UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRAULICA E SANEAMENTO

Sarah Regina Vargas

**Produção de hidrogênio por *Chlamydomonas* spp. e
Anabaena spp.**

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos
2016

Sarah Regina Vargas

**Produção de hidrogênio por *Chlamydomonas* spp. e
Anabaena spp.**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutora em Ciências: Engenharia Hidráulica e Saneamento.

Orientadora: Prof.^a Titular Maria do Carmo Calijuri

São Carlos
2016

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

V297p Vargas, Sarah Regina
Produção de hidrogênio por Chlamydomonas spp. e
Anabaena spp. / Sarah Regina Vargas; orientadora Maria
do Carmo Calijuri. São Carlos, 2016.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação e Área
de Concentração em Hidráulica e Saneamento -- Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
2016.

1. clorofíceas. 2. cianobactéria. 3. hidrogenase. 4.
nitrogenase. 5. biohidrogênio. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Licenciada **SARAH REGINA VARGAS.**

Título da tese: "Produção de hidrogênio por *Chlamydomonas* spp. e *Anabaena* spp. como fonte alternativa de combustível renovável".

Data da defesa: 17/03/2016

Comissão Julgadora:

Resultado:

Profa. Titular **Maria do Carmo Calijuri (Orientadora)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovada

Prof. Associado **Marcelo Zaiat**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovada

Profa. Dra. **Ana Teresa Lombardi**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovada

Prof. Dr. **André Cordeiro Alves dos Santos**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovada

Prof. Dr. **Ariovaldo José da Silva**
(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

Aprovada

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Hidráulica e Saneamento:

Profa. Associada **Maria Bernadete A. Varesche Silva**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Associado **Paulo César Lima Segantine**

Dedico este trabalho aos meus pais Nelson e Lindalva, por sempre me apoiarem e ajudarem durante esses anos; aos meus irmãos Livia e Pedro, pelo amor e carinho; e ao meu marido Ricardo pelo amor, paciência, dedicação e atenção em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus, pela oportunidade, saúde e força e persistência para a realização deste trabalho.

Aos meus pais e irmãos pelo amor, dedicação, compreensão e apoio por toda a minha vida, principalmente nas dificuldades, obrigada por sempre acreditarem em mim.

Ao meu marido Ricardo Benini, pelo companheirismo, amor, incentivo e atenção durante a realização desta pesquisa. Por estar sempre ao meu lado me ajudando e aconselhando nos momentos mais difíceis.

À professora Maria do Carmo Calijuri, pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, por confiar e acreditar no meu trabalho e contribuir com seus ensinamentos que ajudaram na minha formação profissional.

Ao professor Marcelo Zaiat por seus ensinamentos, dedicação, confiança e paciência, que muito contribuíram com o desenvolvimento da pesquisa e ao meu crescimento profissional.

À agência de fomento CNPq, pela concessão de bolsa e ao Departamento de Hidráulica e Saneamento pela estrutura e apoio.

Aos pesquisadores do BIOTACE (Laboratório de Biotoxicologia de Águas Continentais e Efluentes) e LPB (Laboratório de Processos Biológicos), pela ajuda e momentos de descontração.

Às técnicas do BIOTACE, Adriana e Luci, e do LPB, Maria Ângela, Carolina, Isabel e Heloísa, que com muita dedicação e paciência me auxiliaram e ensinaram.

Aos amigos Dr. André Cordeiro Alves Dos Santos, Dr. Simone Pereira Casali, Dra. Patrícia Bortoleto de Falco, Dr. Davi Gasparini Cunha e Ms. Laís Albuquerque Ghiraldi, pelos conselhos e sugestões que tanto me ajudaram no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao amigo e Dr. Paulo Vagner dos Santos que sempre esteve ao meu lado me ensinando e aconselhando. Ajudou-me com muita paciência, carinho e dedicação, muito obrigada.

Aos meus saudosos amigos de colégio e de graduação pelos momentos de descontrações, com carinho e atenção, nos momentos difíceis da minha pesquisa, e pela compreensão pelos momentos de minha ausência.

Aos funcionários da Pós-Graduação do Departamento de Hidráulica e Saneamento Maria Auxiliadora C. Altieri Pin, Rosemeire A. de Jesus, Flávia G. Canova, Fernanda M. Struzziatto e André Canale Garcia, obrigada pela atenção e eficiência.

E por fim, mas não com menor importância, aos examinadores de qualificação, Prof.^a Maria Bernadete Amancio Varesche Silva e Dr. Paulo Vagner dos Santos, e de defesa, professores doutores André Cordeiro Alves Dos Santos, Ariovaldo José da Silva, Ana Teresa Lombardi e Marcelo Zaiat, pelas pertinentes contribuições para a elaboração desta pesquisa e tese.

Enfim, à todos aqueles que contribuíram com o meu amadurecimento e formação profissional, para que eu pudesse me manter firme nesta jornada, encerrando-se mais uma fase de minha vida, o meu muito obrigada!

“Leve na sua memória para o resto de sua vida, as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade em vencer as provas e lhe darão confiança na presença divina, que nos auxilia em qualquer situação, em qualquer tempo, diante de qualquer obstáculo.”

Chico Xavier

RESUMO

VARGAS, S.R. **Produção de hidrogênio por *Chlamydomonas* spp. e *Anabaena* spp.** 2016. 262 f. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

O uso intensificado de combustíveis fósseis como fonte de energia, vê-se a necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias, principalmente as renováveis, como o hidrogênio, que possui vantagens por ser elemento abundante no universo, ser renovável e não poluente. A utilização de microalgas e cianobactérias é uma alternativa para a produção de biohidrogênio a partir da quebra da água e de compostos orgânicos. De acordo com isso, nesta pesquisa foram testados diversos fatores físico-químicos e nutricionais nas condições de cultivo de cepas de *Chlamydomonas* spp. e *Anabaena* spp. Para tanto, cepas selecionadas foram cultivadas em duas fases experimentais, a primeira aeróbia e a segunda anaeróbia, para proporcionar produção de hidrogênio por biofotólise direta anaeróbia, via hidrogenase, sob privação de enxofre para a clorócea, e de nitrogênio para a cianobactéria, estimulando para esta também a produção por biofotólise indireta, via nitrogenase. A cepa com melhor produtividade de hidrogênio, de cada gênero, foi selecionada para a etapa de otimização das fases experimentais de cultivo. Durante os ensaios foram realizadas análises de produção máxima, velocidade de produção, volume e produtividade de hidrogênio, além de análises de concentração de biomassa, físico-químicas, bioquímicas e geração de subprodutos. O método utilizado foi eficiente para produção de hidrogênio e ficou comprovada a diferença de produção de hidrogênio entre diferentes cepas. *Anabaena* sp. obteve produtividade média de hidrogênio quatro vezes maior, aproximadamente de $76,8 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, comparada a *C. reinhardtii*, com média de $18,6 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Palavras chave: clorócea, cianobactéria; hidrogenase; nitrogenase; biohidrogênio.

ABSTRACT

VARGAS, S.R. **Hydrogen production by *Chlamydomonas* spp. and *Anabaena* spp.** 2016. 262 f. Thesis (PhD) – Engineering School of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2016.

The intensifying use of fossil fuels as energy source, one sees the need to develop new technologies, especially renewable, such as hydrogen. This has advantages because hydrogen is an abundant element in the universe, be renewable and non-polluting. The use of microalgae and cyanobacteria is an alternative for the production of bio-hydrogen of breaking water and organic compounds. Accordingly, in this study were tested several physic-chemical factors and nutrition in growing conditions of *Chlamydomonas* spp. and *Anabaena* spp. strains. For this purpose, strains selected were cultured in two experimental phases, first aerobic and second anaerobic, to hydrogen production by direct biofotolise anaerobic, via hydrogenase, under sulfur deprived to chlorofycea, and nitrogen to cyanobacterium, for this also to production by indirect biofotolise, via nitrogenase. The strain with highest productivity of hydrogen, of each gender, was selected for the optimization of the experimental stages of cultivation. During the tests were analyzes of maximum production, velocity, volume and productivity of hydrogen, and analysis of biomass concentration, physic-chemical, biochemical and generation of by-products. The method used was efficient for the production of hydrogen and was different between strains. *Anabaena* sp. obtained average yield four times highest, approximately $76.8 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ compared to *C. reinhardtii*, averaging $18.6 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Keywords: green algae, cyanobacteria; hydrogenase; nitrogenase; biohydrogen.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representando as vias de produção de hidrogênio e enzimas envolvidas	43
Figura 2 - Transporte de elétrons nos fotossistemas I (PSI) e II (PSII) durante a fotossíntese, fase clara, em eucariontes.	45
Figura 3 - Representação das enzimas e produção de hidrogênio na célula vegetativa e heterocisto em cianobactérias.....	49
Figura 4 - Fluxograma experimental com as três etapas desenvolvidas no trabalho.	54
Figura 5 - Representação do frasco vedado com papel alumínio com meio de cultivo líquido enriquecido com amostra ambiental e a inserção de pipeta Pasteur de vidro com iluminação.....	56
Figura 6 - Esquema representativo do preparo dos cultivos e montagem dos fotobiorreatores para os ensaios de produção de hidrogênio.....	65
Figura 7 - Esquema representativo das fases experimentais de acordo com o crescimento da cultura em relação ao tempo, demonstrando o momento de transferência de biomassa.....	65
Figura 8 - A: Curva de crescimento. B: Regressão linear de sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}) e absorbância (A.U. λ 750 nm), da cepa CC124	82
Figura 9 - A: Curva de crescimento. B: Regressão linear de sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}) e absorbância (A.U. λ 750 nm), da cepa CC425	82
Figura 10 - A: Curva de crescimento. B: Regressão linear de sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}) e absorbância (A.U. λ 750 nm), da cepa D66	83
Figura 11 - A: Curva de crescimento. B: Regressão linear de sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}) e absorbância (A.U. λ 750 nm), da cepa SAG 24.91	84
Figura 12 - A: Curva de crescimento. B: Regressão linear de sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}) e absorbância (A.U. λ 750 nm), da cepa N Ch 03	84
Figura 13 - A: Curva de crescimento. B: Regressão linear de sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}) e absorbância (A.U. λ 750 nm), da cepa 1444	86

Figura 14 - A: Curva de crescimento. B: Regressão linear de sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}) e absorvância (A.U. λ 750 nm), da cepa 1448	86
Figura 15 - A: Curva de crescimento. B: Regressão linear de sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}) e absorvância (A.U. λ 750 nm), da cepa 2576	87
Figura 16 - Curvas de crescimento (A.U. λ 750 nm) das cepas selecionadas. <i>Chlamydomonas</i> spp.: CC124, CC425, D66, SAG 24.91 e N Ch03. <i>Anabaena</i> spp.: 1444, 1448 e 2576.	88
Figura 17 - Curvas de crescimento (A.U. λ 750 nm) da cepa 1444 de <i>Anabaena</i> sp. nos diferentes meios de cultura	91
Figura 18 - Curvas de crescimento (A.U. λ 750 nm) da cepa 1448 de <i>Anabaena</i> sp. nos diferentes meios de cultura	91
Figura 19 - Curvas de crescimento (A.U. λ 750 nm) da cepa 2576 de <i>Anabaena</i> sp. nos diferentes meios de cultura.	94
Figura 20 - Curvas de crescimento (A.U. λ 750 nm), barras indicam desvio padrão (n=3), da cepa CC124 em diferentes pH e radiação de $15 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	97
Figura 21 - Curvas de crescimento (A.U. λ 750 nm), barras indicam desvio padrão (n=3), da cepa CC124 em diferentes pH e radiação de $60 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	98
Figura 22 - Curvas de crescimento (A.U. λ 750 nm), barras indicam desvio padrão (n=3), da cepa CC124 em diferentes pH e radiação de $100 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	98
Figura 23 - Curvas de crescimento (A.U. λ 750 nm), barras indicam desvio padrão (n=3), da cepa CC124 em diferentes pH e radiação de $150 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	99
Figura 24 - Curvas de crescimento (A.U. λ 750 nm), barras indicam desvio padrão (n=3), da cepa CC124 em diferentes pH e radiação de $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	99
Figura 25 - Interação das variáveis pH e radiação ($\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), com barras indicando desvio padrão (n=3), da cepa CC124	101
Figura 26 - Curvas de crescimento (A.U. λ 750 nm), barras indicam desvio padrão (n=3), da cepa 1448 em diferentes pH e radiação de $15 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	102

Figura 27 - Curvas de crescimento (A.U. λ 750 nm), barras indicam desvio padrão (n=3), da cepa 1448 em diferentes pH e radiação de 60 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	103
Figura 28 - Curvas de crescimento (A.U. λ 750 nm), barras indicam desvio padrão (n=3), da cepa 1448 em diferentes pH e radiação de 100 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	104
Figura 29 - Curvas de crescimento (A.U. λ 750 nm), barras indicam desvio padrão (n=3), da cepa 1448 em diferentes pH e radiação de 150 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	104
Figura 30 - Curvas de crescimento (A.U. λ 750 nm), barras indicam desvio padrão (n=3), da cepa 1448 em diferentes pH e radiação de 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	105
Figura 31 - Interação das variáveis pH e radiação ($\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), com barras indicando desvio padrão (n=3), da cepa 1448	107
Figura 32 - Produção de hidrogênio (mmol.L^{-1}) por cepas de <i>Chlamydomonas</i> spp. em condição aeróbia.....	109
Figura 33 - Produção de hidrogênio (mmol.L^{-1}) por cepas de <i>Chlamydomonas</i> spp. em condição aeróbia em triplicata	110
Figura 34 - Produção de hidrogênio (mmol.L^{-1}) por cepas de <i>Chlamydomonas</i> spp. em condição anaeróbia.....	111
Figura 35 - Ensaio teste da via de biofotólise direta e indireta anaeróbia com <i>Anabaena</i> spp.	114
Figura 36 - Produção de hidrogênio (mmol.L^{-1}) por cepas de <i>Anabaena</i> spp.	115
Figura 37 - Concentração de hidrogênio (mmol.L^{-1}) produzido pela cepa N Ch03, nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Barras indicam desvio padrão (n=3).	118
Figura 38 - Concentração de hidrogênio (mmol.L^{-1}) produzido pela cepa CC124, nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Barras indicam desvio padrão (n=3).	119
Figura 39 - Concentração de hidrogênio (mmol.L^{-1}) produzido pela cepa CC425, nas radiação de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Barras indicam desvio padrão (n=3).	120
Figura 40 - Concentração de hidrogênio (mmol.L^{-1}) produzido pela cepa D66, nas radiação de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Barras indicam desvio padrão (n=3).....	120

Figura 41 - Concentração de hidrogênio (mmol.L^{-1}) produzido pela cepa SAG 24.91, nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Barras indicam desvio padrão ($n=3$).	121
Figura 42 - Concentração de hidrogênio (mmol.L^{-1}) nas radiações de 60 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (A) e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (B) produzidos pelas cepas de <i>Chlamydomonas</i> spp. Barras indicam desvio padrão ($n=3$)	123
Figura 43 - Produção máxima de hidrogênio (mmol.L^{-1}) indicado por marcadores e produtividade ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) indicados por barras, nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, das cepas de <i>Chlamydomonas</i> spp. Barras indicam desvio padrão ($n=3$).	124
Figura 44 - Produção máxima de hidrogênio (mmol.L^{-1}) indicado por marcadores e sólidos no início e fim da segunda fase experimental (mg.L^{-1}) indicados por barras, nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, das cepas de <i>Chlamydomonas</i> spp. Barras indicam desvio padrão ($n=3$).	129
Figura 45 - Porcentagem (mg.L^{-1}) de carboidrato (A) e proteína (B) no início (inicial) e fim da segunda fase experimental nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, das cepas de <i>Chlamydomonas</i> spp. Barras indicam desvio padrão ($n=3$)	131
Figura 46 - Remoção de nutrientes (%), nitrogênio, fósforo e DQO. Barras indicam remoção total durante o ensaio experimental e marcadores indicam a remoção durante a segunda fase experimental, nas radiações de 60 (A) e 200 (B) $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, das cepas de <i>Chlamydomonas</i> spp. Barras indicam desvio padrão ($n=3$)	138
Figura 47 - Concentração (mg.L^{-1}) de ácidos orgânicos e álcool pela cepa N Ch03	140
Figura 48 - Concentração (mg.L^{-1}) de ácidos orgânicos e álcool pela cepa CC124	141
Figura 49 - Concentração (mg.L^{-1}) de ácidos orgânicos e álcool pela cepa CC425	142
Figura 50 - Concentração (mg.L^{-1}) de ácidos orgânicos e álcool pela cepa D66	143
Figura 51 - Concentração (mg.L^{-1}) de ácidos orgânicos e álcool pela cepa SAG 24.91	144
Figura 52 - Concentração de hidrogênio (mmol.L^{-1}) produzido pela cepa 1444, nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Barras indicam desvio padrão ($n=3$)	146

