

PERDA QUÍMICA DE CARBONO E CINÉTICA DO CRESCIMENTO CELULAR EM CULTIVOS DE *Spirulina*

Michele da Rosa Andrade, Felipe Vieira Camerini e Jorge Alberto Vieira Costa*

Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, CP 474, 96201-900 Rio Grande – RS, Brasil

Recebido em 16/12/07; aceito em 12/6/08; publicado na web em 10/11/08

CHEMICAL CARBON LOSSES AND GROWTH KINETICS IN *Spirulina* CULTURES. Photosynthetic microorganism cultures, such as microalgae, represent one of the alternatives for fossil CO₂ emissions mitigation. Carbon supply is the major cost component in microalgal cultures. Aiming to enhance the dissolved inorganic carbon uptake efficiency in microalgal cultures, *Spirulina* sp LEB-18 was cultivated in mediums containing NaHCO₃ concentrations ranging from 2.8 to 100 g L⁻¹. Results indicated that lower dissolved inorganic carbon concentrations (2.8 g L⁻¹ NaHCO₃) produce higher growth parameters ($X_{\max} = 0.75 \text{ g L}^{-1}$; $P_{\max} = 0.145 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$; $\mu_{\max} = 0.254 \text{ d}^{-1}$) and lower carbon losses (13.61%). At 50 g L⁻¹ of NaHCO₃ cell growth was inhibited and carbon losses reached 38.73%.

Keywords: carbon; microalga; *Spirulina* sp LEB-18.

INTRODUÇÃO

Microalgas são microrganismos fotossintéticos que podem ser empregados para capturar dióxido de carbono, contribuindo com a redução do efeito estufa no planeta. A biomassa pode ser utilizada como suplemento alimentar ou para a produção de biocombustíveis, entre outras aplicações.

A biomassa microalgal apresenta cerca de 50% de carbono na sua composição, assim o fornecimento deste nutriente aos cultivos representa um importante componente dos custos de produção, seja gasoso na forma de dióxido de carbono, ou sólido, principalmente na forma de bicarbonato.¹

A fonte de carbono, uma vez dissolvida no meio de cultivo, participa do equilíbrio químico $\text{CO}_{2(\text{aq})} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-}$, onde a distribuição entre as espécies químicas é determinada pelo pH. A concentração de sais dissolvidos contribui para a pressão osmótica do meio, que pode ter influência na fisiologia celular da microalga, refletindo nas taxas de crescimento e na composição da biomassa. As cianobactérias geralmente crescem em ambientes alcalinos, onde HCO₃⁻ é a forma predominante no equilíbrio químico.²

Spirulina é a microalga mais estudada com reconhecida habilidade para fixar carbono inorgânico.³ Esta microalga destaca-se por possuir o certificado GRAS (*Generally Recognized As Safe*) do FDA (*Food and Drug Administration*), o que garante seu uso como alimento e fármaco. Sua biomassa apresenta alto conteúdo de proteínas (64-74%), ácidos graxos poliinsaturados, pigmentos e vitaminas.⁴ No entanto, trabalhos voltados ao estudo dos fenômenos associados às reações de equilíbrio do carbono inorgânico dissolvido no meio são ainda escassos.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento da biomassa e a perda de carbono em cultivos da microalga *Spirulina* sp LEB-18 em diferentes concentrações de carbono inorgânico dissolvido.

PARTE EXPERIMENTAL

Foi utilizada a microalga *Spirulina* sp LEB-18⁵ mantida em meio Zarrouk.⁶ A biomassa foi previamente lavada e centrifugada (15 min, 5000 rpm) para a remoção de sais do meio. A concentração inicial

foi 0,15 g L⁻¹, exceto nos ensaios de avaliação da perda de carbono, onde não houve a presença de células.

O meio de cultivo utilizado nos ensaios foi Zarrouk⁶ modificado, onde a fonte de carbono (NaHCO₃ 16,8 g L⁻¹) foi adicionada em diferentes concentrações, variando entre 2,8; 5; 10; 20; 50; 80 ou 100 g L⁻¹. O intervalo de concentrações foi definido entre o início do efeito tampão do sal no meio (2,8 g L⁻¹) até a saturação da solução (100 g L⁻¹). Assim, todos os ensaios iniciaram com o mesmo pH (8,2 ± 0,1), eliminando o efeito inicial desta variável no crescimento.

