores resultados, alcançando 75% de biofixação Venancio *et al.* (2020) reportam que é importante pontuar que essa taxa de biofixação é diretamente relacionada com a quantidade de CO₂ ofertada, tamanho da unidade experimental e sistema de cultivo empregado. Em um estudo com *S. obliquus* em um sistema laminar, estes autores obtiveram uma eficiência máxima de 62% na conversão do CO₂ em biomassa, e verificaram uma significativa redução na eficiência a partir do décimo dia de cultivo para 14%. Os autores concluíram que a partir do décimo dia de cultivo, o CO₂ foi utilizado em grande parte apenas para manutenção do pH da cultura e não para a síntese de biomassa. Esse dado sugere que a automação do cultivo de microalgas, aplicando a injeção de CO₂ em função do pH não viabilizou uma otimização na conversão do carbono para o presente estudo quando utilizamos a adição de bicarbonato.

Zheng *et al.* (2011) demonstram que a eficiência na conversão de CO₂ diminuiu quando a concentração deste gás foi aumentada através do aumento no fluxo de entrada de ar. Os autores encontraram porcentagens de biofixação entre 0,60% e 3,72% para culturas com 5, 10 e 15% de CO₂, altas concentrações de CO₂, ao contrário do que se imagina, apresentam menores eficiências quando compradas a taxas mais baixas isso ocorre porque grande parte do que se é injetado no cultivo é perdido para atmosfera, ou seja, a redução de CO₂ no ar de entrada pode evitar perdas de CO₂ para o ar atmosférico (ZHENG *et al.*, 2011).

Neves *et al.* (2019) afirmam que em culturas onde foi empregada uma elevada quantidade de CO₂ a eficiência de biofixação foi reduzida e, isto corrobora os dados do presente estudo, onde a utilização de altas concentrações de CO₂ não se mostrou eficiente para a conversão do mesmo nos cultivos experimentais.

Figura 6 – Eficiência na biofixação de Carbono em culturas de *S. obliquus* (A) e *P. tricornutum* (B).



A determinação do coeficiente (KLa – CO₂) é uma importante ferramenta a ser empregada nos cultivos de microalgas, uma vez que o kLa é um fator que interfere diretamente na eficiência de biofixação do CO₂, onde, o coeficiente de transferência de massa da fase líquida, (kL), depende principalmente das propriedades do líquido, como densidade, viscosidade, difusividade e temperatura, e a área interfacial (a), que está em função do gás holdup e do tamanho das bolhas (CHISTI, 1989). Muitos estudos têm sido desenvolvidos visando o design e às condições operacionais em fotobiorreatores com o objetivo de aumentar a área interfacial (Fan *et al.*, 2008). Valores típicos de kLa para fotobiorreatores com utilização de borbulhamento de ar variam entre 5 a 100 h⁻¹. Pequenas colunas d'água apresentam um baixo tempo de retenção das bolhas, o que demonstra limitação na transferência de massa de CO₂ (Langley *et al.*, 2012), o que justifica os baixos valores na eficiência na conversão em menores volumes de coluna d'água e área de cultivo. A alcalinidade teve influência negativa na eficiência de assimilação do CO₂ nos tratamentos propostos, isso porque quanto mais tamponada a água, maior a quantidade de CO₂ para estabilização do pH nas unidades experimentais, o que implica na saturação da unidade experimental.

2.6 CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos, foi possível concluir que os valores de alcalinidade empregados não causaram diferenças estatísticas significativas nos parâmetros de crescimento nas culturas de *P. tricornutum* e *S. obliquus*. A alcalinidade teve influência negativa na eficiência de fixação do Carbono nas culturas de *P. tricornutum* e *S. obliquus*, uma vez que os maiores valores de alcalinidade resultaram em menor eficiência.

REFERÊNCIAS

- A. K. C.; . F.-J. M.-R. Kinetic and Stoichiometric Relationships of the Energy and Carbon Metabolism in the Culture of Microalgae. **Biotechnology** (Faisalabad), v. 3, n. 1, p. 21–34, 2004.
- ABE, K.; IMAMAKI, A.; HIRANO, M. Removal of nitrate, nitrite, ammonium and phosphate ions from water by the aerial microalga *Trentepohlia aurea*. **Journal of Applied Phycology**, v. 14, n. 2, p. 129–134, 2002.
- ACIÉN, F. G. *et al.* **Photobioreactors for the production of microalgae**. [s.l: s.n.].
- AMBATI, R. R. *et al.* Astaxanthin: Sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications - A review. **Marine Drugs**, v. 12, n. 1, p. 128–152, 2014.
- AMBATI, R. R. *et al.* Industrial potential of carotenoid pigments from microalgae: Current trends and future prospects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 12, p. 1880–1902, 2019.
- APEL, A. C. *et al.* Open thin-layer cascade reactors for saline microalgae production evaluated in a physically simulated Mediterranean summer climate. **Algal Research**, v. 25, n. May, p. 381–390, 2017.
- BAHADUR, B. *et al.* Plant biology and biotechnology: Volume II: Plant genomics and biotechnology. **Plant Biology and Biotechnology: Volume II: Plant Genomics and Biotechnology**, v. II, p. 1–768, 2015.
- BELTRÁN-ROCHA, J. C. *et al.* Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: Efecto del pH, nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO₂. **Revista de Biología Marina y Oceanografía**, v. 52, n. 3, p. 417–427, 2017.
- CHEN, C. Y. *et al.* Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 71–81, 2011.
- CHEN, Y. C. Immobilized *Isochrysis galbana* (Haptophyta) for long-term storage and applications for feed and water quality control in clam (*Meretrix lusoria*) cultures. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, n. 5, p. 439–444, 2003.