Figura 53 - Concentração de hidrogênio (mmol.L^{-1}) produzido pela cepa 1448 nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Barras indicam desvio padrão ($n=3$)	147
Figura 54 - Concentração de hidrogênio (mmol.L^{-1}) nas radiações de 60 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (A) e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (B) produzidos pelas cepas de <i>Anabaena</i> spp. Barras indicam desvio padrão ($n=3$)	149
Figura 55 - Produção máxima de hidrogênio (mmol.L^{-1}) indicado por marcadores e produtividade ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) indicados por barras, nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, das cepas de <i>Anabaena</i> spp. Barras indicam desvio padrão ($n=3$).....	150
Figura 56 - Produção máxima de hidrogênio (mmol.L^{-1}) indicado por marcadores e sólidos no início e fim da segunda fase experimental (mg.L^{-1}) indicados por barras, nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, das cepas de <i>Anabaena</i> spp. Barras indicam desvio padrão ($n=3$).	153
Figura 57 - Porcentagem (mg.L^{-1}) de carboidrato (A) e proteína (B) no início (inicial) e fim da segunda fase experimental nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, das cepas de <i>Anabaena</i> spp. Barras indicam desvio padrão ($n=3$)	154
Figura 58 - Cultura de 1448 com heterocistos, representando o fim da primeira fase experimental, transferida para o fotobiorreator para iniciar a segunda fase experimental (aumento de 400x).....	156
Figura 59 - Remoção de nutrientes (%), nitrogênio, fósforo e DQO. Barras indicam remoção total durante o ensaio experimental e marcadores indicam a remoção durante a segunda fase experimental, nas radiações de 60 (A) e 200 (B) $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, das cepas de <i>Anabaena</i> spp. Barras indicam desvio padrão ($n=3$).....	160
Figura 60 - Concentração (mg.L^{-1}) de ácidos orgânicos e álcool pela cepa 1444	162
Figura 61 - Concentração (mg.L^{-1}) de ácidos orgânicos e álcool pela cepa 1448	163
Figura 62 - Curvas de crescimento em absorbância (A. U. λ 750 nm) do planejamento fatorial da otimização da primeira fase experimental de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	165
Figura 63 - Rendimento da biomassa em sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}) do planejamento fatorial da otimização da primeira fase experimental de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	166

Figura 64 – Diagrama de Pareto com a interação dos fatores e análise de Bonferroni de <i>C. reinhardtii</i>	169
Figura 65 - Curvas de crescimento em absorbância (A.U. λ 750 nm) (A); e rendimento em sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}), em barras, e μ_{max} (d^{-1}), em marcadores (B), comparando a primeira fase experimental da segunda etapa com a otimização desta fase da terceira etapa de <i>C. reinhardtii</i>	170
Figura 66 - Concentração de hidrogênio (mmol.L^{-1}) produzido por <i>C. reinhardtii</i> nas 8 condições testadas para a otimização (Tabela 34). Barras indicam desvio padrão (n=3)	172
Figura 67 - Produção máxima de hidrogênio (mmol.L^{-1}) indicado por marcadores e produtividade ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) indicados por barras, nas 8 condições testadas (Tabela 34) para otimização da produção de hidrogênio por <i>C. reinhardtii</i> . Barras indicam desvio padrão (n=3)	174
Figura 68 - Produção máxima de hidrogênio (mmol.L^{-1}) indicado por marcadores e sólidos no início e fim da segunda fase experimental (mg.L^{-1}) indicados por barras, nas 8 condições. Barras indicam desvio padrão (n=3).	177
Figura 69 - Porcentagem (mg.L^{-1}) de carboidrato (A) e proteína (B) no início (inicial) e fim da segunda fase experimental nas 8 condições de otimização de <i>C. reinhardtii</i> . Barras indicam desvio padrão (n=3).	179
Figura 70 - Remoção de nutrientes (%) de <i>C. reinhardtii</i> . Barras indicam remoção total durante o ensaio experimental e marcadores indicam a remoção durante a segunda fase experimental, nas 8 condições. Barras indicam desvio padrão (n=3).	183
Figura 71 - Concentração (mg.L^{-1}) de etanol (A) e ácido acético (B). D.0 – início do ensaio. Fim 1ª e 2ª f. – fim da primeira e segunda fases experimentais, nas 8 condições da otimização de <i>C. reinhardtii</i> . Barras indicam desvio padrão (n=3)	185
Figura 72 - Curvas de crescimento em absorbância (A. U. λ 750 nm) do planejamento fatorial da otimização da primeira fase experimental de <i>Anabaena</i> sp.	187
Figura 73 - Rendimento da biomassa em sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}) do planejamento fatorial da otimização da primeira fase experimental de <i>Anabaena</i> sp.	188
Figura 74 - Diagrama de Pareto com a interação dos fatores e análise de Bonferroni de <i>Anabaena</i> sp.	190

- Figura 75 - Curvas de crescimento em absorbância (A. U. λ 750 nm) (A), linhas contínuas indicam BG-11 padrão e linhas pontilhadas BG-11 com limitação de nitrogênio (10 mg.L^{-1}); e rendimento em sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}), em barras, e μ_{max} (d^{-1}), em marcadores (B), comparando a primeira fase experimental da segunda etapa com a otimização desta fase da terceira etapa de *Anabaena* sp. 192
- Figura 76 - Concentração de hidrogênio (mmol.L^{-1}) produzido por *Anabaena* sp. nas 8 condições testadas para a otimização (Tabela 41). Barras indicam desvio padrão ($n=3$). 194
- Figura 77 - Produção máxima de hidrogênio (mmol.L^{-1}) indicado por marcadores e produtividade ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) indicados por barras, nas 8 condições testadas (Tabela 42) para otimização da produção de hidrogênio por *Anabaena* sp. Barras indicam desvio padrão ($n=3$)... 195
- Figura 78 - Produção máxima de hidrogênio (mmol.L^{-1}) com *Anabaena* sp. indicado por marcadores e sólidos no início e fim da segunda fase experimental (mg.L^{-1}), indicados por barras, nas 8 condições. Barras indicam desvio padrão ($n=3$). 198
- Figura 79 – Fotobiorreatores de *Anabaena* sp. (1448) na segunda fase experimental (produção de hidrogênio), com cultura amarelada..... 199
- Figura 80 - Porcentagem (mg.L^{-1}) de carboidrato (A) e proteína (B) no início (inicial) e fim da segunda fase experimental nas 8 condições de otimização de *Anabaena* sp. Barras indicam desvio padrão ($n=3$).... 200
- Figura 81 - Remoção de nutrientes (%), nitrogênio, fósforo e DQO. Barras indicam remoção total durante o ensaio experimental e marcadores indicam a remoção durante a segunda fase experimental, nas 8 condições da otimização de *Anabaena* sp. Barras indicam desvio padrão ($n=3$)..... 205
- Figura 82 - Concentração (mg.L^{-1}) de etanol (A), ácido acético (B) e ácido isovalérico (C). D.0 – início do ensaio. Fim 1ª e 2ª f. – fim da primeira e segunda fases experimentais, nas 8 condições da otimização de *Anabaena* sp. Barras indicam desvio padrão ($n=3$)..... 207
- Figura 83 - Comparação dos parâmetros de hidrogênio, produção máxima (mmol. L^{-1}) (A), volume (mL^{-1} por litro de cultura) (B), μ_{max} (h^{-1}) (C) e produtividade ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) (D), entre a segunda etapa nas duas radiações (60 e $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e as oito condições da otimização de *C. reinhardtii* na terceira etapa. Barras indicam desvio padrão ($n=3$)..... 210
- Figura 84 - Comparação dos parâmetros de hidrogênio, produção máxima (mmol. L^{-1}) (A), volume (mL^{-1} por litro de cultura) (B), μ_{max} (h^{-1}) (C) e

produtividade ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) (D), entre a segunda etapa nas duas radiações (60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e as oito condições da otimização de *Anabaena* sp. na terceira etapa. Barras indicam desvio padrão (n=3)212

Figura 85 - Comparação das curvas de produção de hidrogênio (mmol.L^{-1}) (A) entre *C. reinhardtii* nas condições 2 e 6 (C. 2 e C. 6) e *Anabaena* sp. nas condições 3, 4 e 7 (A. 3, A. 4 e A. 7) com a otimização. Barras indicam desvio padrão (n=3)214

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do meio de cultura TAP (GORMAN; LEVINE, 1965)	56
Tabela 2 - Composição do meio de cultura BG-11 (RIPPKA, 1979)	58
Tabela 3 - Composição do meio de cultura ASM-1 (GORHAM et al., 1964)	62
Tabela 4 - Condições físico-químicas nas fases experimentais dos ensaios de produção de hidrogênio de <i>Chlamydomonas</i> spp. na segunda etapa	67
Tabela 5 – Condições físico-químicas nas fases experimentais dos ensaios de produção de hidrogênio de <i>Anabaena</i> spp. na segunda etapa	68
Tabela 6 - Fatores e níveis investigados visando à otimização da biomassa das cepas de <i>Chlamydomonas</i> sp. e <i>Anabaena</i> sp.	70
Tabela 7 - Fatores e níveis investigados visando à otimização da produção de hidrogênio por <i>Chlamydomonas</i> sp.	72
Tabela 8 - Fatores e níveis investigados visando à otimização da produção de hidrogênio por <i>Anabaena</i> sp.	72
Tabela 9 - Variáveis físico-químicas e suas respectivas metodologias e referências	73
Tabela 10 - Variáveis físico-químicas e respectivas etapas e períodos em que foram realizadas	74
Tabela 11 - Cepas adquiridas e pré-selecionadas	80
Tabela 12 - Parâmetros cinéticos de crescimento das cepas de <i>Chlamydomonas</i> spp. e <i>Anabaena</i> spp. selecionadas e caracterizadas	89
Tabela 13 - Média e desvio padrão dos rendimentos de crescimento (absorbância) das cepas de <i>Anabaena</i> spp. nos diferentes meios de cultura	92
Tabela 14 - Média e desvio padrão das velocidades específicas de crescimento ($\mu_{\max}$) (dia^{-1}) das cepas de <i>Anabaena</i> spp. nos diferentes meios de cultura	93
Tabela 15 - Média e desvio padrão dos tempos de geração (T_g) (dia) das cepas de <i>Anabaena</i> spp. nos diferentes meios de cultura	93
Tabela 16 - Média e desvio padrão dos rendimentos de crescimento (A.U. λ 750 nm) da cepa CC124	97

Tabela 17 - Média e desvio padrão da $\mu_{\max}$ (dia ⁻¹) da cepa CC124 em diferentes pH e radiações	100
Tabela 18 - Média e desvio padrão dos Tg (dia) da cepa CC124 em diferentes pH e radiações	100
Tabela 19 - Média e desvio padrão dos rendimentos de crescimento (A.U. λ 750 nm) da cepa 1448	103
Tabela 20 - Média e desvio padrão da $\mu_{\max}$ (dia ⁻¹) da cepa 1448 em diferentes pH e radiações	105
Tabela 21 - Média e desvio padrão do Tg (dia) da cepa 1448 em diferentes pH e radiações	106
Tabela 22 - Resumo das vias de produção de hidrogênio escolhidas para as etapas posteriores e comparação das melhores cepas de cada gênero quanto à produção máxima de hidrogênio e produtividade.....	116
Tabela 23 - Parâmetros de produção de hidrogênio de todas as cepas de <i>Chlamydomonas</i> spp. nas radiações 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	122
Tabela 24 - Densidade celular (ind.mL ⁻¹) ($\times 10^6$) no início da segunda fase experimental nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	126
Tabela 25 - Estimativa de biomassa por absorvância (750 nm), sólidos (mg.L ⁻¹) e clorofila a (mg.L ⁻¹)	127
Tabela 26 - Variáveis físico-químicas do início ao fim dos ensaios: pH, nitrogênio amoniacal (mg.L ⁻¹), ortofosfato (mg.L ⁻¹) e demanda química de oxigênio (g.L ⁻¹)	133
Tabela 27 - Remoção de nitrogênio (N), fósforo (P) e demanda química de oxigênio (DQO), em porcentagem por concentração, do ensaio total e da segunda fase experimental	135
Tabela 28 - Parâmetros de produção de hidrogênio de todas as cepas de <i>Anabaena</i> spp. nas radiações 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	147
Tabela 29 - Densidade celular (ind.mL ⁻¹) ($\times 10^5$) no início da segunda fase experimental nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$	151
Tabela 30 - Estimativa de biomassa por absorvância (750 nm), sólidos (mg.L ⁻¹) e clorofila a (mg.L ⁻¹)	152
Tabela 31 - Variáveis físico-químicas do início ao fim dos ensaios: pH, nitrato (mg.....	157
Tabela 32 - Remoção de nitrogênio (N), fósforo (P) e demanda química de oxigênio (DQO), em porcentagem por concentração, do ensaio total e da segunda fase experimental	158

Tabela 33 - Condições e $\mu_{\max}$ (d^{-1}) do planejamento fatorial com ponto central de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	167
Tabela 34 - Variáveis testadas na otimização da produção de hidrogênio	171
Tabela 35 - Parâmetros de produção de hidrogênio de <i>C. reinhardtii</i> nas 8 condições testadas para a otimização.....	173
Tabela 36 - Densidade celular ($ind.mL^{-1}$) ($\times 10^6$) no início da segunda fase experimental nas 8 condições de <i>C. reinhardtii</i>	175
Tabela 37 - Estimativa de biomassa por absorbância (750 nm), sólidos ($mg.L^{-1}$) e clorofila <i>a</i> ($mg.L^{-1}$) de <i>C. reinhardtii</i>	176
Tabela 38 - Variáveis físico-químicas do início ao fim dos ensaios de otimização de <i>C. reinhardtii</i> : pH, nitrogênio amoniacal ($mg.L^{-1}$), ortofosfato ($mg.L^{-1}$) e demanda química de oxigênio ($g.L^{-1}$)	181
Tabela 39 - Remoção de nitrogênio (N), fósforo (P) e demanda química de oxigênio (DQO), em porcentagem por concentração, do ensaio total e da segunda fase experimental da otimização de <i>C. reinhardtii</i>	182
Tabela 40 - Condições e $\mu_{\max}$ (d^{-1}) do planejamento fatorial com ponto central de <i>Anabaena</i> sp.	189
Tabela 41 - Variáveis testadas na otimização da produção de hidrogênio por <i>Anabaena</i> sp.	193
Tabela 42 - Parâmetros de produção de hidrogênio de <i>Anabaena</i> sp. nas 8 condições testadas para a otimização.....	195
Tabela 43 - Densidade celular de <i>Anabaena</i> sp. ($ind.mL^{-1}$) ($\times 10^5$) no início da segunda fase experimental nas 8 condições.....	196
Tabela 44 - Estimativa de biomassa de <i>Anabaena</i> sp. por absorbância (750 nm), sólidos ($mg.L^{-1}$) e clorofila <i>a</i> ($mg.L^{-1}$)	197
Tabela 45 - Variáveis físico-químicas do início ao fim dos ensaios de otimização de <i>Anabaena</i> sp.: pH, nitrato ($mg.L^{-1}$), ortofosfato ($mg.L^{-1}$) e demanda química de oxigênio ($g.L^{-1}$)	202
Tabela 46 - Remoção de nitrogênio (N), fósforo (P) e demanda química de oxigênio (DQO), em porcentagem por concentração, do ensaio total e da segunda fase experimental da otimização de <i>Anabaena</i> sp.	204
Tabela 47 - Condições das melhores produções de hidrogênio de <i>C. reinhardtii</i> e <i>Anabaena</i> sp. após a otimização	213
Tabela 48 - Comparação dos parâmetros de produção de hidrogênio entre as melhores condições de <i>C. reinhardtii</i> e <i>Anabaena</i> sp. após a otimização	215