Os experimentos foram descontínuos, realizados em fotobiorreatores do tipo erlenmeyer de 2 L, com 1,8 L de meio. A temperatura foi mantida em 30 °C e o fotoperíodo em 12 h claro/escuro,⁷ com iluminância de 3200 Lux.³ A agitação foi realizada através da injeção de ar estéril a 0,3 vvm (volume de ar por volume de meio por min). O CO₂ do ar foi removido por absorção em NaOH 2 N.

Determinações analíticas

A concentração de biomassa de *Spirulina* sp LEB-18 foi determinada diariamente através da medida do peso seco de uma alíquota de amostra.⁸ O pH das culturas foi medido diariamente por pHmetro digital (Quimis Q.400H, Brasil). A alcalinidade total foi determinada diariamente por titulação do filtrado dos cultivos com HCl.⁹

Parâmetros de crescimento avaliados

Ao final de cada ensaio a máxima concentração de biomassa de *Spirulina* sp LEB-18 (X_{\max} , g L⁻¹) foi determinada. A produtividade (P , g L⁻¹ d⁻¹) foi calculada a partir da equação $P = (X_t - X_0) \cdot (t_x - t_0)^{-1}$, onde X_t é a concentração de biomassa (g L⁻¹) no tempo t_x (d) e X_0 é a concentração de biomassa inicial (g L⁻¹) no tempo t_0 (d),¹⁰ sendo a produtividade máxima (P_{\max} , g L⁻¹ d⁻¹) o maior valor de produtividade obtido. A velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max} , d⁻¹) foi calculada por regressão exponencial da fase logarítmica da curva de crescimento.¹¹ O conteúdo de carbono inorgânico total dissolvido e a distribuição das espécies químicas no equilíbrio $\text{CO}_{2(\text{aq})} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-}$ foram calculados a partir das frações de ionização,¹² com valores de pH e alcalinidade total determinados experimentalmente.

A perda de carbono para a atmosfera foi calculada a partir da equação $[(C_i - C_p) \cdot (C_i)^{-1}] \cdot 100$, onde C_i é a concentração inicial de

*e-mail: jorgealbertovc@terra.com.br

carbono inorgânico dissolvido no meio e C_f a concentração final.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 são apresentadas as curvas de crescimento de *Spirulina* sp LEB-18 cultivada em diferentes concentrações de NaHCO_3 . O crescimento da biomassa nos ensaios com 5, 10 ou 20 g L^{-1} de NaHCO_3 foi semelhante, bem como os parâmetros cinéticos máximos avaliados (Tabela 1), em média $X_{\text{máx}} = 0,6 \text{ g L}^{-1}$, $P_{\text{máx}} = 0,08 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e $\mu_{\text{máx}} = 0,13 \text{ d}^{-1}$. Os maiores parâmetros entre todas as concentrações de NaHCO_3 testadas ocorreram no ensaio contendo 2,8 g L^{-1} do sal. Neste ensaio a velocidade específica máxima de crescimento ($0,254 \text{ d}^{-1}$) foi superior à obtida em cultivos de *Spirulina* com meio Zarrouk padrão, encontrados na literatura ($0,093 \text{ d}^{-1}$; $0,111 \text{ d}^{-1}$; $0,2 \text{ d}^{-1}$ ¹⁵).

Concentrações de 80 e 100 g L^{-1} de NaHCO_3 provocaram inibição do crescimento da microalga (dados não apresentados), enquanto o ensaio com 50 g L^{-1} de NaHCO_3 apresentou concentração de biomassa aproximadamente constante durante o cultivo (Figura 1).

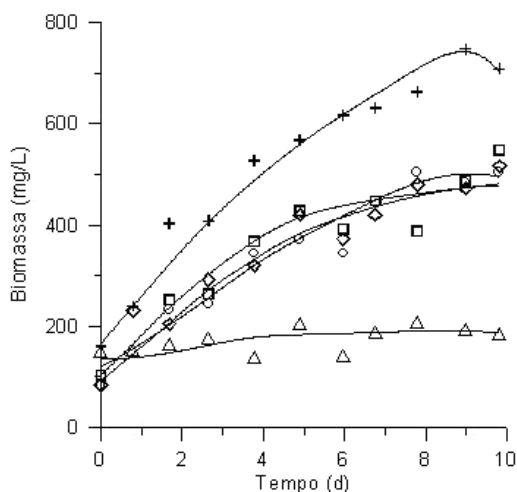


Figura 1. Variação da biomassa de *Spirulina* sp LEB-18 em diferentes concentrações de NaHCO_3 em g L^{-1} : (+)2,8; (\diamond)5; (\square)10; (\circ)20; (\triangle)50