- CHEW, K. W. *et al.* Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 91, p. 332–344, 2018.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306, 2007.
- FALKOWSKI, P. G. *et al.* The evolution of modern eukaryotic phytoplankton. **Science**, v. 305, n. 5682, p. 354–360, 2004.
- FEHLING, J.; STOECKER, D.; BALDAUF, S. L. **Photosynthesis and the Eukaryote Tree of Life**. [s.l.] Elsevier Inc., 2007.
- GARDNER, R. D. *et al.* Use of sodium bicarbonate to stimulate triacylglycerol accumulation in the chlorophyte *Scenedesmus* sp. and the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 5, p. 1311–1320, 2012.
- HUANG, G. H. *et al.* Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v. 87, n. 1, p. 38–46, 2010.
- MASSANA, R. *et al.* Distribution and abundance of uncultured heterotrophic flagellates in the world oceans. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 1515–1522, 2006.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 1, p. 217–232, 2010.
- MULLER-FEUGA, A. The role of microalgae in aquaculture: Situation and trends. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, n. 3–5, p. 527–534, 2000.
- NEUMANN, U. *et al.* Anti-inflammatory effects of *Phaeodactylum tricorutum* extracts on human blood mononuclear cells and murine macrophages. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, n. 5, p. 2837–2846, 2018.
- NEVES, F. DE F. *et al.* Carbon biofixation and lipid composition of an acidophilic microalga cultivated on treated wastewater supplied with different CO₂ levels. **Environmental Technology (United Kingdom)**, v. 40, n. 25, p. 3308–3317, 2019.
- OLIVEIRA, C. Y. B. DE *et al.* A comparison of harvesting and drying methodologies on fatty acids composition of the green microalga *Scenedesmus obliquus*. **Biomass and Bioenergy**, v. 132, n. December 2019, p. 105437, 2020.
- PANCHA, I. *et al.* Bicarbonate supplementation enhanced biofuel production potential as well as nutritional stress mitigation in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 315–323, 2015.
- PENG, X. *et al.* Triacylglycerol accumulation of *Phaeodactylum tricorutum* with different supply of inorganic carbon. **Journal of Applied Phycology**, v. 26, n. 1, p. 131–139, 2014.

PIÑA, P. *et al.* Survival, development and growth of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* protozoa larvae, fed with monoalgal and mixed diets. **Aquaculture**, v. 253, n. 1–4, p. 523–530, 2006.

RAO, A. R. *et al.* Effective inhibition of skin cancer, tyrosinase, and antioxidative properties by astaxanthin and astaxanthin esters from the green alga *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 16, p. 3842–3851, 2013.

REBOLLOSO-FUENTES M.M , NAVARRO-PEREZ A, R.-M. J. . AND G.-G. Biomass Nutrient Profiles of the Microalga. **Journal of Food Biochemistry**, v. 25, n. 2001, p. 57–76, 2000.

RYCKEBOSCH, E. *et al.* Microalgae as an alternative source of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. **Lipid Technology**, v. 24, n. 6, p. 128–130, 2012.

SALES, R.; DERNER, R. B.; TSUZUKI, M. Y. Effects of different harvesting and processing methods on *Nannochloropsis oculata* concentrates and their application on rotifer *Brachionus* sp. cultures. **Journal of Applied Phycology**, v. 31, n. 6, p. 3607–3615, 2019.

SATHASIVAM, R. *et al.* Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 4, p. 709–722, 2019.

SPOLAORE, P. *et al.* Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, 2006.

STERN, R. F. *et al.* Environmental barcoding reveals massive dinoflagellate diversity in marine environments. **PLoS ONE**, v. 5, n. 11, 2010.

TANG, D. *et al.* CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3071–3076, 2011.

TU, Z. *et al.* Potential of using sodium bicarbonate as external carbon source to cultivate microalga in non-sterile condition. **Bioresource Technology**, v. 266, n. May, p. 109–115, 2018.

WHITE, D. A. *et al.* The effect of sodium bicarbonate supplementation on growth and biochemical composition of marine microalgae cultures. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 1, p. 153–165, 2013.