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	33
2	OBJETIVOS	37
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	39
3.1	Biocombustíveis e fontes de produção de hidrogênio.....	39
3.2	Produção de hidrogênio por microrganismos fotossintetizantes e caracterização dos gêneros em estudo	41
3.3	Vias de produção de hidrogênio e enzimas envolvidas no processo	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
4.1	Delineamento da primeira etapa	55
4.1.1	<i>Obtenção das cepas.....</i>	55
4.1.2	<i>Manutenção das cepas.....</i>	57
4.1.3	<i>Purificação das cepas.....</i>	58
4.1.4	<i>Pré-seleção das cepas</i>	59
4.1.5	<i>Caracterização das cepas selecionadas: fases de crescimento e quantificação de biomassa.....</i>	60
4.1.6	<i>Melhoramento das condições de cultivo.....</i>	61
4.1.7	<i>Testes de produção de hidrogênio</i>	63
4.2	Ensaio de produção de hidrogênio: montagem dos reatores para as segunda e terceira etapas	64
4.2.1	<i>Segunda etapa</i>	66
4.2.1.1	<i>Condições físico-químicas para os ensaios com Chlamydomonas spp.</i>	67
4.2.1.2	<i>Condições físico-químicas para os ensaios com Anabaena spp.....</i>	68
4.2.2	<i>Terceira etapa</i>	69
4.2.2.1	<i>Otimização da primeira fase experimental</i>	69
4.2.2.2	<i>Otimização segunda fase experimental.....</i>	71
4.3	Análises físico-químicas e quantificação de gases	73
4.4	Determinação de biomassa, densidade celular, e análises bioquímicas	75
4.5	Análises dos resultados: rendimento de biomassa, cálculo dos parâmetros cinéticos, produtividade e volume de hidrogênio	76

5	RESULTADOS.....	79
5.1	Primeira etapa	79
5.1.1	<i>Cepas adquiridas e selecionadas para o estudo.....</i>	79
5.1.2	<i>Caracterização do crescimento das cepas e quantificação de biomassa.....</i>	81
5.1.2.1	<i>Chlamydomonas spp.</i>	81
5.1.2.2	<i>Anabaena spp.</i>	85
5.1.2.3	<i>Comparação da caracterização entre os dois gêneros</i>	88
5.1.3	<i>Testes de condição de cultivo</i>	89
5.1.3.1	<i>Meios de cultura.....</i>	89
5.1.3.2	<i>Testes de pH e intensidade luminosa</i>	95
5.1.3.2.1	<i>Chlamydomonas sp.</i>	96
5.1.3.2.2	<i>Anabaena sp.</i>	102
5.1.4	<i>Testes de produção de hidrogênio</i>	107
5.1.4.1	<i>Chlamydomonas spp.</i>	108
5.1.4.2	<i>Anabaena spp.</i>	112
5.1.4.3	<i>Comparação dos testes de vias e produções de hidrogênio entre os gêneros</i>	116
5.2	Segunda etapa	117
5.2.1	<i>Chlamydomonas spp.....</i>	117
5.2.1.1	<i>Produção de hidrogênio</i>	117
5.2.1.2	<i>Densidade celular e estimativa de biomassa</i>	125
5.2.1.3	<i>Análises bioquímicas</i>	129
5.2.1.4	<i>Análises físico-químicas.....</i>	132
5.2.1.5	<i>Análise de ácidos orgânicos e álcoois</i>	138
5.2.2	<i>Anabaena spp.</i>	145
5.2.2.1	<i>Produção de hidrogênio</i>	146
5.2.2.2	<i>Densidade celular e estimativa de biomassa</i>	150
5.2.2.3	<i>Análises bioquímicas</i>	153
5.2.2.4	<i>Análises físico-químicas.....</i>	155
5.2.2.5	<i>Análise de ácidos orgânicos e álcoois</i>	161
5.3	Terceira etapa	164
5.3.1	<i>Chlamydomonas reinhardtii.....</i>	164
5.3.1.1	<i>Otimização da primeira fase experimental.....</i>	164
5.3.1.1.1	<i>Comparação da otimização da biomassa com a primeira fase experimental da segunda etapa</i>	169
5.3.1.2	<i>Produção de hidrogênio</i>	171
5.3.1.3	<i>Densidade celular e estimativa de biomassa</i>	174
5.3.1.4	<i>Análises bioquímicas</i>	178
5.3.1.5	<i>Análises físico-químicas.....</i>	179
5.3.1.6	<i>Análise de ácidos orgânicos e álcoois</i>	183
5.3.2	<i>Anabaena sp.</i>	186
5.3.2.1	<i>Otimização da primeira fase experimental.....</i>	186
5.3.2.1.1	<i>Comparação da otimização da biomassa com a primeira fase experimental da segunda etapa</i>	190
5.3.2.2	<i>Otimização da produção de hidrogênio.....</i>	192

5.3.2.3	<i>Densidade celular e estimativa de biomassa</i>	196
5.3.2.4	<i>Análises bioquímicas</i>	199
5.3.2.5	<i>Análises físico-químicas</i>	201
5.3.2.6	<i>Análise de ácidos orgânicos e álcool</i>	206
5.4	Comparação da otimização com a produção de hidrogênio da segunda etapa	208
5.4.1	<i>C. reinhardtii</i>	209
5.4.2	<i>Anabaena</i> sp.	211
5.5	Comparação <i>C. reinhardtii</i> e <i>Anabaena</i> sp. após otimização da produção de hidrogênio	213
6	DISCUSSÃO	217
7	CONCLUSÃO	243
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	247
	ANEXOS	259

1 INTRODUÇÃO

Após a Revolução Industrial houve intensificação no uso de combustíveis fósseis como fonte de energia, além de serem esgotáveis, contribuindo para o aumento da poluição atmosférica e, conseqüentemente, para o efeito estufa e alterações no clima do planeta.

Para minimizar tais problemas, estão sendo desenvolvidas tecnologias de geração de combustíveis com fontes alternativas, menos poluentes e renováveis, como por exemplo, biodiesel e biogás, além de utilização de energia eólica e solar.

As vantagens do hidrogênio como carreador de combustível devem-se, principalmente, por ele ser o elemento mais abundante no universo, fonte renovável e não poluente, por liberar apenas água em sua combustão. Por isso é chamado de combustível limpo, o que contribui para a redução dos impactos ambientais provocados pelos combustíveis fósseis. Porém, há desvantagens que devem ser superadas para a sua utilização, como tecnologias para o seu armazenamento e produção economicamente viável.

O hidrogênio pode ser proveniente de combustíveis fósseis e biomassa agrícola, a partir da água por processos físico-químicos, por eletrólise, e através da produção por microrganismos, por biofotólise ou fermentação. A partir desta primeira, a produção não é muito eficiente por não solucionar os problemas ambientais atuais, além de serem fontes esgotáveis.

A utilização de bactérias, microalgas e cianobactérias é uma alternativa para a produção de hidrogênio. Atualmente são desenvolvidas várias pesquisas com microrganismos para contribuir com a otimização da produção de biohidrogênio como alternativa de combustível.

Para maximizar a produção de hidrogênio por microrganismos e torná-la viável economicamente, há várias pesquisas em desenvolvimento para testar diversas técnicas e metodologias no melhoramento do cultivo deles, com variações de fatores físico-químicos nos processos de biofotólise, e inclusive, manipulações de genética molecular.

A produção de hidrogênio pode ocorrer por meio de biofotólise direta, também chamado de processo fototrófico, sendo este aeróbio ou anaeróbio, ou a partir da biofotólise indireta, neste caso realizado apenas pelas cianobactérias por meio da fixação de nitrogênio. Os microrganismos também são capazes de produzir hidrogênio por meio da fermentação. Os melhores resultados encontrados são com os processos fototróficos anaeróbios, os quais foram trabalhados com maior ênfase nesta pesquisa.

A utilização de *Anabaena* spp. para o estudo da produção de hidrogênio deveu-se ao fato de haver poucos estudos com cianobactérias para este fim, embora este gênero tenha potencial de acordo com estudos já realizados, e possuir também a via de biofotólise indireta para a produção de hidrogênio. Além disso, é organismo preocupante para a saúde pública nos ecossistemas aquáticos, devido ao seu potencial tóxico.

Outra espécie estudada foi a clorócea *Chlamydomonas* spp., por ser muito pesquisada e descrita para várias finalidades, inclusive microalga modelo para a produção de hidrogênio, com descrição dos genes e metabolismo envolvidos, principalmente no processo de produção de hidrogênio via biofotólise direta anaeróbia, com privação de enxofre.

Dessa forma, foi possível realizar as principais comparações e diferenciações sobre a habilidade das cepas nas técnicas aplicadas para a maximização da produção e liberação de hidrogênio, principalmente em relação à *Anabaena* spp., que pode contribuir significativamente para a produção de hidrogênio e avanço do país na área. Portanto, a hipótese da pesquisa foi que a otimização iria aumentar a produção de hidrogênio de ambas as espécies e que seriam eficientes nos processos com a metodologia desenvolvida.

Dada a incerteza econômica e os riscos ambientais provocados pelos combustíveis fósseis, esta pesquisa pretendeu contribuir com o avanço da geração do hidrogênio biológico como combustível, principalmente por se tratar do melhoramento da produtividade do cultivo de cepas potenciais.

Além disso, as ferramentas encontradas poderão auxiliar em futuras pesquisas de bioprospecção de microalgas para biocombustíveis, com a

padronização de protocolos metodológicos para produção de hidrogênio, e consequente produção de subprodutos, em meios sintéticos e águas residuárias, visando contribuir com possível economia sustentável e avanço tecnológico do país na área.

2 OBJETIVOS

Desenvolver metodologia eficaz para produção de hidrogênio por microrganismos fotossintetizantes eucarionte, *Chlamydomonas* spp., e procarionte, *Anabaena* spp., avaliando a eficiência de diferentes cepas e otimizar a produção de uma cepa de cada gênero. Para tanto, o projeto foi dividido em três etapas, descritas a seguir com os seus respectivos objetivos específicos:

Etapa 1: Adquirir, isolar, axenizar e caracterizar o crescimento de cepas de *Chlamydomonas* spp. e *Anabaena* spp.; testes de vias de produção de hidrogênio.

Etapa 2: Ensaios de produção de hidrogênio com as cepas selecionadas na primeira etapa. Comparação dos resultados e seleção de uma cepa de cada gênero, com melhor produtividade de hidrogênio. Averiguar remoção de nutrientes e geração de subprodutos por todas as cepas durante a produção de hidrogênio.

Etapa 3: otimização das fases experimentais da cepa com melhor produtividade de hidrogênio de *Chlamydomonas* e *Anabaena* selecionadas na segunda etapa. Averiguar remoção de nutrientes e geração de subprodutos durante a produção de hidrogênio.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biocombustíveis e fontes de produção de hidrogênio

Após a Revolução Industrial houve intensificação no uso de combustíveis fósseis como fonte de energia, o que contribuiu para o aumento da poluição atmosférica e, conseqüentemente, para o efeito estufa e alterações no clima do planeta, além de serem fontes esgotáveis. A demanda mundial de energia a partir de combustíveis fósseis é de aproximadamente 80%, o que levará ao esgotamento destes recursos por suas reservas serem limitadas (DAS; VEZIROGLU, 2001).

Uma das soluções para evitar esses impactos é a utilização de fontes de energia alternativas, como biodiesel, energia solar, eólica, etanol, metanol, hidrogênio, entre outras (JORQUERA et al., 2007). Quanto ao combustível hidrogênio, mais especificamente, o interesse reapareceu na década de 1990 quando a poluição atmosférica por combustíveis fósseis tornou-se ainda mais evidente (BENEMANN, 1996; TAMAGNINI et al., 2003).

A produção de combustíveis a partir do hidrogênio é vantajosa por ser o elemento mais abundante no universo, carreador renovável e inesgotável, combustível limpo, ou seja, não poluente, por liberar apenas água em sua combustão, e ter simplicidade na conversão para energia elétrica nas demandas instantâneas, além de ser inofensivo aos seres humanos e ao ambiente (DAS; VEZIROGLU, 2001; TAMAGNINI, et al., 2003; JORQUERA et al., 2007).

A produção de hidrogênio pode ser realizada por diversos meios: a partir de combustíveis fósseis e de biomassa agrícola ou florestal, que não é vantajosa por envolver fontes não renováveis de energia e utilizar técnicas dispendiosas e poluentes; pela água por processos não biológicos, como por exemplo, os sistemas voltaicos, alternativa mais viável economicamente e eficaz; e por processos biológicos, que pode ser por biofotólise da água, fotodecomposição de compostos orgânicos e fermentação de compostos orgânicos, a partir de microrganismos, como bactérias heterotróficas e

fotossintéticas, cianobactérias e microalgas (BENEMANN, 1997; TAMAGNINI et al., 2003; DAS; VEZIROGLU, 2008).

Embora os sistemas voltaicos sejam eficientes, os métodos industriais para a produção de hidrogênio consomem energia de combustíveis fósseis. A produção biológica de hidrogênio utiliza-se de energias ambientais, como a temperatura e a pressão, sendo, portanto, uma produção de menor custo (BLOCK; MELODY, 1992; DAS; VEZIROGLU, 2008).

Segundo Benemann (1997) existem vantagens e desvantagens para a utilização de microrganismos para a produção de hidrogênio. Em condições laboratoriais, microalgas e cianobactérias possuem a capacidade de converter energia luminosa com eficiência semelhante aos sistemas voltaicos, sendo um dos únicos organismos capazes de produzir hidrogênio em determinadas condições. De fácil cultivo, podem ser cultivadas em sistemas fechados possibilitando a captura do gás.

Porém, o principal desafio para a utilização de microalgas é o desenvolvimento de técnicas práticas de cultivo no meio ambiente e a viabilização de processos economicamente viáveis, como a utilização de biorreatores que sejam mais eficientes e de menores custos. A capacidade de alta absorção de luz pelas microalgas limita a conversão da energia luminosa em hidrogênio devido à maior taxa fotossintética e produção de oxigênio (MELIS; HAPPE, 2001).

Das e Veziroglu (2008) e Dutta et al. (2005) relataram os diferentes tipos de biorreatores usados por vários autores, destacando quais podem ser mais eficientes e vantagens e desvantagens de acordo com a aplicação, a partir de experimentos prévios realizados em laboratório. Mas para tornar o gás hidrogênio comercialmente viável é preciso de muitos esforços na pesquisa e em novas áreas, principalmente na engenharia, embora haja caminhos para o avanço da geração do hidrogênio como combustível (GHIRARDI; AMOS, 2004).

3.2 Produção de hidrogênio por microrganismos fotossintetizantes e caracterização dos gêneros em estudo

Segundo levantamento bibliográfico por Das e Veziroglu (2001), os microrganismos fotossintetizantes já estudados para a produção de hidrogênio são, entre as algas verdes, o *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii*, e *Chlamydomonas moewusii*; e entre as cianobactérias pode-se citar: *Anabaena azollae*; *A. variabilis*; *A. cylindrica*; *Nostoc muscorum*; *N. spongiaeforme*; *Westloppia prolifica*; *Plectonema boryanum*; *Oscillatoria limnetica*; *Synechococcus* sp.; *Aphanothece halophytica*; *Mastigocladus laminosus*; e *Phormidium valderianum*.

As cianobactérias são organismos que crescem em meios que contêm sais minerais simples, utilizam N₂ e CO₂ atmosféricos como fonte alternativa de nitrogênio e carbono, água como doadora de elétrons e a luz solar para obtenção de energia, tornando-se de fácil cultivo e pouco dispendioso, além de serem considerados organismos versáteis e capazes de sobreviver em diferentes condições ambientais (TAMAGNINI et al., 2003).

O que as diferencia dos demais microrganismos fotossintetizantes é a capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico em amônia e a presença de pigmentos fotossintetizantes, como as ficocianinas e ficobilinas (RIVIERS, 2008).

Desta forma, esta pesquisa pretendeu avaliar a produção de hidrogênio da cianobactéria *Anabaena* spp., que, segundo Bicudo e Menezes (2006), possui talo filamentoso e microscópico, e os tricomas isolados podem se apresentar de forma reta, sigmóide e curva, e bainha mucilaginosa pode estar presente. Quando os filamentos ficam agregados, formam massas irregulares. As células são arredondadas, elíptica, cilíndricas e, raramente reniformes, com a presença de aerótopos. Os heterocistos são sempre intercalares e solitários, e o acineto pode ser elípticos, arredondado, cilíndrico ou oblongo, de acordo com a espécie, ocorrendo de forma isolada ou em cadeia juntamente com o heterocisto. A

reprodução dessa espécie é por fragmentação do tricoma, de maneira geral, ou também, pela germinação do acineto.