Tabela 1. Parâmetros cinéticos da microalga *Spirulina* sp LEB-18 em diferentes concentrações de NaHCO_3 . Concentração máxima de biomassa ($X_{\text{máx}}$, g L^{-1}); Produtividade máxima ($P_{\text{máx}}$, $\text{g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$); Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, d^{-1})

NaHCO_3 (g L^{-1})	Parâmetros Cinéticos			
	$P_{\text{máx}}$	$X_{\text{máx}}$	$\mu_{\text{máx}}$	R^{2*}
2,8	0,145	0,75	0,25	0,9910
5,0	0,079	0,64	0,12	0,9987
10,0	0,088	0,55	0,16	0,9978
20,0	0,069	0,50	0,10	0,9997
50,0	0,011	0,21	0,09	0,9975

* Coeficiente de regressão exponencial da fase logarítmica de crescimento

Quando as células são expostas à alta concentração de NaHCO_3 a fotossíntese pode ser inibida, devido à rápida entrada de sódio na célula.³ A atividade fotossintética pode também ser inibida devido ao alto teor de carbonato (CO_3^{2-}) formado.^{16,17} No ensaio com 50 g L^{-1} de NaHCO_3 , a concentração de CO_3^{2-} alcançou 6,3 g L^{-1} e o pH 10,1 (Figura 2a). O lento crescimento celular neste ensaio com 50 g L^{-1} de NaHCO_3 pode ainda estar associado com o aumento da energia

requerida para expulsar o íon Na^+ da célula, provocando elevadas taxas de respiração noturna, que consome parte da biomassa formada no período claro.^{3,8}

Perda de carbono nos cultivos

Devido à natureza apolar da membrana plasmática, a resistência à difusão da molécula de CO_2 é menor que a do íon HCO_3^- , tornando o CO_2 a espécie química de carbono inorgânico preferencialmente consumida pelas microalgas.¹⁷ Quando este é consumido, o sistema em equilíbrio $\text{CO}_{2(\text{aq})} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-}$ reage no sentido de formação de CO_2 , consumindo H^+ do meio. Por outro lado, quando a concentração de HCO_3^- é alta, o consumo desta espécie química pode ocorrer pelo seu transporte ativo através da membrana plasmática¹⁸ ou por sua conversão a CO_2 pela enzima anidrase carbônica, segundo a reação $\text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_2 + \text{OH}^-$.^{3,19,20} Assim, seja CO_2 ou HCO_3^- a espécie química consumida pelas células, o crescimento celular resulta em aumento do pH do meio de cultivo.

Nos ensaios com 50, 80 e 100 g L^{-1} de NaHCO_3 o crescimento da biomassa foi inibido. No entanto, ocorreu aumento do pH (Figura 2a) e queda da concentração de íons HCO_3^- , indicando que, além do crescimento da biomassa, outros fatores provocam a alteração do pH