XUE, J. *et al.* Genetic improvement of the microalga *Phaeodactylum tricornerutum* for boosting neutral lipid accumulation. **Metabolic Engineering**, v. 27, p. 1–9, 2015.

ZHAN, J.; RONG, J.; WANG, Q. Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 12, p. 8505–8517, 2017.

ZHANG, S.; YANG, H.; SINGH, L. Effects of CO₂ concentrations on the freshwater microalgae, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 1225, n. September 2003, p. 41–42, 2014.

ZHENG, Y. *et al.* Optimization of carbon dioxide fixation and starch accumulation by *Tetraselmis subcordiformis* in a rectangular airlift photobioreactor. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 10, p. 1888–1901, 2011.

KLINTHONG, W. *et al.* A Review: Microalgae and their applications in CO₂ capture and renewable energy. **Aerosol and Air Quality Research**, v. 15, n. 2, p. 712–742, 2015.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO

BARCELLOS, Amanda Desireux *et al.* Microalgas e seu potencial de uso. **Cadernos de Prospecção**, v. 5, n. 4, p. 178, 2014.

BELAY, A. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**, n. 5 p. 235-240, 1993.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L.B. Revisão: Biotecnologia de Microalgas. **Boletim CEPPA**, v.26, n. 1, p. 9-20, 2008.

BISCHOFF, H. W.; BOLD, H. C. Phycological Studies IV. Some soil algae from enchanted rock and related algal species. **University of Texas**, 1963.

BOLD, H. C. The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama* sp. nov. **Bull. Torrey Bot. Club.**, n. 76, p. 101-108, 1949.

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

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M. de; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v.36, n. 6, p. 1959-1967, 2006.

DE GODOS, I. *et al.* Evaluation of carbon dioxide mass transfer in raceway reactors for microalgae culture using flue gases. **Bioresource technology**, v. 153, p. 307-314, 2014.

FALKOWSKI, PG & JA RAVEN. Aquatic Photosynthesis. Oxford. **Blackwell Scientific Publishers**. p. 374, 1997.

FRANCO, André Luiz Custódio *et al.* Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 437-448, 2013.

GOLDMAN, J. C.; PORCELLA, D. B.; MIDDLEBROOKS, E. J.; TOERIEN, D.F. The effect of carbon on algal growth—its relationship to eutrophication. **Water Research, Elsevier BV**, v. 6, n.6, p. 637–679, jun 1972.

HUET, M.T. - Tratado de Piscicultura, 2a ed. Madrid: Mundiprensa, 1978.

KADAM, K. L. Power plant flue gas as a source of CO₂ for microalgae cultivation: Economic impact of different process options. **Energy Conversion and Management, Elsevier BV**, v. 38, p. S505–S510, jan 1997.

LAVENS, P. e SORGELOOS, P., **Manual on the production and use of live food for aquaculture**, p. 1 – 10, 1996.

LOURENÇO, S.O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. Editora Rima, São Carlos – Brazil, 2006.

- MIRÓN, A. S. *et al.* Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricornutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 16, n. 3, p. 287-297, 2003.
- NELSON, D. L. Princípios de Bioquímica de Lehninger (Em Portuguese do Brasil). [S.l.]: Artmed, 2014. ISBN 8582710720.
- O'CONNOR, Wayne A.; HEASMAN, Michael P. Diet and feeding regimens for larval doughboy scallops, *Mimachlamys asperrima*. **Aquaculture**, v. 158, n. 3-4, p. 289-303, 1997.
- PEREZ-GARCIA, O., ESCALANTE, F.M.E., DE-BASHAN, L.E., BASHAN, Y.. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. **Water Res.** n. 45, p. 11– 36, 2011.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p. 906, 2001.
- RUSSO, David Alexandre Martins Tavares. **Estudo do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* numa água residual tratada, sob diferentes condições de fotoperíodo e temperatura**. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa, 2011.
- TIMMONS, M. B.; EBELING, J. M. Recirculating aquaculture 3rd edn: Cayuga Aqua Ventures. **Northeastern Regional Aquaculture Center publication**, p. 401-2013, 2013.
- TREVAN, Michael D. *et al.* **Biotecnologia: os princípios biológicos**. Open University Press, v. 47, n. 2, p. 181–182, 1987.
- VASUDEVAN, P.T.; FU, B. Environmentally Sustainable Biofuels: Advances in Biodiesel Research. **Waste Biomass Valor**, v.1, p. 47-63, 2010.
- VONSHAK, A., 1997. *Spirulina platensis* (Arthrospira), Physiology, **Cell-biology and Biotechnology**, London: Taylor & Francis, 17-66.
- WALNE, P. R. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. **Fishery Investigations**, v. 2, n. 25. p. 1-53, 1966.
- XUE, J. *et al.* Genetic improvement of the microalga *Phaeodactylum tricornutum* for boosting neutral lipid accumulation. **Metabolic Engineering**, v. 27, p. 1–9, 2015.