Anabaena spp. pode ser encontrada no ar, solo, água doce ou marinha, embora a maioria encontra-se em ambiente de água doce. A grande preocupação é por esta espécie formar florações em represas e lagos, que podem gerar desequilíbrios ecológicos, além de ser preocupante para a saúde pública por se tratar de uma espécie potencialmente produtora de hepatotoxinas e neurotoxinas (SANT'ANNA et al., 2006).

Para comparar à produção de hidrogênio pela cianobactéria, foi analisado também o desempenho da clorofícea *Chlamydomonas* spp., espécie solitária e de vida livre, podendo ser elipsóides e ovóides; com parede celular espessa e cloroplastídeo parietal. Possui dois flagelos de igual tamanho que estão inseridos apicalmente no pólo anterior da célula, a quantidade e localização dos vacúolos são variadas e o estigma é conspícuo (BICUDO; MENEZES, 2006).

Segundo Andrade (2005), *Chlamydomonas* sp. são organismos de fácil cultivo e por isso são usadas como modelo em experimentos de genética, fisiologia, e biologia celular e molecular. Além disso, são organismos capazes de crescer mixotroficamente na presença de ácido acético, o que torna vantajosa a sua utilização para testes de produção de hidrogênio para a produção de combustível.

A produção biológica de hidrogênio por microalgas e cianobactérias pode ocorrer através da via biofotólise direta, sendo ela por fotossíntese aeróbia ou anaeróbia, ou por via biofotólise indireta, através dos processos de fermentação ou fixação de nitrogênio, sendo esta apenas por cianobactérias (Figura 1). Mas para maior eficiência nos processos de produção de hidrogênio é necessário que haja adaptações as vias metabólicas desses organismos (BENEMANN, 1997).

Figura 1 – Esquema representando as vias de produção de hidrogênio e enzimas envolvidas

3.3 Vias de produção de hidrogênio e enzimas envolvidas no processo

Três enzimas fundamentais podem estar presentes nas algas e cianobactérias em relação à metabolização e produção de hidrogênio: hidrogenase reversível, também chamada de bi-direcional, hidrogenase de captação ligada à membrana e nitrogenase, presente apenas em cianobactérias (SMITH et al., 1992; BENEMANN, 1997).

Porém, é muito ampla a classe de hidrogenases que catalisam a redução de prótons à hidrogênio molecular. A direção que esta reação de catálise segue depende do tipo de hidrogenase e do mediador da reação de oxidorredução, da concentração e do estado desse mediador, a concentração de prótons e a pressão parcial de hidrogênio molecular (VIGNAIS; BILLOUD, 2007).

Pouco se sabe sobre a hidrogenase reversível, mas há indícios que ela tem ação no metabolismo fermentativo na ausência de luz, e produção a partir da quebra da água em anaerobiose na presença de luz, produzindo o hidrogênio como um carreador de elétrons. A hidrogenase de captação ligada à membrana é capaz de assimilar o hidrogênio em baixas pressões, e recicla-lo. A nitrogenase é capaz de fixar o nitrogênio atmosférico e

transformá-lo em amônia, podendo evoluir a hidrogênio através de uma reação irreversível.

As algas e cianobactérias podem ter uma ou todas essas enzimas, com exceção da nitrogenase, presente apenas em cianobactérias, e estarem ativas simultaneamente, podendo haver alterações em suas atividades com pequenas modificações em suas condições de crescimento. Existem também variações genéticas conhecidas de cada uma dessas enzimas (SMITH et al., 1992; BENEMANN, 1997; DAS; VEZIROGLU, 2001).

Segundo Campbell e Farrell (2008), a fotossíntese ocorre em seres fotoautotróficos e consiste em converter gás carbônico, a partir da energia luminosa, em carboidratos ricos em energia, em duas fases distintas, a fase clara, na qual ocorre a produção de oxigênio, NADPH e ATP, e a fase escura, correspondente a síntese de carboidrato.

Inicialmente, ocorre a absorção da energia luminosa pelos elétrons das moléculas de clorofila. Os elétrons excitados são transportados por aceptores em uma cadeia transportadora de elétrons. Com este processo, ocorre a quebra de uma molécula de água e a liberação do oxigênio e prótons, utilizados na redução de NADP^+ a NADPH para a produção de energia usada na fase posterior da fotossíntese, a escura.

Essas reações da primeira fase que ocorrem com a absorção de luz são realizadas em dois fotossistemas distintos, porém relacionados, existentes tanto em eucariontes, conforme Figura 2, como em procariontes. Os elétrons transportados nos fotossistemas via ferredoxina servem como doadores de elétrons para a enzima hidrogenase, que irá produzir o hidrogênio (MELIS; HAPPE, 2001).

A redução de NADP^+ a NADPH acontece no fotossistema I (PSI), e os elétrons liberados são carreados da ferredoxina para a hidrogenase, enquanto que a produção de oxigênio é executada no fotossistema II (PSII). O transporte de elétrons ocorre nos dois fotossistemas e interagem entre eles de forma indireta através de uma cadeia transportadora de elétrons, como as ferredoxinas, no interior dos cloroplastos, nos eucariontes, ou no citoplasma, nos procariontes, que interligam estes fotossistemas,

consequentemente, ligando as reações que ocorrem na fase luminosa da fotossíntese.

Figura 2 - Transporte de elétrons nos fotossistemas I (PSI) e II (PSII) durante a fotossíntese, fase clara, em eucariontes.

Red: oxirredução de NAD(P)H; H₂ase: hidrogenase; Fd: ferredoxina; FNR: ferredoxina NADP⁺ redutase. Fonte: MELIS; HAPPE, 2001.

Por haver a produção de oxigênio, este processo normal da fotossíntese pode ser chamado de fotossíntese aeróbia, que é uma das vias de biofotólise direta para a produção de hidrogênio. Porém a produção de hidrogênio é menor do que a fixação de gás carbônico, pois as reações de sua formação e a própria enzima hidrogenase são muito sensíveis ao oxigênio, produto da fotossíntese, podendo até mesmo inibir a produção de hidrogênio (TAMBURIC et al., 2011).

Devido à esta sensibilidade, as algas verdes e algumas cianobactérias podem produzir hidrogênio através da fotossíntese anaeróbia, outra via da biofotólise direta de produção de hidrogênio (ROSENBAUM; SCHRÖDER, 2010). Neste processo os organismos utilizam energia luminosa para quebrar moléculas de água, podendo quebrar também carbono orgânico (fotodecomposição), sendo estes as principais fontes de elétrons e doadores de prótons H⁺, além de energia, para que ocorra a

produção de hidrogênio pela hidrogenase na ausência de oxigênio (CAMPBELL; FARRELL, 2008; TAMBURIC et al., 2011).

Portanto, pode-se dizer que a produção de hidrogênio pelas algas verdes é uma associação da cadeia de transferência de elétrons da fotossíntese e fermentação, a partir do aceptor de elétrons ferredoxina, servindo como um mediador das reações de oxirredução para a hidrogenase (ANTAL et al., 2015), que irá reduzir os prótons em hidrogênio molecular. À exemplo, *C. reinhardtii* possui excepcional flexibilidade metabólica que permite a sua aclimatação em condição anóxica na luz, ativando o metabolismo energético envolvendo as reações de fotossíntese, fermentação e reações mediadas pela hidrogenase (HEMSCHMEIER; HAPPE, 2011).

Porém, para que possa ocorrer produção eficaz de hidrogênio é necessário que o cultivo dos organismos seja realizado em duas etapas, sendo que na primeira a cultura algal permanece até a metade da fase exponencial em condição aeróbia, para que possa ocorrer síntese proteica para se manter na segunda fase, a anaeróbia, eficaz para a produção de hidrogênio. Nesta fase, as células algais irão utilizar a energia luminosa para quebrar moléculas de água e carbono e consequente liberação de hidrogênio através da hidrogenase, sem a interferência e inibição devido à presença do oxigênio (TAMBURIC et al., 2011).

Para a produção de hidrogênio com clorófitas vários estudos estão sendo realizados a partir de um meio anaeróbio proporcionado através da limitação de enxofre no meio de cultura. A redução das concentrações de enxofre provoca uma diminuição da atividade do fotossistema II no processo da fotossíntese, pois este componente é essencial na constituição de dois aminoácidos, cisteína e metionina, que fazem parte da estrutura da proteína do centro de reações do fotossistema II, que está, em condições normais, em constante reparação (MELIS et al., 2000).

Dessa forma, há comprometimento na fotólise da água e, consequentemente, decréscimo nas concentrações de oxigênio, tornando o meio anaeróbio e permitindo a produção de hidrogênio através da fonte

energética da luz e da hidrogenase (MELIS et al., 2000; ZHANG; HAPPE; MELIS, 2002; ANTAL et al., 2015). Há compensação entre a produção reduzida de oxigênio e consumo deste na respiração, proporcionando um ambiente anóxico (TAMBURIC et al., 2011; XU et al., 2014).

Todavia, ao o sistema tornar-se anaeróbio, o metabolismo das algas tem a capacidade de realizar fotofermentação, que, além de haver quebra da água com a energia luminosa, ocorrerá também a quebra de carboidrato, gerando ácidos orgânicos, álcoois, dióxido de carbono e hidrogênio (HALLENBECK; BENEMANN, 2002; TAMBURIC et al., 2011; YANG et al., 2013), havendo acúmulo desses metabólitos. Porém, como parte importante do metabolismo anaeróbio do piruvato ocorre no cloroplasto, há competição entre a formação dos metabólitos da fermentação e redução do hidrogênio (CATALANOTTI et al., 2013; ANTAL et al., 2015).

Na fotofermentação, além do hidrogênio, os principais produtos gerados com a quebra do piruvato durante a fase anaeróbia são o etanol, acetato, ácido fórmico, glicerol, lactato, succinato e o dióxido de carbono. As proporções destes diferentes produtos irão variar de acordo com as condições ambientais em que o organismo se encontra (ANTAL et al., 2015; YANG et al., 2015).

Além da ausência do enxofre, a presença do ácido acético nos cultivos com *Chlamydomonas* são de extrema importância para a produção de hidrogênio, pois o seu consumo pela alga, permite melhor crescimento da cultura e auxilia a proporcionar ambiente anóxico (KOSOUROV et al., 2003; FOUCHARD et al., 2005; JURADO-OLLER et al., 2015). Existem pesquisas que relatam que os cultivos mixotróficos produzem mais hidrogênio do que os autotróficos (TSYGANKOV et al., 2006; KOSOUROV et al., 2007; MEUSER et al., 2009; BALLESTER et al., 2015).

Diante disso e da capacidade de *Chlamydomonas* também crescer heterotroficamente usando acetato como única fonte de carbono e por possuir metabolismo fermentativo versátil (CATALANOTTI et al., 2013; YANG et al., 2013) dá a este gênero o potencial de produção de

biocombustíveis sob condições autotróficas, mixotróficas e heterotróficas (BALLESTER et al., 2015).

Em estudos realizados por diversos pesquisadores, a produtividade de hidrogênio por *Chlamydomonas* sp. através da fotossíntese anaeróbia e privação de enxofre, de acordo com as condições normais de temperatura e pressão, são aproximadamente: 70,1 $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (KIM et al., 2006); 66,9 $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (KOSOUROV et al., 2003); 58,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (MELIS et al., 2000); 2,4 $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (TAMBURIC et al., 2011); 2,8 $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (TSYGANKOV et al., 2006).

Há algumas soluções que podem melhorar a produção de hidrogênio pela biofotólise direta e até mesmo manter a produção por um período mais longo, através da remoção do oxigênio produzido pelos organismos, ou a regulação da luminosidade e captação da energia luminosa por eles, já que o aumento da taxa fotossintética aumenta a liberação de oxigênio e este, por sua vez, inibe a ação da hidrogenase.

A remoção do oxigênio pode ser feita através da utilização de captadores de oxigênio ou amortecedores que o removem, como por exemplo, a utilização de glicose ou oxidase glicose. Porém, a utilização de reações para consumir e aliviar a inibição de oxigênio e o uso de amortecedores não é tão viável pelas complicações e custos gerados por essas técnicas (GAFFRON; RUBIN, 1992; BENEMANN, 1997; DAS; VEZIROGLU, 2001; HALLENBECK; BENEMANN, 2002).

Além disso, para solucionar estes problemas, técnicas de engenharia molecular foram desenvolvidas para produzir hidrogenases mais tolerantes ao oxigênio (MCTAVISH; SAYAVEDRA-SOTO, 1995; GHIRARDI et al., 2015), beneficiando a produção de hidrogênio, aumentando a produtividade das cepas (GODAUX et al., 2013).

A produção de hidrogênio pelos microrganismos por biofotólise indireta pode ocorrer através da fixação de nitrogênio ou pelo processo de fermentação no escuro. A fixação do nitrogênio é um processo realizado por algumas bactérias e cianobactérias, que consiste na redução do N_2

atmosférico em amônia (NH_3) a partir do complexo enzimático da nitrogenase (CAMPBELL; FARRELL, 2008).

Na reação são utilizados seis elétrons para reduzir o nitrogênio molecular a íon amônia (NH_3^+), e mais dois elétrons para reduzir o íon hidrogênio (H^+) a H_2 (WEBER et al., 2014). Assim, as cianobactérias utilizam mais energia do que as algas verdes, necessitando de ATP nitrogenase para a produção de hidrogênio. A desvantagem da produção de hidrogênio por nitrogenase consiste no maior consumo energético comparado à produção pela hidrogenase (ROSENBAUM; SCHRÖDER, 2010) (Figura 3).

Figura 3 - Representação das enzimas e produção de hidrogênio na célula vegetativa e heterocisto em cianobactérias

BI HYD – hidrogenase bi-direcional na célula vegetativa; UP HYD – hidrogenase de captação; NTR – nitrogenase. Equação 1: produção de hidrogênio a partir da hidrogenase, com consumo de 2 elétrons. Equação 2: produção de hidrogênio a partir da nitrogenase com a presença de nitrogênio, havendo fixação dele e formação de amônia e hidrogênio com o consumo de 8 elétrons e 16 moléculas de ATP. Equação 3: produção de hidrogênio a partir da nitrogenase sem nitrogênio, não havendo a fixação e formando hidrogênio com o consumo de 2 elétrons e 4 moléculas de ATP. Seta indica o heterocisto no filamento de uma cianobactéria. Fonte: YEAGER et al., 2011.

Apesar do maior gasto energético, a fixação de nitrogênio é um processo que se separa espacialmente e temporalmente. Na fixação de

nitrogênio, a separação espacial corresponde na distinção entre as células vegetativas, que são as fotossintéticas, e os heterocistos, células especializadas na fixação do nitrogênio molecular, quando presentes. O heterocisto possui uma parede celular espessa rígida que protege a nitrogenase do oxigênio, reduzindo a sua difusão, e o seu resíduo é absorvido pelas altas taxas de respiração (WEARE; BENEMANN, 1974; RIVIERS, 2008). A separação temporal consiste na fase de escuro em que a fotossíntese é inibida e não ocorre a produção de oxigênio.

Porém, é válido lembrar, que as cianobactérias podem ter vantagens na produção de hidrogênio por também poderem realizar a biofotólise direta através da hidrogenase reversível, quando em ambientes anóxicos, além da fixação de nitrogênio (via indireta) (DAS; VEZIROGLU, 2001; TAMAGNINI et al., 2003).

Há relatos de produção de hidrogênio por cianobactérias quando estas são cultivadas sob privação de nitrogênio e com argônio no *headspace*. Este gás no *headspace* proporciona ambiente microaeróbio, além de a ausência de nitrogênio no meio reduzir as taxas fotossintéticas, por ser elemento estrutural dos pigmentos fotossintéticos, contribuindo com a diminuição do oxigênio no sistema, além de sua ausência estimular a formação de heterocistos e conseqüentemente, de nitrogenase (NEILSON et al., 1971; BOTHE et al., 2010; YEAGER et al., 2011; ANTAL et al., 2015).

A ausência de nitrogênio no meio de cultura e na atmosfera faz com que os elétrons carregados pela nitrogenase sejam direcionados apenas para a formação de hidrogênio, a partir de dois elétrons, não ocorrendo a fixação de nitrogênio e formação de amônia, além de menor gasto energético (WEBER et al., 2014) (Figura 3).

Porém, um dos principais desafios para a produção de hidrogênio via nitrogenase, é a presença de hidrogenase de captação em organismos com heterocistos, que reciclam o hidrogênio produzido em prótons (BOTHE et al., 2010). Mas há pesquisas que relatam que a presença de glicose pode inibir a ação desta enzima (TAMAGNINI et al., 2002; TIWARI; PANDEY, 2012).