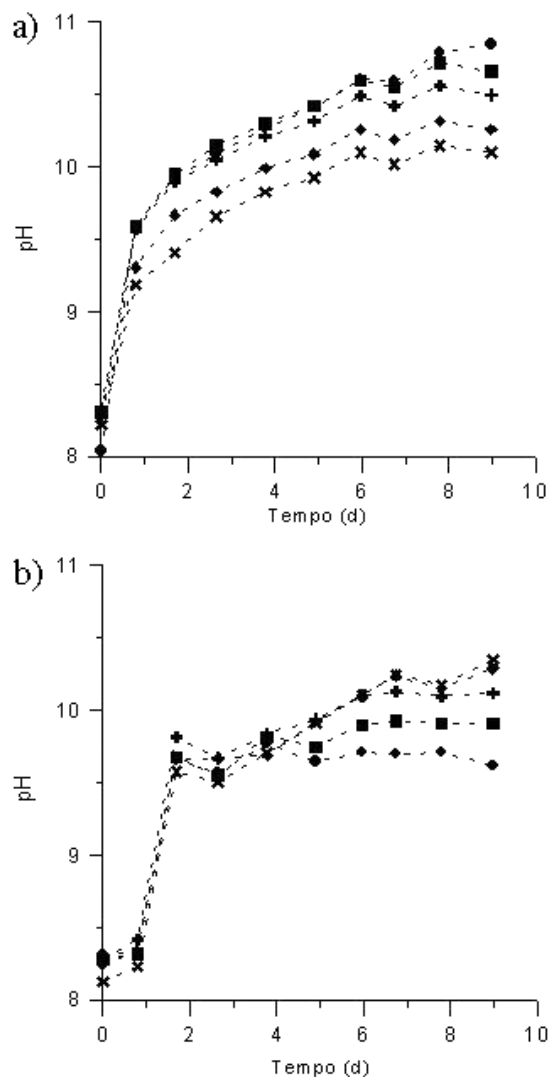


Figura 2. Variação do pH do meio Zarrouk ao longo do tempo em diferentes concentrações de NaHCO_3 (g L^{-1}): (\bullet)2,8; (\blacksquare)5; ($+$)10; (\blacklozenge)20; (\times)50. Meio com células (a) e sem células (b)

e da concentração de carbono inorgânico dissolvido no meio durante o cultivo de microalgas.

Soluções ricas em carbono inorgânico dissolvido, como o meio Zarrouk, contêm CO_2 livre em concentração superior ($0,05 \text{ g L}^{-1}$) à de equilíbrio com a atmosfera ($0,0004 \text{ g L}^{-1} \text{ CO}_2$ a 30°C).²¹ Enquanto houver esse gradiente, ocorre um fluxo de CO_2 do meio de cultivo para a atmosfera.

O deslocamento do equilíbrio $\text{CO}_{2(\text{aq})} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-}$ no sentido da reposição do CO_2 perdido, com conseqüente consumo de H^+ , provoca o aumento do pH do meio de cultivo até que a concentração de CO_2 dissolvido no meio líquido esteja em equilíbrio com a concentração de CO_2 na atmosfera.

O fluxo de massa entre o meio de cultivo e a atmosfera é proporcional ao gradiente de concentração entre as duas fases.²² Considerando que a concentração de CO_2 livre no meio aumenta em função do aumento da concentração total de carbono inorgânico dissolvido, a maior perda de CO_2 e a maior variação de pH são verificadas nos meios com as maiores concentrações de NaHCO_3 (Figura 2b).

A Figura 3 mostra a queda na concentração de CO_2 nos meios na ausência de *Spirulina* sp LEB-18. A partir do segundo dia de cultivo a concentração de CO_2 livre tornou-se aproximadamente igual e constante em todas as concentrações de NaHCO_3 testadas. Assim, a utilização de meios sintéticos com altas concentrações de carbono inorgânico no cultivo de microalgas deve ser evitada, uma vez que sua composição inicial é alterada em função das perdas de carbono para o meio externo, resultando em um meio com uma concentração de CO_2 dissolvido próxima à de equilíbrio com a atmosfera.

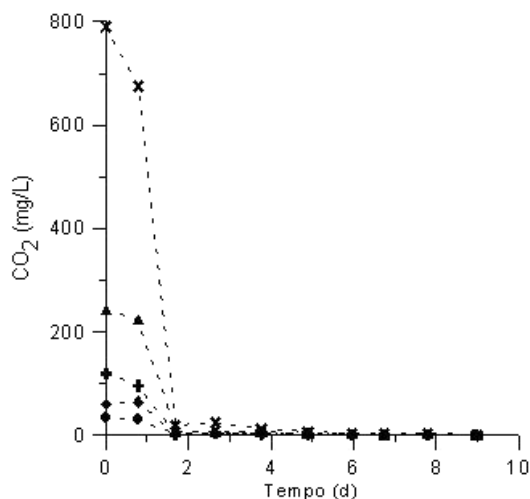


Figura 3. Concentração de CO_2 em ensaios na ausência de células de *Spirulina* sp LEB-18 contendo diferentes concentrações de NaHCO_3 (g L^{-1}): (●) 2,8; (◆) 5; (⊕) 10; (▲) 20; (×) 50

No ensaio contendo $2,8 \text{ g L}^{-1}$ de NaHCO_3 , onde foram verificados os melhores parâmetros de crescimento para a microalga entre todas as concentrações de NaHCO_3 testadas (Tabela 1), foi verificada a maior diferença entre as variações de pH provocadas pela perda de CO_2 para a atmosfera e as variações provocadas pelas perdas somadas ao consumo biológico (Figura 4a). A Figura 4b mostra a variação da concentração de NaHCO_3 neste ensaio, evidenciando a diferença entre o consumo biológico de carbono e as perdas para a atmosfera. As perdas de carbono em função da concentração de NaHCO_3 no meio são apresentadas na Figura 5, demonstrando que o aumento na concentração de carbono inorgânico dissolvido utilizado no preparo do meio Zarrouk provoca maiores perdas de carbono para a atmosfera.