Em estudos realizados com cepas de *Anabaena* sp. foram encontrados resultados similares aos relatados com clorófitas, o que demonstra que este organismo tem potencial para produção de hidrogênio. Em cultivos sob privação de nitrogênio e com argônio no *headspace*, em condições normais de temperatura e pressão Chen et al. (2014) relataram produtividade de hidrogênio de $16,1 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e Berberoglu et al. (2008) obtiveram $26,5 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

A via indireta por fermentação é caracterizada pela capacidade de algumas espécies de microalgas produzirem hidrogênio após permanecerem por um período em condições anaeróbicas no escuro e obterem energia por meio da quebra de compostos orgânicos, ocorrendo a síntese e ativação da hidrogenase e consequente produção de hidrogênio, por 80 à 120 horas aproximadamente (GHIRARDI et al., 2000; MELIS et al., 2000; KOSOUROV et al., 2003; JO et al., 2006; LAURINAVICHENE et al., 2006; SALEEM et al., 2012). Esta via de produção de hidrogênio não foi estudada nesta pesquisa.

Contudo, para solucionar os problemas de inibição e melhorar a produção de hidrogênio, vários estudos estão sendo realizados para desenvolver técnicas para otimizar os processos de produção deste composto por algas e cianobactérias.

Alguns fatores podem atuar como limitantes para a produção de hidrogênio ou contribuir para a sua maior produção, tanto na biofotólise direta quanto indireta, como por exemplo, a radiação, composição da fase gasosa, densidade e idade da cultura, pH, temperatura, limitação de nutrientes, como o nitrogênio e o enxofre, e concentrações de níquel, conforme relatado na revisão de Dutta et al. (2005), Tamagnini et al. (2003), Jo et al. (2006) e Smith et al. (1992).

Neste trabalho será possível comparar a produção de hidrogênio entre microrganismos fotossintetizantes procarionte e eucarionte, em diversas condições de cultivo quanto aos fatores que influenciam na produção deste gás, para averiguar e analisar a eficiência das cepas dos dois gêneros estudados.

A utilização da cianobactéria *Anabaena* spp. deve-se ao fato de ser pouco pesquisada para este fim, por dominar diversos ecossistemas aquáticos eutrofizados, e por ser organismo preocupante para a saúde pública nos ecossistemas aquáticos e nas estações de tratamento de esgoto, devido ao seu potencial tóxico; e a clorofícea *Chlamydomonas* spp., por ser um gênero muito estudado para várias finalidades, inclusive para a produção de hidrogênio.

Dessa forma, foi possível realizar comparações sobre a habilidade de diversas cepas nas condições de cultivo aplicadas para a busca de aperfeiçoamento metodológico para melhorar a produção, podendo contribuir significativamente para a produção de hidrogênio e avanço do país na área.

De acordo com o relatado, a hipótese da pesquisa foi que ocorreriam diferentes produções entre as cepas, mesmo as pertencentes ao mesmo gênero, e que a cianobactéria seria tão eficiente quanto a clorofícea na produção de hidrogênio, por produzir hidrogênio a partir da biofotólise direta anaeróbia e biofotólise indireta, embora tenha maior gasto energético e presença da hidrogenase de captação.

Assim, para solucionar os problemas de inibição e maximização da produção de hidrogênio, novas pesquisas devem ser realizadas para desenvolver técnicas para otimizar os processos de produção do hidrogênio por algas e cianobactérias, pois vários desafios biológicos e da engenharia devem ser superados para que este gás possa ser comercialmente viável e promover o desenvolvimento tecnológico em diversas áreas (GHIRARDI; AMOS, 2004; MELIS; HAPPE, 2001).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta pesquisa foram realizados experimentos com diferentes cepas de cianobactérias e clorofíceas a fim de comparar a produção de hidrogênio por organismos procariontes e eucariontes, *Anabaena* spp. e *Chlamydomonas* spp., respectivamente, sob variadas condições de crescimento, além de averiguar a cepa mais eficiente de cada gênero.

O projeto foi desenvolvido em três etapas (Figura 4) das quais a segunda e a terceira correspondem à produção de hidrogênio:

- **Primeira etapa:** as cepas foram adquiridas a partir de bancos de microrganismos e isolamento de amostra ambiental e, posteriormente, foram purificadas e pré-selecionadas para os ensaios. Posteriormente fez-se a caracterização das fases de crescimento das espécies e quantificação de biomassa; determinação de melhores condições de cultivo quanto à fatores físico-químicos; e testes de vias de produção de hidrogênio: biofotólise direta aeróbia e anaeróbia e biofotólise indireta, com ou sem privação nutricional.

- **Segunda etapa:** foram realizados ensaios, com todas as cepas pré-selecionadas, dos dois gêneros, para averiguar a eficiência da produção de hidrogênio de *Chlamydomonas* e *Anabaena*, sob privação de enxofre e nitrogênio, respectivamente, em duas radiações. De acordo com os resultados, foi selecionada uma cepa de cada gênero, as que obtiveram melhor produtividade, para a terceira etapa. Além disso, foram analisadas remoção de nutrientes, perfil bioquímico e geração de subprodutos, ácidos orgânicos e álcoois, em todos os ensaios de produção de hidrogênio.

- **Terceira etapa:** foi realizada a otimização da biomassa das cepas selecionadas da etapa anterior a partir de um planejamento fatorial com ponto central, seguido de ensaios de otimização de produção de hidrogênio, a partir de variações em fatores físico-químicos em ambos, com o objetivo de aumentar a produtividade destas cepas. Foram feitas análises de remoção de nutrientes, perfil bioquímico e geração de subprodutos, ácidos orgânicos e álcoois. Ao fim, fez-se a comparação da produção de hidrogênio, após otimização, entre *Anabaena* e *Chlamydomonas*.

Além disso, foram realizadas no decorrer das etapas, análises bioquímicas e físico-químicas, bem como a composição da atmosfera das culturas durante os ensaios de produção de hidrogênio.

Figura 4 - Fluxograma experimental com as três etapas desenvolvidas no trabalho.

[] C org.: concentração de carbono orgânico; [] N amoniacal: concentração de nitrogênio amoniacal.

4.1 Delineamento da primeira etapa

4.1.1 Obtenção das cepas

As cepas da clorofícea *Chlamydomonas* spp. foram adquiridas de bancos de microrganismos: The Culture Collection of Algae (UTEX), Sammlung von Algen kulturen at University of Goettingen (SAG), sendo que as destes dois bancos foram doadas pelo National Renewable Energy Laboratory (NREL), Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce da UFSCar (UFSCarCC) e Coleção de Culturas de Microalgas Marinhas (IOUSP). Quanto as cepas de *Anabaena* spp., foram todas adquiridas dos bancos UTEX e SAG.

Algumas cepas de *Chlamydomonas* spp. foram adquiridas através do isolamento a partir de amostra ambiental de um reservatório de água doce do Clube Náutico de Araraquara, SP (latitude: -21,7155189; longitude: -48,0234363). A coleta foi realizada na sub superfície da água e foi levada a fresco ao laboratório e enriquecida em meio TAP (GORMAN; LEVINE, 1965) (Tabela 1) nas diluições 25%, 50% e 75% para aumentar a diversidade de organismos. As amostras foram mantidas em sala climatizada de cultivo a 24°C, radiação de 60 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 12h/12h, para posterior isolamento das microalgas.

Para o isolamento de *Chlamydomonas* spp., foi utilizado primeiramente o método de fototaxia, que consiste na migração dos organismos flagelados do ambiente escuro para o claro devido ao fototropismo. Em um frasco vedado com papel alumínio foi colocado o meio de cultivo enriquecido e uma pipeta Pasteur de vidro com meio de cultura (Figura 5). O Frasco foi mantido na sala climatizada de cultivo (24°C, 60 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 12h/12h).

Tabela 1 - Composição do meio de cultura TAP (GORMAN; LEVINE, 1965)

Solução	Componente	Quantia (mL.L ⁻¹)	Concentração solução estoque (g.L ⁻¹ dH ₂ O)	Concentração final (µM)
1	NH ₄ Cl	25	15	7000
	MgSO ₄ ·7H ₂ O		4	0,406
	CaCl ₂ ·2H ₂ O		2	0,34
2	K ₂ HPO ₄	0,375	288	620
	KH ₂ PO ₄		144	390
3	EDTA·Na ₂	1	50 g.250 mL ⁻¹ dH ₂ O	0,537
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O		22 g.100 mL ⁻¹ dH ₂ O	0,765
	H ₃ BO ₃		11,4 g.200 mL ⁻¹ dH ₂ O	0,922
	MnCl ₂ ·4H ₂ O		5,06 g.50 mL ⁻¹ dH ₂ O	0,511
	CoCl ₂ ·6H ₂ O		1,61 g.50 mL ⁻¹ dH ₂ O	0,135
	CuSO ₄ ·5H ₂ O		1,57 g.50 mL ⁻¹ dH ₂ O	0,126
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O		1,10 g.50 mL ⁻¹ dH ₂ O	0,018
	FeSO ₄ ·7H ₂ O		4,99 g.50 mL ⁻¹ dH ₂ O	0,359
4	Ácido Acético Glacial	1		17485

Figura 5 - Representação do frasco vedado com papel alumínio com meio de cultivo líquido enriquecido com amostra ambiental e a inserção de pipeta Pasteur de vidro com iluminação.

Posteriormente à migração de células flageladas na pipeta de Pasteur, fez-se o plaqueamento das amostras contidas na pipeta em meio de cultura TAP solidificado com Ágar (1%), a partir do método de espalhamento em placas de Petri, e foram mantidas em sala climatizada. Repicagens das colônias foram feitas em outras placas a partir do método de esgotamento até que se obtivesse a colônia pura do gênero desejado (HOSHAW; ROSOWSKI, 1973; ANDERSEN; KAWACHI, 2005).

Após incubação de aproximadamente um mês, as colônias foram observadas em microscópio invertido (Olympus, CKX41) e fez-se o isolamento das colônias de *Chlamydomonas* spp. com agulha estéril em meio TAP líquido em tubos de cultura.

As cepas isoladas foram identificadas utilizando-se chaves taxonômicas específicas para clorofíceas e foram mantidas no Banco de Microalgas e Cianobactérias do Laboratório de Biotoxicologia de Águas Continentais e Efluentes.

Ao total, com isolamentos, doações e aquisição de cepas de bancos de microrganismos, foram obtidas 11 cepas de *Chlamydomonas* spp. e 10 cepas de *Anabaena* spp. Posteriormente, todas as cepas passaram por um processo de purificação para ficarem axênicas, para que não houvesse influência de bactérias na produção de hidrogênio.

4.1.2 Manutenção das cepas

As cepas adquiridas, isoladas e utilizadas nos experimentos foram mantidas em tubos de cultura de vidro de 50 ml com tampa rosqueável e com 20 ml de cultura, em sala climatizada de cultivo com temperatura de 24°C, fotoperíodo de 12 horas e radiação de 60 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, fornecida por lâmpadas tubulares fluorescentes de 20W (OSRAM).

O meio de cultura e pH utilizados seguiram as condições estabelecidas no isolamento das cepas ou fornecidas pelo banco da cepa adquirida. As cepas de *Chlamydomonas* spp. permaneceram em meio de cultura TAP (GORMAN; LEVINE, 1965) (Tabela 1), com adição de arginina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para a cepa CC425, e pH 7,2, e a *Anabaena* spp. em meio BG-11 (RIPPKA, 1979)(Tabela 2) e pH 8,5.

Os inóculos foram repicados bimestralmente em condições de assepsia na proporção de 10% em meio de cultura previamente autoclavado à 121°C, por 20 minutos, e tamponado com TRIS, durante todo o decorrer do projeto, com o intuito de evitar a perda das cepas no Banco de Microalgas e Cianobactérias do Laboratório de Biotoxicologia de Águas Continentais e Efluentes, EESC/USP.

Tabela 2 - Composição do meio de cultura BG-11 (RIPPKA, 1979)

Componente	Quantia (mL.L ⁻¹)	Concentração solução estoque (g.L ⁻¹ dH ₂ O)	Concentração final (µM)
NaNO ₃	10	150	17600
K ₂ HPO ₄	10	4	230
MgSO ₄ ·7H ₂ O	10	0,75	30
CaCl ₂ ·2H ₂ O	10	3,6	240
Citric Acid·H ₂ O	10	0,6	31
Ferric Ammonium Citrate	10	0,6	21
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	10	0,1	2,7
Na ₂ CO ₃	10	2	190
Solução metais traço	1		
H ₃ BO ₃		2,86	46
MnCl ₂ ·4H ₂ O		1,81	9
ZnSO ₄ ·7H ₂ O		0,22	0,77
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O		0,39	1,6
CuSO ₄ ·5H ₂ O		0,079	0,3
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O		0,0494	0,17

4.1.3 Purificação das cepas

A purificação consistiu em diversos métodos associados para as duas espécies, com o uso de fungicida e antibióticos (anfotericina, 2,5 µg.mL⁻¹; gentamicina, 25 µg.mL⁻¹; estreptomicina, 25 µg.mL⁻¹; e penicilina 100 µg.mL⁻¹, respectivamente), solução de hipoclorito de sódio a 0,5%, e método do esgotamento em placas de Petri com meio de cultura sólido (HOSHAW; ROSOWSKI, 1973; STEIN, 1973; VIEIRA, 1983; ANDERSEN; KAWACHI, 2005).

As soluções de antibiótico foram preparadas separadamente e esterilizadas através de filtração com membrana estéril (Sartorius 0,2 µm) em capela de fluxo laminar.

Em tubos de cultura de 10 mL contendo 5mL de meio de cultivo líquido, TAP para *Chlamydomonas* spp. e BG-11 para *Anabaena* spp., previamente autoclavados, foram adicionadas as soluções de antibióticos e fungicida. Posteriormente, fez-se o inóculo das cepas na proporção de 10%

e foram incubadas (24°C, 60 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 12h/12h) por períodos de 12, 24, 48 e 72 horas.

Durante estes períodos, foram retiradas alíquotas de 0,5 mL, dos tubos e inseridos em tubos de cultivo de 10 mL com 5mL de seus respectivos meios estéril, enriquecidos com peptona e glicose (1g.L⁻¹), em capela de fluxo laminar. Posteriormente, foram incubados (24°C, 60 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo 12h/12h) por 10 dias, e nos tubos que não houve turvação foi feita a análise microscópica para confirmar a ausência de bactérias.

A solução de hipoclorito de sódio (0,5%) foi utilizada para as cepas de *Anabaena* spp. Foi adicionado 0,03 mL da solução em tubos de cultivo de 10 mL, contendo 2,97 mL de cultura de cada cepa. Após 1 minuto e 30 segundos da inoculação fez-se o esgotamento em placa de Petri.

Com as cepas de cianobactéria que não suportaram o procedimento foi realizado apenas o esgotamento em placa de Petri e sucessivo isolamento com agulha estéril e semeadura em meio líquido, em capela de fluxo laminar. Para confirmar a axenização, fez-se o repique destas em meio de cultura enriquecido com peptona e glicose, além de análise microscópica dos tubos que não turvaram.

4.1.4 Pré-seleção das cepas

A pré-seleção das cepas foi realizada para que pudesse ser dada sequência as etapas posteriores da pesquisa. De todas as cepas obtidas, decidiu-se escolher cinco cepas de cada gênero, totalizando dez cepas.

Primeiramente, para a seleção das cepas, foi utilizado o critério de que não seria utilizado na pesquisa cepas que não foram possíveis purificar. Porém, de todas as cepas de *Anabaena* spp. obteve-se sucesso quanto à axenização apenas de quatro (seção 5.1.1).

Posteriormente, fez-se um teste de crescimento das cepas axênicas, a partir da fase exponencial, em sistemas fechados por sete dias, pois todos os ensaios de produção de hidrogênio deveriam ser realizados desta forma para não haver escape de gás. O controle de crescimento foi realizado

através de densidade óptica no comprimento de onda 750 nm, conforme Griffiths et al. (2011), para evitar a influência da concentração de pigmentos. As cepas que não tiveram diferença em seu crescimento entre os sistemas semiaberto e fechado foram selecionadas.

Ao fim, de acordo com estes testes, chegou-se a escolha de cinco cepas de *Chlamydomonas* spp. e quatro de *Anabaena* spp., para serem caracterizadas e posteriormente testadas quanto às vias de produção de hidrogênio para dar sequência à primeira etapa.

4.1.5 Caracterização das cepas selecionadas: fases de crescimento e quantificação de biomassa

O intuito de fazer a caracterização das cepas selecionadas foi para ter uma prévia das fases e período adequado para a realização dos repiques durante os ensaios de melhoramento de condições de cultivo e de produção de hidrogênio, bem como estimar a potencialidade de cada uma delas quanto à produção de biomassa.

Portanto, foi feita a caracterização do crescimento de cada cepa a partir de curvas de crescimento e análise das fases de crescimento lag, exponencial, estacionária e de senescência, nas condições de cultivo em que as cepas são mantidas (seção 4.1.2.), além de cálculos de parâmetros cinéticos de crescimento.

As curvas de crescimento foram elaboradas a partir de dois Erlenmeyers de 2 L, contendo 1 litro de cultura axênica, para cada cepa. As coletas de amostras ocorreram diariamente e realizadas em ambiente asséptico (capela de fluxo laminar), com alternância dos Erlenmeyers para que o volume retirado não afetasse o crescimento das culturas.

A partir das alíquotas retiradas eram feitas as leituras de densidade óptica no comprimento de onda 750 nm (GRIFFITHS et al., 2011), e análise de sólidos suspensos totais (APHA, 2005).

Elaboradas as curvas de crescimento calcularam-se os parâmetros de crescimento, velocidades específicas de crescimento e tempo de geração,

de cada cepa a partir de modelagem conforme o modelo de Gompertz (ZWIETERING et al., 1990) (seção 4.5).

Posteriormente, foram realizadas regressões lineares, para cada cepa, com a finalidade de estimar biomassa a partir da relação entre a leitura espectrofotométrica (750 nm) e sólidos suspensos totais (JO et al., 2006; CHANDRA; MOHAN, 2011; TAMBURIC et al., 2011; SANTOS, 2013). Com as regressões lineares foi possível fazer o monitoramento do crescimento das culturas nos tubos de cultura.

4.1.6 Melhoria das condições de cultivo

Após a escolha das cepas dos dois gêneros e suas caracterizações, foi realizado um teste de meio de cultivo apenas para a cianobactéria, pois a clorofícea, que é mantida no meio TAP, possui uma fonte de carbono orgânico, o ácido acético (17,48 mM), e o meio utilizado para manter *Anabaena* sp., BG-11, possui concentração baixa de ácido cítrico (0,031 mM), comparado ao TAP.

Devido à importância da existência do carbono orgânico no meio de cultura para a produção de hidrogênio pelos microrganismos (FOUCHARD et al., 2005; STEBEGG, 2011; TIWARI; PANDEY, 2012), optou-se por fazer o teste de meio de cultura com fonte de carbono na mesma concentração para os dois gêneros. Para tanto, inicialmente, foi feito o teste de cultivo das cepas de *Anabaena* spp. em meio TAP, porém, elas não cresceram.

Posteriormente, foram feitos os testes utilizando os meios ASM-1 (GORHAM et al., 1964) (Tabela 3) e BG-11, meio em que as cepas estavam sendo mantidas, ambos indicados para o cultivo de cianobactérias, com a adição de 3 diferentes fontes de carbono orgânico, separadamente, na mesma concentração molar de carbono presente no meio TAP.

Todas as cepas selecionadas foram testadas nestes dois meios de cultura padrão (sem carbono orgânico, ou com baixa concentração no caso do BG-11), e nestes mesmos com a adição de glicose ($1,05 \text{ g.L}^{-1}$), de ácido acético (1 mL.L^{-1}) e de ácido cítrico ($1,22 \text{ g.L}^{-1}$).

Tabela 3 - Composição do meio de cultura ASM-1 (GORHAM et al., 1964)

Solução	Componente	Quantia (mL.L ⁻¹)	Concentração solução estoque (g.L ⁻¹ dH ₂ O)	Concentração final (µM)
A	NaNO ₃	20	8,5	2000
	MgCl ₂ ·6H ₂ O		2,05	0,202
	MgSO ₄ ·7H ₂ O		2,45	0,199
	CaCl ₂ ·2H ₂ O		1,45	0,197
B	KH ₂ PO ₄	2	8,7	100
	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O		17,8	100
C	H ₃ BO ₃	0,1	24,8	0,04
	MnCl ₂ ·4H ₂ O		13,9	0,00702
	FeCl ₃ ·6H ₂ O		10,8	0,00399
	ZnCl ₂		3,35	0,00246
	CoCl ₂ ·6H ₂ O		0,19	0,00008
	CuCl ₂ ·2H ₂ O		0,014	0,000008
D	EDTA·Na ₂	0,4	18,6	0,02

Os experimentos foram realizados em tubos de cultura de 50 mL, com 20 ml de cultivo, em triplicata, com temperatura constante de 24° ± 1°C, pH 8,5, 60 µmol.fótons.m⁻².s⁻¹ e fotoperíodo 12h/12h. O acompanhamento do crescimento das culturas, bem como as curvas de crescimento, foi realizado a partir de densidade óptica no comprimento de onda 750 nm.

A partir dos resultados deste teste e escolhido o meio de cultura de cultivo de *Anabaena* spp., com a adição do carbono orgânico, fez-se um planejamento fatorial de diferentes níveis de pH e radiação com uma cepa de cada gênero, para determinar qual a melhor condição de crescimento delas para as etapas subsequentes.

Foram escolhidas as cepas que apresentaram melhores características de crescimento, segundo a caracterização, para evitar o excesso de experimentos, sendo *Chlamydomonas* sp. a cepa CC124 (em meio TAP) e *Anabaena* sp. a cepa 1448 (em meio BG-11 com glicose, seção 5.1.3).

Os níveis estabelecidos foram iguais para os dois gêneros, de acordo com o levantamento bibliográfico e a referência de manutenção das cepas. Para a variação do pH foram adotados 6,2; 7,2; 8,2; 9,2; e 10,2; e radiações de 15; 60; 100; 150 e 200 µmol.fótons.m⁻².s⁻¹.

Os ensaios foram realizados em tubos de cultura de 50 mL, com 20 ml de cultivo, em triplicata, e incubados em incubadoras BOD 411D com temperatura constante de $24^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, e sem fotoperíodo, devido aos experimentos com melhores resultados de produção de hidrogênio serem realizados com iluminação constante (KOSOUROV et al. 2003; JO et al. 2006).

4.1.7 Testes de produção de hidrogênio

Todas as cepas selecionadas, tanto de *Chlamydomonas* spp. quanto de *Anabaena* spp., foram testadas quanto à produção de hidrogênio por biofotólise direta, nas vias fotossíntese aeróbia e anaeróbia, e por biofotólise indireta, apenas para a cianobactéria, conforme descrito por Benemann (1997), Das e Veziroglu (2008), Hallenbeck e Benemann (2002), e Rosenbaum e Schröder (2010).

Os testes foram realizados apenas para averiguar qual seria a via mais vantajosa para a produção do gás de interesse, sem fazer variações nutricionais no meio de cultura, pH e radiação, mantendo as mesmas condições estabelecidas no melhoramento do cultivo (seção 5.1.3).

Os testes foram feitos em frascos Duran de 500 mL, com 300 mL de cultivo, vedados com tampa de frasco de soro, 24°C , $60 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e sem fotoperíodo. A produção de hidrogênio foi calculada de acordo com a calibração do método cromatográfico, conforme Anexo 1.

De acordo com os resultados (seção 5.1.4), optou-se em fazer na segunda e terceira etapas a avaliação da produção de hidrogênio para *Chlamydomonas* spp. por biofotólise direta via fotossíntese anaeróbia, conforme descrito pelos autores Benemann (1997), Das e Veziroglu (2008), Hallenbeck e Benemann (2002), Rosenbaum e Schröder (2010), Ghirardi et al. (2000) e Laurinavichene et al. (2006), e para *Anabaena* spp. por biofotólise indireta e direta anaeróbia, conforme Antal e Lindblad (2005), Liu et al. (2010) e Weber et al. (2014).

4.2 Ensaios de produção de hidrogênio: montagem dos reatores para as segunda e terceira etapas

Adotaram-se na segunda e terceira etapas as produções de hidrogênio por biofotólise direta via fotossíntese anaeróbia e biofotólise indireta, sendo esta ultima apenas para cepas de *Anabaena* spp.

A montagem dos ensaios de produção de hidrogênio consiste primeiramente em aumentar o volume com repiques na proporção de 10%, e aclimatar as culturas, de acordo com as condições em que foram realizados os ensaios de produção de hidrogênio nas segunda e terceira etapas, e com luz sem fotoperíodo.

Posteriormente, para a montagem dos fotobiorreatores, as culturas são cultivadas em duas fases experimentais (Figura 6) de acordo com o seu crescimento (Figura 7), em luz sem fotoperíodo.

Todo o preparo das culturas e montagem dos ensaios de hidrogênio foi realizado em capela de fluxo laminar e com material previamente esterilizado, em autoclave à 121°C por 20 minutos, para a prevenção de contaminantes.

- 1ª fase experimental: as culturas foram mantidas em condição aeróbia desde o primeiro instante do repique (dia 0) até aproximadamente metade da fase exponencial, em Erlenmeyers de 500 mL, com 300 mL de cultura, em triplicata. Cada Erlenmeyer era correspondente à um fotobiorreator da 2ª fase experimental. Além disso, foram inoculados outros três Erlenmeyers, mantidos na mesma condição desta 1ª fase experimental, para posteriores análises bioquímicas da biomassa (seção 4.4) no momento em que seriam transferidas para o fotobiorreator.

- 2ª fase experimental: as culturas dos Erlenmeyers foram centrifugadas em frascos Nalgene, previamente esterilizados (2000 rpm por 10 minutos) e as células lavadas, por 2 vezes (TAMBURIC et al., 2011), e resuspensas em seus respectivos frascos Duran de 500 mL (fotobiorreator), com 300 mL de meio de cultura, em triplicata. Foram coletadas alíquotas de 500 µL, e fixadas com lugol acético, para o controle da densidade celular de

cada fotobiorreator. Posteriormente, os frascos foram vedados com tampa de frasco de soro esterilizados. A lavagem das células foi realizada com o meio de cultura na mesma condição em que foi utilizado nos fotobiorreatores.

Figura 6 - Esquema representativo do preparo dos cultivos e montagem dos fotobiorreatores para os ensaios de produção de hidrogênio

Figura 7 - Esquema representativo das fases experimentais de acordo com o crescimento da cultura em relação ao tempo, demonstrando o momento de transferência de biomassa

Após a resuspensão das células e vedação dos frascos, houve a troca da atmosfera gasosa por nitrogênio e argônio, purgados por 10 minutos e previamente esterilizados em membrana estéril (Sartorius 0,2 μm), para as cepas de *Chlamydomonas* spp. e *Anabaena* spp., respectivamente, para tornar o *headspace* anóxico (MELIS et al., 2000; ALLAHVERDIYEVA et al., 2010; TAMBURIC et al., 2011).

Antes da centrifugação das culturas foram retiradas alíquotas de 10 ml dos Erlenmeyers para leitura de densidade óptica (750 nm) e análises de sólidos suspensos totais e clorofila *a*. Após a primeira centrifugação da biomassa dos Erlenmeyers, e separação delas, os meios de cultura foram coletados, filtrados (membrana de fibra de vidro de 0,6 μm) e congelados para análises físico-químicas.

As condições físico-químicas, utilizadas nas duas fases experimentais estabelecidas para cada gênero, para os ensaios das segunda e terceira etapas do projeto estão descritas a seguir.

Ao término da 2ª fase experimental (produção de hidrogênio), mediu-se o pH e foram retiradas dos fotobiorreatores alíquotas de 500 μL , e fixadas com lugol acético, para o controle da densidade celular. Além disso, foram retiradas alíquotas de 10 mL para a leitura de densidade óptica (750 nm), análises de sólidos suspensos totais e clorofila *a*.

Posteriormente, a biomassa dos fotobiorreatores foi centrifugada para as análises bioquímicas dos cultivos (seções 4.4) e o meio de cultura foi filtrado (membrana de fibra de vidro de 0,6 μm) e congelado para análises físico-químicas.

4.2.1 Segunda etapa

Foram testadas cinco cepas de *Chlamydomonas* spp. e quatro de *Anabaena* spp., conforme a pré-seleção da primeira etapa, para a produção de hidrogênio de acordo com as fases experimentais descritas acima, com o intuito de fazer uma varredura para a terceira etapa.

Os ensaios foram realizados de acordo com a melhor condição físico-química estabelecida a partir do melhoramento do cultivo (seção 5.1.3) na primeira fase experimental, e variação apenas da radiação, em dois níveis, na segunda fase experimental, por ser fator que influencia a produção de hidrogênio (GHIRARDI et al., 2000; MELIS et al., 2000; KOSOUIROV et al., 2003; JO et al., 2006; LAURINAVICHENE et al., 2006; SALEEM et al., 2012).

De acordo com os resultados, foi selecionada uma cepa de cada gênero, as que obtiveram a melhor produtividade para a terceira etapa.

4.2.1.1 Condições físico-químicas para os ensaios com *Chlamydomonas* spp.

Na segunda etapa, para as cepas de *Chlamydomonas* spp., foi utilizado para os ensaios de produção de hidrogênio o meio de cultura TAP, sendo este aeróbio na primeira fase experimental e com limitação de enxofre na segunda fase experimental, e troca do *headspace* por nitrogênio para proporcionar um meio anóxico (MELIS et al., 2000; TAMBURIC et al., 2011).

Para a limitação de enxofre, houve as seguintes substituições de reagentes do TAP (Tabela 1): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($3,30 \text{ g.L}^{-1}$); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por ZnCl_2 ($10,40 \text{ g.100 mL}^{-1}$); $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ por $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($1,07 \text{ g.50 mL}^{-1}$); e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($4,85 \text{ g.50 mL}^{-1}$).

As condições físico químicas utilizadas nas duas fases experimentais, temperatura, pH, variações das radiações e meios de cultivo, constam na Tabela 4.

Tabela 4 - Condições físico-químicas nas fases experimentais dos ensaios de produção de hidrogênio de *Chlamydomonas* spp. na segunda etapa

Fase experimental	Temperatura (°C)	pH	Radiação ($\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	Meio de cultura
1ª	24	7,2	200	TAP
2ª			60	TAP - S
			200	TAP - S

TAP – S: meio de cultura sem componentes com enxofre.

4.2.1.2 Condições físico-químicas para os ensaios com *Anabaena* spp.

Para as cepas de *Anabaena* spp. na segunda etapa, foi utilizado para os aumentos de volume, aclimação e ensaios de produção de hidrogênio, o meio de cultura BG-11, com a adição de glicose na mesma proporção de carbono orgânico que o meio TAP, conforme resultados obtidos quanto ao melhoramento do cultivo das cepas.

Porém, para a primeira fase experimental, aeróbia, as culturas foram inoculadas neste mesmo meio com limitação de nitrogênio (10 mg.L^{-1} de NaNO_3 – $0,715 \text{ mM}$) para estimular a formação de heterocistos, células responsáveis pela produção de hidrogênio nas cianobactérias devido à presença da enzima nitrogenase. A concentração da limitação de nitrogênio para a formação dos heterocistos foi previamente testada.

Na segunda fase experimental, foi feita a privação de nitrogênio do meio de cultura, para estimular a ação da nitrogenase pela cianobactéria e consequente produção de hidrogênio (ANTAL; LINDBLAD, 2005; LIU et al., 2010; WEBER et al., 2015). Para tanto, houve a retirada do nitrato de sódio e permanência do citrato de amônio férrico devido à importância deste composto no processo (LIU et al., 2010).

As condições físico químicas utilizadas nas duas fases experimentais, constam na Tabela 5, com temperatura, pH, variações das radiações e meios de cultivo.

Tabela 5 – Condições físico-químicas nas fases experimentais dos ensaios de produção de hidrogênio de *Anabaena* spp. na segunda etapa

Fase experimental	Temperatura (°C)	pH	Radiação (μmol.fótons.m ⁻² .s ⁻¹)	Meio de cultura
1 ^a	24	9,2	60	BG-11 + gl limitação N
2 ^a			60	BG-11 + gl - N
			200	BG-11 + gl - N

BG-11 + gl limitação N: meio de cultura BG-11 com adição de glicose ($1,05 \text{ g.L}^{-1}$) e com limitação de nitrogênio (10 mg.L^{-1} de NaNO_3). BG-11 + gl - N: meio de cultura BG-11 com adição de glicose ($1,05 \text{ g.L}^{-1}$) e com privação de nitrogênio (NaNO_3).

4.2.2 Terceira etapa

Escolhidas as cepas com os melhores resultados de produtividade na etapa anterior foi realizado primeiramente, na terceira etapa, a otimização da biomassa, correspondente a primeira fase experimental. Estabelecida a melhor condição, fez-se a otimização da produção de hidrogênio, referente à segunda fase experimental (fases descritas na seção 4.2).