Além das perdas de carbono dos cultivos para a atmosfera

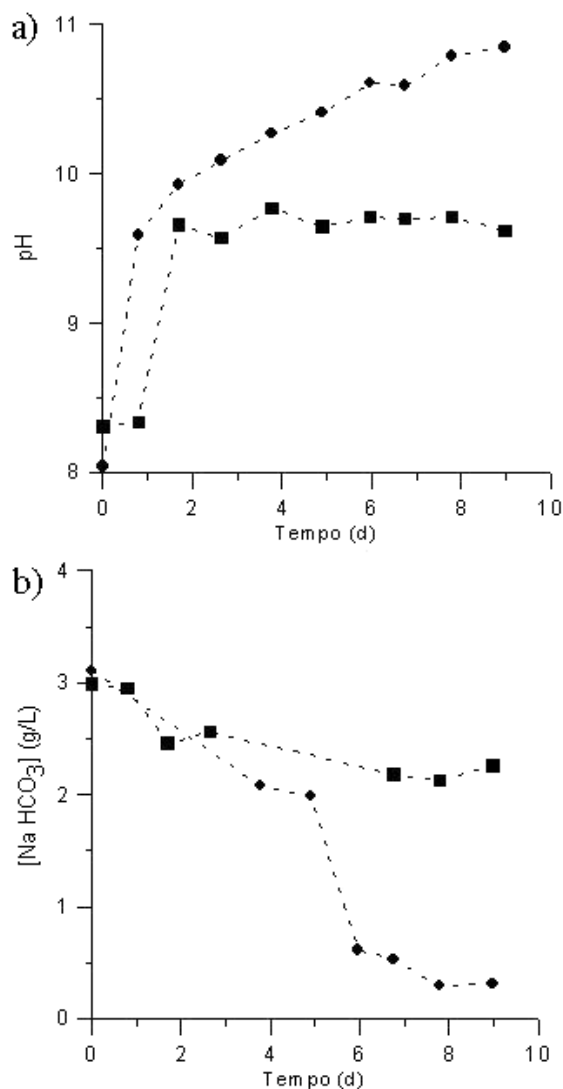


Figura 4. Variação do pH (a) e da concentração de NaHCO_3 em g L^{-1} (b) no ensaio contendo $2,8 \text{ g L}^{-1}$ de NaHCO_3 . Meio com células (●) e sem células (■)

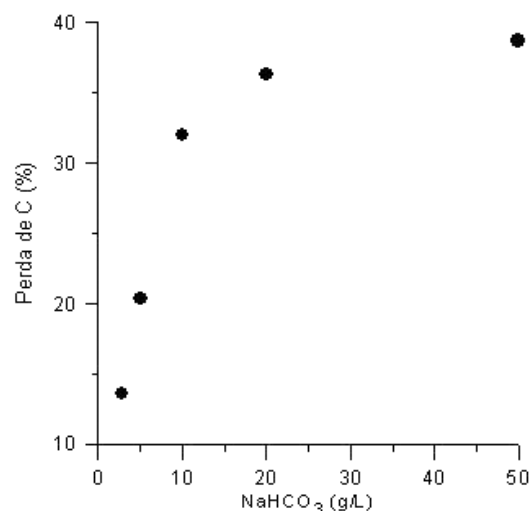


Figura 5. Perdas de carbono inorgânico dissolvido em função da concentração inicial de NaHCO_3 no meio de cultivo

representarem um custo adicional na produção de biomassa, o aumento de pH associado pode conduzir a valores de pH inibitórios ao crescimento celular. Poucos autores consideram as perdas químicas de carbono nos cultivos, de modo que em estudos sobre o pH e o consumo de carbono em cultivos de microalgas estas perdas podem ser confundidas com o consumo biológico de carbono pelas células, levando a resultados equivocados.^{21,23,24}

A elevação do pH do meio de cultivo reduz a concentração de CO₂ livre, segundo o equilíbrio, dificultando a perda química deste componente para a atmosfera, além de reduzir a suscetibilidade do cultivo de *Spirulina* à contaminação.²⁵ Assim, microalgas alcalifílicas como *Spirulina* apresentam características biológicas adequadas às condições físico-químicas do meio, que levam à maior eficiência do consumo de carbono.