4.2.2.1 Otimização da primeira fase experimental

Para os dois gêneros foi realizada a otimização de biomassa a partir de um planejamento fatorial com ponto central e variação de quatro fatores físico-químicos em dois níveis. Os fatores testados foram temperatura, pH, radiação e concentração de carbono orgânico na forma de glicose, que, conforme levantamento bibliográfico, interferem na produção de biomassa e hidrogênio (KOSOUROV et al., 2003; DUTTA et al., 2005; JO et al., 2006; LAURINAVICHENE et al., 2006; KAUSHIK; ANJANA, 2011; TAMBURIC et al., 2011; SALEMM et al., 2012).

Os ensaios foram realizados em tubos de cultura de 50 mL, com 20 mL de cultivo, em triplicata, com repiques na proporção de 10% de inóculo, em incubadoras (BOD 411D) com controle de temperatura e luminosidade, e sem fotoperíodo. Os níveis testados, bem como os pontos centrais, constam na Tabela 6.

As curvas de crescimento foram elaboradas a partir de densidade óptica (750 nm), além de cálculos dos parâmetros cinéticos de crescimento e acompanhamento de sólidos suspensos totais (APHA 2005), no início e fim do crescimento, como também análise do rendimento de biomassa.

Posteriormente à análise dos resultados, fez-se um teste comparativo do melhor resultado obtido desta otimização com a condição utilizada na segunda etapa, com o intuito de averiguar se houve diferença no rendimento da biomassa.

Tabela 6 - Fatores e níveis investigados visando à otimização da biomassa das cepas de *Chlamydomonas* sp. e *Anabaena* sp.

Gênero	Meio de Cultura	Temp. (°C)	pH	Radiação ($\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	Adição de Glicose (g.L^{-1})
<i>Chlamydomonas</i> sp.	TAP fonte de carbono: 1 mL.L^{-1} ácido acético	24	6,2	200	0
					1,05
				500	0
					1,05
			8,2	200	0
					1,05
				500	0
					1,05
		28	7,2	350	0,525
		32	6,2	200	0
					1,05
				500	0
					1,05
			8,2	200	0
					1,05
				500	0
					1,05
<i>Anabaena</i> sp.	BG-11 fonte de carbono: 1,05 g.L^{-1} glicose	24	8,2	30	1,05
					2,1
				90	1,05
					2,1
			10,2	30	1,05
					2,1
				90	1,05
					2,1
		28	9,2	60	1,525
		32	8,2	30	1,05
					2,1
				90	1,05
					2,1
			10,2	30	1,05
					2,1
				90	1,05
					2,1

Nos meios de cultura em que não foi adicionada glicose manteve-se a concentração utilizada na segunda etapa. Nos meios em que foi adicionada glicose teve-se como fonte de carbono orgânico: TAP: 1 mL.L^{-1} de ácido acético + 1,05 g.L^{-1} de glicose; BG-11: 1,05, 1,525 e 2,1 g.L^{-1} de glicose, no ponto central e demais condições, respectivamente.

O teste comparativo também foi realizado em tubos de cultura de 50 mL, com 20 mL de cultivo, em triplicata, sem fotoperíodo e em incubadoras (BOD 411D) com controle de temperatura e luminosidade. O procedimento para elaboração das curvas de crescimento e rendimentos de biomassa foi igual ao utilizado para o planejamento fatorial de otimização de biomassa.

4.2.2.2 Otimização segunda fase experimental

Após a realização da otimização de biomassa e o teste comparativo desta otimização com as condições utilizadas na segunda etapa do trabalho, foi realizada a otimização da produção de hidrogênio (segunda fase experimental) para as cepas dos dois gêneros.

Para tanto, o aumento dos volumes de cultura, aclimações e a primeira fase experimental (Erlenmeyers aeróbios) foram realizados de acordo com os resultados obtidos quanto à otimização da biomassa. É válido lembrar que para *Anabaena* sp., na primeira fase experimental, fez-se o teste, nesta nova condição, quanto a formação de heterocistos com a limitação de nitrogênio no meio de cultura (10 mg.L^{-1} de NaNO_3), mantendo-a.

Na segunda fase experimental foram mantidas a temperatura e pH correspondente à primeira fase experimental da otimização de biomassa, e foram testados os fatores de condições nutricionais, para ambos os gêneros, e a radiação para *Chlamydomonas* sp., em dois diferentes níveis.

Além disso, foram testadas também as fases de crescimento em que a biomassa foi transferida para o fotobiorreator para dar início a segunda fase experimental. Para tanto, manteve-se a transferência da biomassa na exponencial, e também houve fotobiorreatores preparados no início da fase estacionária, ou seja, a primeira fase experimental foi mantida até o início da estacionária, neste caso.

Quanto à *Chlamydomonas* sp. foi realizada a variação da radiação e adição de baixa concentração de enxofre, $50 \text{ } \mu\text{M}$ (solução 1 do TAP – Tabela 1: $0,49 \text{ g.L}^{-1}$ de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $2,85 \text{ g.L}^{-1}$ de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), com o intuito de melhorar o ponto compensatório do oxigênio entre fotossíntese e

respiração para tornar o meio anóxico (KOSOUROV et al., 2002; ZHANG; HAPPE; MELIS, 2002; LAURINAVICHENE et al., 2006) (Tabela 7).

Tabela 7 - Fatores e níveis investigados visando à otimização da produção de hidrogênio por *Chlamydomonas* sp.

Fase de crescim.	Meio de Cultura	T. (°C)	pH	Enxofre (μM)	Radiação ($\mu\text{mol fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	Condição
Exponencial	TAP fonte de carbono: 1 mL.L ⁻¹	32	6,2	0	60	1
					200	2
				50	60	3
					200	4
Estacionária	ácido acético			0	60	5
					200	6
				50	60	7
					200	8

A fase de crescimento corresponde ao momento em que a biomassa foi transferida da 1ª para a 2ª fase experimental. Crescim.: crescimento; T.: temperatura.

Para *Anabaena* sp. fez-se variação na concentração de carbono orgânico, glicose e concentração de nitrogênio amoniacal, com a adição de cloreto de amônio (0,5 mM), o qual auxilia na ativação da produção de hidrogênio na ausência do nitrogênio (TROSHINA et al., 1995; LIU et al., 2010) (Tabela 8).

Tabela 8 - Fatores e níveis investigados visando à otimização da produção de hidrogênio por *Anabaena* sp.

Fase de crescim.	Meio de Cultura	T. (°C)	pH	Adição de glicose (g.L ⁻¹)	Amônio (mM)	Condição
Exponencial	BG-11 fonte de carbono:	32	10,2	1,05	0	1
					50	2
				2,1	0	3
					50	4
Estacionária	glicose			1,05	0	5
					50	6
				2,1	0	7
					50	8

A fase de crescimento corresponde ao momento em que a biomassa foi transferida da 1ª para a 2ª fase experimental. Crescim.: crescimento; T.: temperatura.

4.3 Análises físico-químicas e quantificação de gases

As análises físico-químicas necessárias à adequada caracterização dos meios de cultivo sintético TAP e BG-11, bem como os consumos nutricionais e produção de metabólitos secundários foram mensuradas conforme metodologia descrita na Tabela 9. As etapas em que foram realizadas estas análises, bem como o período no decorrer dos ensaios estão descritas na Tabela 10.

As análises espectrofotométricas e leituras de densidade óptica de acompanhamento de crescimento, foram realizadas em espectrofotômetro DR4000 (HACH) equipado com luz UV. Para as medidas de pH foi utilizado o pHmetro TEC-2mp (Tecnal). Para as análises de nitrogênio amoniacal utilizou-se o sistema Buchii automatizado.

Além disso, foram realizadas análises de ácidos orgânicos voláteis e álcoois, de acordo com Peixoto (2011) e Adorno et al. (2014), através de cromatografia gasosa (GC) em um sistema SHIMADZU, para determinar possíveis subprodutos gerados, visando à possível reutilização destes compostos.

Tabela 9 - Variáveis físico-químicas e suas respectivas metodologias e referências

Variáveis	Método	Referência
pH	Potenciométrico	-
SST	Gravimétrico - Método 2540D	APHA (2005)
P-PO ₄	Espectrofotométrico - Método 4500P E - Ácido Ascórbico	APHA (2005)
N-NO ₃	Espectrofotométrico Ultravioleta - Método 4500NO ₃ B	APHA (2005)
N-NH ₄	Mét. 4500NH ₃ B – Destilação eMét. 4500NH ₃ C –Titulométrico	APHA (2005)
DQO	Colorimétrico - Método 5220D - Refluxo fechado	APHA (2005)

SST: sólidos suspensos totais; P-PO₄: ortofosfato; N-NO₃: nitrato; N-NH₄: nitrogênio amoniacal; DQO: demanda química de oxigênio.

Para as análises físico-químicas no instante em que foram realizadas a transferência de biomassa, dos Erlenmeyers para o novo meio de cultura

nos fotobiorreatores (frasco Duran), utilizou-se o meio de cultura dos Erlenmeyers após a centrifugação da biomassa, o sobrenadante.

Tabela 10 - Variáveis físico-químicas e respectivas etapas e períodos em que foram realizadas

Variáveis	Etapas	Período dos ensaios			Fim 2ª f
		In. 1ª f (dia 0)	In. 2ª f (exponencial)	In. 2ª f (estacionária)	
pH	2	X			X
	3	X			X
SST	1	X	X	X	X
	2	X	X		X
	3 - Otm. Biom.	X			X
	3 - Otm. H ₂	X	X	X	X
P-PO ₄	2	X	X		X
	3	X	X (1, 2, 3 e 4)	X (5, 6, 7 e 8)	X
N-NO ₃	2	X	X		X
	3	X	X (1, 2, 3 e 4)	X (5, 6, 7 e 8)	X
N-NH ₄	2	X	X		X
	3	X	X (1, 2, 3 e 4)	X (5, 6, 7 e 8)	X
DQO	2	X	X		X
	3	X	X (1, 2, 3 e 4)	X (5, 6, 7 e 8)	X
Ác. Org. e Álcoois	2	X	X		X
	3	X	X (1, 2, 3 e 4)	X (5, 6, 7 e 8)	X

SST: sólidos suspensos totais (1ª etapa: do início ao fim das fases de crescimento); P-PO₄: ortofosfato; N-NO₃: nitrato; N-NH₄: nitrogênio amoniacal; DQO: demanda química de oxigênio; Ác. Org.: ácidos orgânicos voláteis; Otm. Biom.: otimização da biomassa; Otm. H₂: otimização da produção de hidrogênio; números ordinais de 1 a 8: indicam as condições testadas na otimização de produção de H₂ na terceira etapa (Tabelas 7 e 8). In. 2ª f exponencial e estacionária: indicam o momento em que os cultivos foram transferidos da primeira para a segunda fase experimental, sendo estes na fase exponencial e início da fase estacionária.

A quantificação da produção de gases foi feita por meio de cromatografia gasosa (GC), com detector de condutividade térmica, conforme relatado por Fernandes (2008), Melis et al. (2000) e Saleem et al. (2012). Os gases quantificados foram hidrogênio, nitrogênio e gás carbônico, de acordo com a calibração do método cromatográfico, conforme Anexo 1.

Na primeira etapa o acompanhamento da produção de gases foi feito de 24 em 24 horas a partir da incubação das amostras. Nas segunda e

terceira etapas, a quantificação de gases começou a ser realizada a partir de 12 horas em que os microrganismos foram transferidos para os fotobiorreatores (2ª fase experimental) até o momento de estabilização ou diminuição da produção de hidrogênio e produtividade, com acompanhamento de 12 em 12 horas.

As medidas de pressão dos fotobiorreatores foram realizadas de 12 em 12 horas, anteriormente a coleta de gás do *headspace*, com indicador de pressão MDD50, e as coletas de gás foram realizadas com seringa de 1mL com válvula (push button valve – 22285), ambos em ambiente asséptico.

4.4 Determinação de biomassa, densidade celular, e análises bioquímicas

O monitoramento de biomassa das cepas, em todas as etapas do trabalho, foi realizado por determinação de sólidos suspensos totais (APHA, 2005) e clorofila *a*, método de extração com etanol 80% (NUSCH, 1980 modificado por NEDERLANDSE NORM, 1981).

O controle de densidade celular, no início e fim da 2ª fase experimental, foi realizado a partir da contagem aleatória de organismos por unidade de volume, em câmara de Fuchs Rosenthal e microscópio Olympus BX51, segundo APHA (2005).

As análises bioquímicas das culturas, durante as segunda e terceira etapas, foram realizadas ao término das 1ª e 2ª fases experimentais, representando o instante em que a biomassa foi transferida para o fotobiorreator (início) e o término do ensaio de produção de hidrogênio (fim), respectivamente (MELIS et al., 2002; SALEEM et al., 2012).

Para tanto, as culturas foram centrifugadas em frascos Nalgene por 10 minutos e 2000 rpm em centrífuga (Eppendorf Centrifuge 5804R). A biomassa peletizada foi transferida para cadinho de porcelana e seca em estufa à temperatura de 60 °C, por 24 horas. Posteriormente foi macerada

em cadinho de porcelana poroso e congelada em frascos de vidro (-20 °C) para as posteriores análises do perfil bioquímico.

Com a biomassa seca das culturas foram realizadas análises para determinação de carboidratos e proteínas totais da biomassa. O carboidrato foi quantificado segundo método colorimétrico do fenol descrito por Dubois et al. (1956); e proteína total, a partir da análise de nitrogênio total Kjeldahl (NTK) (APHA, 2005), com o uso de um fator de conversão para proteínas de 4,71 sugerido para microalgas (LOURENÇO et al., 2007). A quantia destes compostos foi convertida em porcentagem em relação à biomassa seca.

Não foram realizadas análises de lipídeos e cinzas devido à quantidade insuficiente de biomassa seca.

4.5 Análises dos resultados: rendimento de biomassa, cálculo dos parâmetros cinéticos, produtividade e volume de hidrogênio

De acordo com os resultados das concentrações de hidrogênio por volume de cultura e produtividades obtidas em cada ensaio nas segunda e terceira etapas, pode ser feita uma comparação da eficiência na produção de hidrogênio, tanto entre as cepas de cada gênero, quanto entre os gêneros.

Estes resultados foram computados graficamente, além da confecção de tabelas, para contribuir com a visualização e interpretação dos resultados. Através de gráficos, foram feitas curvas demonstrando o crescimento das culturas, dos ensaios realizados na primeira e terceira etapas (otimização da biomassa), bem como a evolução da produção de hidrogênio, nas segunda e terceiras etapas. Dessa forma pode-se analisar quais cepas são mais produtivas.

Estas curvas de crescimento e de produção de hidrogênio foram analisadas de acordo com o modelo de Gompertz (ZWIETERING et al., 1990), no software Origin Pro 8, e foram estabelecidos os parâmetros cinéticos de crescimento, velocidades específicas máxima de crescimento

($\mu_{\max}$) e de produção de hidrogênio ($\mu_{\max} \text{ H}_2$), tempo de geração (Tg) e amplitude.

Para a aplicação da modelagem de Gompertz, os dados relativos ao crescimento das culturas, em absorbância, e à produção de hidrogênio (mmol.L^{-1}) foram normalizados para a escala logarítmica a partir da equação $y = \ln (X/X_0)$, sendo X o dado determinado no dia de interesse e X_0 o dado determinado no dia zero do ensaio. Após a normalização dos dados, eles foram plotados contra o tempo e ajustados ao modelo de Gompertz (ZWIETERING et al., 1990), conforme equação 1:

$$y = ae^{-e^{(-K(x-xc))}} \quad (1)$$

Os parâmetros obtidos com a modelagem (a, xc e K) foram utilizados para os cálculos dos parâmetros cinéticos a partir das seguintes equações:

- velocidades específicas máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) e de produção de hidrogênio ($\mu_{\max} \text{ H}_2$): $\mu_{\max} = a.K/e$.
- tempo de geração: $Tg = \ln 2/\mu_{\max}$
- amplitude: utilizado na comparação das curvas, referindo-se ao maior valor de crescimento final ou a produção máxima de hidrogênio, obtido pela equação 2:

$$y = \ln (X/X_0) \quad (2)$$

O rendimento de biomassa na otimização da terceira etapa foi calculado a partir da diferença da concentração de sólidos suspensos totais final pela inicial em cada condição de crescimento, desta forma, no maior rendimento obteve-se maior produção de biomassa.