CONCLUSÃO

A menor perda química de CO₂ para a atmosfera (13,61%) e os maiores parâmetros de crescimento ($X = 0,75 \text{ g L}^{-1}$, $P = 0,145 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $\mu = 0,254 \text{ d}^{-1}$) da microalga *Spirulina* sp LEB-18 ocorreram no ensaio com a menor concentração de carbono testada (NaHCO₃ 2,8 g L⁻¹). Com o aumento da concentração de bicarbonato os parâmetros de crescimento diminuíram e as perdas de carbono foram maiores. Em 50 g L⁻¹ de NaHCO₃ 38,73% do carbono do meio foi perdido para a atmosfera, além de ocorrer inibição do crescimento celular.

A manutenção dos cultivos em baixas concentrações de carbono inorgânico dissolvido pode resultar em maior eficiência no consumo do nutriente pela microalga *Spirulina* sp LEB-18, contribuindo para a redução de custos em plantas de produção da biomassa microalgal.

REFERÊNCIAS

1. Vonshak, A. Em *Spirulina platensis (Arthrospira) Physiology, cell-biology and biotechnology*; Vonshak, A., ed.; Taylor & Francis: London, 1997.
2. Richmond, A. Em *Handbook of Algal Mass Culture*; Richmond, A., ed.; CRC Press: USA, 1986.
3. Morais, M. G.; Costa, J. A. V.; *J. Biotechnol.* **2007**, *129*, 439.
4. Cohen, Z. Em ref. 1.
5. Morais, M. G.; Costa, J. A. V.; *Biotechnol. Lett.* **2007**, *29*, 1349.
6. Zarrouk, C.; *Tese de Doutorado*, University of Paris, Paris, 1966.
7. Costa, J. A. V.; Colla, L. M.; Duarte Filho, P. D.; Kabke, K.; Weber, A.; *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *18*, 1.
8. Torzillo, G.; Sacchi, A.; Materasi, R.; *Bioresour. Technol.* **1991**, *38*, 95.
9. Clesceri, L. S.; Greenberg, A. E.; Eaton, A. D.; *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19th ed., Amer. Publ. Health Ass.: Washington, 1998.
10. Schmidell, W.; Lima, A. U.; Aquarone, E.; Borzani, W.; *Biotechnologia Industrial*, Edgard Blücher Ltda.: São Paulo, 2001, vol. 2.
11. Bailey, J. E.; Ollis, D. F.; *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2nd ed., McGraw-Hill: Singapore, 1986.
12. Carmouze, J. P.; *O Metabolismo dos Ecossistemas Aquáticos: Fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas*, Edgard Blücher Ltda.: São Paulo, 1994.
13. Andrade, M. R.; Costa, J. A. V.; *Aquaculture* **2007**, *264*, 130.
14. Reichert, C. C.; Reinehr, C. O.; Costa, J. A. V.; *Braz. J. Chem. Eng.* **2006**, *23*, 23.
15. Costa, J. A. V.; Linde, G. A.; Atala, D. I. P.; *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, *16*, 15.
16. Binaghi, L.; Borghi, A. D.; Lodi, A.; Converti, A.; Borghi, M. D.; *Process Biochem.* **2003**, *38*, 1341.
17. Miller, A. G.; Colman, B.; *Plant. Physiol.* **1980**, *65*, 397.
18. James, P. L.; Larkum, A. W. D.; *Aquat. Bot.* **1996**, *55*, 149.
19. Shiraiwa, Y.; Goyal, A.; Tolbert, N. E.; *Plant Cell Physiol.* **1993**, *34*, 649.
20. Badger, M. R.; Price, G. D.; *Physiol. Plant.* **1992**, *84*, 606.
21. Alava, D.; Mello, P. C.; Wagener, K.; *J. Braz. Chem. Soc.* **1997**, *8*, 447.
22. Fick, A.; *Philos. Mag.* **1855**, *10*, 30.
23. Maroto, J. M. R.; Jimenez, C.; Aguilera, J.; Niell, F. X.; *Aquac. Eng.* **2005**, *32*, 493.
24. Livansky, K.; Pilarski, P. S.; *Algol. Stud.* **1993**, *97*, 113.
25. Richmond, A.; Grobbelaar, J. U.; *Biomass* **1986**, *10*, 253.