A produtividade ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) de hidrogênio foi calculada em função da produção máxima de hidrogênio (mmol.L^{-1}) (X – amplitude) da cultura pelo seu tempo de cultivo (hora) (t), através da equação: $P = X/t$.

O volume de hidrogênio produzido pelas culturas ($\text{mL de H}_2.\text{L}^{-1}$ de cultura) foi calculado a partir da equação geral dos gases perfeitos (3). Para

o cálculo foi considerado a pressão de todos os gases do *headspace* dos reatores, para o cálculo da pressão parcial de hidrogênio, e número de mols de hidrogênio.

$$P.V = n.R.T \quad (3)$$

Onde:

- P: pressão do gás de interesse (Pa)
- V: volume (L)
- n: número de mols do gás
- R a constante de gases perfeitos (0,082 mol.K)
- T: temperatura (K).

Para a análise do planejamento fatorial com ponto central e as interações dos fatores testados, da otimização da biomassa na terceira etapa, foi utilizado o software Design Expert.

Os resultados de parâmetros cinéticos, bem como a produtividade e o volume de hidrogênio produzido, de todas as etapas, foram comparados a partir de teste T-Student e por Análise de Variância (ANOVA), seguido do post hoc Teste de Tukey, no software Origin Pro 8.0. Além disso, foram analisados normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias. Para todos os testes estatísticos foi adotado $p < 0,05$ para indicar diferença significativa entre os parâmetros analisados.

5 RESULTADOS

5.1 Primeira etapa

Nesta primeira etapa da pesquisa, primeiramente foram adquiridas as cepas de interesse e posteriormente foram purificadas, pré-selecionadas e caracterizadas quanto ao crescimento e produção de biomassa, pois estes dados iriam auxiliar no desenvolvimento das etapas posteriores da pesquisa.

Posteriormente, antes de iniciar os ensaios de produção de hidrogênio com estas cepas, foram determinadas melhores condições de cultivo, referente ao meio de cultura, radiação e pH que seriam utilizados. Em sequência, estabelecidas as melhores condições de cultivo das cepas, foram realizados teste de metodologia de vias produção de hidrogênio, a biofotólise direta, através da fotossíntese aeróbia e anaeróbia, e biofotólise indireta, sendo esta testada apenas para a cianobactéria.

5.1.1 Cepas adquiridas e selecionadas para o estudo

Inicialmente foram adquiridas as cepas de *Chlamydomonas* spp. e de *Anabaena* spp., através de isolamento, doação e aquisição em bancos de microrganismos e microalgas. Todas as cepas passaram por um processo de axenização, procedimento adotado para evitar a influência da produção ou consumo de hidrogênio por outros microrganismos que não fosse os de interesse.

As cepas, bem como sua origem e as que foram pré-selecionadas para o estudo, estão descritas abaixo, na Tabela 11. Devido ao grande número de cepas e algumas não terem sobrevivido, optou-se por trabalhar com cinco cepas de cada gênero. Primeiramente, foram selecionadas as cepas que foram possíveis axenizar. Desta forma, estabeleceu-se quatro cepas de *Anabaena* spp., ao invés de cinco.

Tabela 11 - Cepas adquiridas e pré-selecionadas

Espécie	Código	Origem	Situação	Selecionadas
<i>Anabaena cylindrica</i>	1403-2	Banco: SAG	não sobreviveu	
<i>Anabaena</i> sp.	12.82			
<i>Anabaena toluosa</i>	26.79			
<i>Anabaena variabilis</i>	1403-4b			
<i>Anabaena inaequalis</i>	1403-10		axênica	X
<i>Anabaena cylindrica</i>	B 629	Banco: UTEX	não axênica	
<i>Anabaena flos-aquae</i>	LB 2558			
	B 1444			X
<i>Anabaena</i> sp.	1448		axênica	X
	2576			X
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CC124	Doação: NREL	axênica	X
	CC425			X
	D66			X
<i>Chlamydomonas moewusii</i>	SAG			
	24.91			X
<i>Chlamydomonas</i> sp.	Ch09	Doação: UFSCar	não axênica	
	Ch255		não sobreviveu	
	Ch-IO	Doação: IO	não axênica	
	N Ch03			X
	N Ch08	Isolamento: Biotace	axênica	
	N Ch09			
	N Ch11			

Bancos: SAG – Sammlung von Algen Kulturen at University of Goettingen; UTEX – Culture Collection of Algae the University of Texas; NREL – National Renewable Energy Laboratory; UFSCar – Coleção de culturas de microalgas de água doce da UFSCar; IO – Banco de microrganismos marinhos do Instituto Oceanográfico da USP; Biotace – Banco de microalgas e cianobactérias do Biotace – EESC/USP.

Quanto à *Chlamydomonas* spp., das 11 cepas, oito foram purificadas, sendo que destas, quatro foram isoladas de um mesmo ambiente (N Ch03; N Ch08; N Ch09; N Ch11), portanto apenas uma delas foi escolhida. As outras quatro cepas foram as doadas pelo National Renewable Energy Laboratory (NREL).

Para a escolha da cepa de *Chlamydomonas* sp. que foi isolada realizou-se testes de crescimento, em meio aeróbio, com sistema semi-aberto e fechado, e em meio anaeróbio. De acordo com estes testes foi possível escolher a cepa que obteve melhor crescimento nas condições testadas, a N Ch03.

Além disso, todas as cepas selecionadas foram testadas quanto ao modo que seriam cultivadas, conforme descrito acima, pois os ensaios de produção de hidrogênio seriam realizados em sistemas fechados para impedir o escape do gás. Todas apresentaram crescimento similar nas diferentes formas de cultivo.

5.1.2 Caracterização do crescimento das cepas e quantificação de biomassa

As cepas pré-selecionadas para o estudo foram caracterizadas quanto ao seu crescimento e produção de biomassa, conforme condições em que estavam sendo mantidas, para que estes resultados pudessem auxiliar os ensaios de melhoramento de cultivo das cepas, planejamento e realização dos ensaios de produção de hidrogênio.

Para tanto, foram elaboradas as curvas de crescimento de cada cepa selecionada, para caracterizar as fases e parâmetros cinéticos de crescimento, e as regressões lineares da densidade óptica (750 nm) com sólidos suspensos totais, para que durante os experimentos posteriores a biomassa de cada cepa pudesse ser estimada por espectrofotometria.

5.1.2.1 Chlamydomonas spp.

De acordo com as leituras espectrofotométricas no comprimento de onda 750 nm, por 11 dias, da cepa CC124 (Figura 8 - A), observou-se que esta espécie apresentou rápido crescimento, permanecendo na fase exponencial até o quarto dia, iniciando posteriormente, a fase estacionária. De acordo com o modelo de Gompertz ($R^2 = 0,987$) encontrou-se para esta cepa velocidade específica de crescimento de $1,41 \text{ dia}^{-1}$, tempo de geração de 0,49 dia, e amplitude de 3,65.

A partir das leituras de absorbância juntamente com os dados de sólidos, referentes à mesma amostra ao longo dos dias, construiu-se a

regressão linear, a qual apresentou R^2 de 0,982 (Figura 8 - B). A biomassa máxima produzida foi de 860 mg.L^{-1} .

Figura 8 - A: Curva de crescimento. B: Regressão linear de sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}) e absorvância (A.U. λ 750 nm), da cepa CC124

A cepa CC425 foi monitorada quanto ao seu crescimento por 14 dias e apresentou fase exponencial do início ao sexto dia e em seguida a fase estacionária (Figura 9 – A). Conforme o modelo de Gompertz ($R^2 = 0,995$) esta cepa apresentou 0,95 dia^{-1} e 0,73 dia, de velocidade específica de crescimento e tempo de geração, respectivamente, e amplitude de 4,21.

Figura 9 - A: Curva de crescimento. B: Regressão linear de sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}) e absorvância (A.U. λ 750 nm), da cepa CC425

Referente à regressão linear de absorvância com a biomassa, R^2 de 0,962 (Figura 9 – B), foi obtido biomassa máxima de 520 mg.L^{-1} . Embora esta cepa tenha μ_{max} e produção de biomassa inferiores ao da cepa CC124,

foi observado que em relação ao crescimento final, amplitude, CC425 foi superior.

A Figura 10 demonstra as curvas de crescimento e regressão linear da cepa D66, a qual se encontrou em fase exponencial até o quinto dia e em seguida, iniciou a fase estacionária até o décimo segundo dia de amostragem. A regressão linear, durante este mesmo período, com amostras equivalentes de absorbância e sólidos apresentou R^2 de 0,984.

Conforme o modelo de Gompertz ($R^2 = 0,988$) obteve-se para esta espécie velocidade específica de crescimento de $1,44 \text{ dia}^{-1}$, tempo de geração de 0,48 dia, e amplitude de 3,65, sendo estes parâmetros semelhantes aos da cepa CC124. Porém, quanto à produção máxima de biomassa, esta cepa atingiu 590 mg.L^{-1} , inferior à biomassa de CC124.

Figura 10 - A: Curva de crescimento. B: Regressão linear de sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}) e absorbância (A.U. λ 750 nm), da cepa D66

Para a cepa SAG 24.91 (Figura 11), embora seja de espécie diferente das cepas anteriores (*C. reinhardtii*), correspondente à *C. moewusii*, observou-se fases de crescimento semelhantes à estas, com fase exponencial até o quarto dia, dando posteriormente início a fase estacionária até o décimo primeiro dia, apesar de ter tido um declínio em seu crescimento do quarto ao sétimo dia, se restabelecendo em seguida. Quanto à regressão linear obteve-se R^2 de 0,985.

Apesar disso, os dados se ajustaram ao modelo de Gompertz ($R^2 = 0,952$) e foi possível estabelecer os parâmetros cinéticos da cepa. A

velocidade específica de crescimento foi de $1,32 \text{ dia}^{-1}$; 0,52 dia, de tempo de geração e 3,35 de amplitude, dados estes semelhantes aos encontrados nas cepas CC124 e D66, embora tenha tido menor produção de biomassa comparado à CC124, 590 mg.L^{-1} .

Figura 11 - A: Curva de crescimento. B: Regressão linear de sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}) e absorbância (A.U. λ 750 nm), da cepa SAG 24.91

Diferente das quatro cepas descritas acima, a cepa N Ch03, isolada de um reservatório, demonstrou crescimento mais lento, com a fase exponencial mais longa, até o décimo segundo dia de amostragem e posteriormente tem-se início a fase estacionária, até o dia 16 (Figura 12 – A).

Além disso, através da curva de regressão linear (Figura 12 – B), a qual apresentou R^2 de 0,985, observou-se que a quantidade de biomassa foi inferior as demais cepas, com máximo de 371 mg.L^{-1} , sendo que a cepa CC124 foi a que se obteve mais biomassa.

Figura 12 - A: Curva de crescimento. B: Regressão linear de sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}) e absorbância (A.U. λ 750 nm), da cepa N Ch 03

O valor de taxa específica de crescimento comprovaram (Gompertz - $R^2 = 0,988$) o observado na curva de crescimento, $0,38 \text{ dia}^{-1}$ e maior tempo de geração, 1,81 dia. Porém, comparando-se a amplitude, N Ch03 foi a que apresentou a segunda maior em relação às demais, atingindo 3,60, demonstrando possível potencial de crescimento, embora tenha baixa velocidade de crescimento.

Comparando todas as cepas de *Chlamydomonas* spp. foi possível prever que a cepa CC124 era a melhor cepa para dar sequência aos testes de condição de cultivo da primeira etapa, devido a maior produção de biomassa. Além disso, possivelmente, poderia ser a melhor produtora de hidrogênio pelo mesmo motivo, embora tenha muitos outros fatores que influenciam na produtividade deste gás.

5.1.2.2 *Anabaena* spp.

Entre as quatro cepas de *Anabaena* spp. pré-selecionadas, não foi possível realizar as curvas de crescimento, modelagem por Gompertz e regressão linear de absorbância com sólidos para caracterizar a cepa 1403-10, devido à esta crescer em grumos e dificultar a leitura da absorbância e a análise de sólidos suspensos totais.

Portanto, optou-se em não realizar ensaios com esta cepa devido à dificuldade de se trabalhar com a sua forma de crescimento, além de possíveis discrepâncias de resultados e erros metodológicos, quanto à quantificação de biomassa, comparando-se com as demais cepas. Ao fim, foram analisadas apenas três cepas de *Anabaena* spp.

Em relação à cepa 1444, pode-se observar que esta espécie permaneceu na fase exponencial tardia até o oitavo dia e posteriormente iniciou a fase estacionária, ao longo de 13 dias de amostragem (Figura 13 – A).

A partir do modelo de Gompertz ($R^2 = 0,993$) foram encontrados os seguintes parâmetros de crescimento: velocidade específica de crescimento de $0,56 \text{ dia}^{-1}$; tempo de geração de 1,25 dia, e amplitude de 2,53,

representado o valor máximo de crescimento. Com a regressão linear entre sólidos e absorbância ($R^2 = 0,975$) observou-se que esta cepa atingiu 347 mg.L^{-1} de biomassa (Figura 13 – B).

Figura 13 - A: Curva de crescimento. B: Regressão linear de sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}) e absorbância (A.U. λ 750 nm), da cepa 1444

A cepa 1448 apresentou crescimento semelhante a cepa anterior, permanecendo em fase exponencial até o oitavo dia de amostragem iniciando, após, a fase estacionária até o 13º dia de amostragem (Figura 14 – A). Em relação aos parâmetros cinéticos de crescimento também foram próximos, sendo que a velocidade específica de crescimento foi de $0,53 \text{ dia}^{-1}$, tempo de geração de 1,30 dia, e amplitude de 2,49, conforme o modelo de Gompertz ($R^2 = 0,993$).

Figura 14 - A: Curva de crescimento. B: Regressão linear de sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}) e absorbância (A.U. λ 750 nm), da cepa 1448

A regressão linear realizada ($R^2 = 0,987$) (Figura 14 – B) entre sólidos e absorbância, durante o mesmo período de amostragem, demonstrou que esta cepa atingiu produção máxima de biomassa de 311 mg.L^{-1} , inferior à cepa 1444, embora tenham apresentado resultados próximos de parâmetros cinéticos.

Em relação à cepa 2576, pode-se observar que esta foi a que apresentou crescimento mais lento quando comparada com as outras duas cepas de *Anabaena* spp. Através da Figura 15, pode-se notar que a fase exponencial tardia permaneceu até o trigésimo segundo dia de amostragem dando início, posteriormente, à fase estacionária até o dia 36 de amostragem.

Figura 15 - A: Curva de crescimento. B: Regressão linear de sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}) e absorbância (A.U. λ 750 nm), da cepa 2576

A partir do modelo de Gompertz ($R^2 = 0,984$) esta cepa obteve velocidade específica de crescimento de $0,18 \text{ dia}^{-1}$; tempo de geração de 3,79 dia, e amplitude de 4,04. Estes dados demonstram velocidade inferior e tempo de duplicação superior às demais cepas deste gênero, provando o crescimento mais lento desta cepa.

Porém, esta foi a cepa que atingiu a maior amplitude, demonstrando maior crescimento e produção de biomassa, de acordo com a regressão linear (Figura 15 – B) ($R^2 = 0,9822$), atingindo máximo de 744 mg.L^{-1} .

Em relação à todas as cepas de *Anabaena* spp. foi possível prever, de acordo com os parâmetros cinéticos de crescimento e produção de

Tabela 12 - Parâmetros cinéticos de crescimento das cepas de *Chlamydomonas* spp. e *Anabaena* spp. selecionadas e caracterizadas

Cepa	Parâmetros				
	$\mu_{\max}$ (dia ⁻¹)	Tg (dia)	Amplitude	Biomassa máxima (mg.L ⁻¹)	Gompertz (R ²)
CC124	1,41	0,49	3,65	860	0,987
CC425	0,95	0,73	4,21	520	0,995
D66	1,44	0,48	3,65	590	0,988
SAG	1,32	0,52	3,35	590	0,952
N Ch03	0,38	1,81	3,60	371	0,988
1444	0,56	1,25	2,53	347	0,993
1448	0,53	1,3	2,49	311	0,993
2576	0,18	3,79	4,04	744	0,987

Chlamydomonas spp.: CC124, CC425, D66, SAG 24.91 e N Ch03. *Anabaena* spp.: 1444, 1448 e 2576.

Porém, esta foi apenas uma hipótese do que poderia ocorrer nas etapas subsequentes, bem como possíveis fatores que poderiam estar envolvidos com a eficiência das cepas na produção de hidrogênio, pois são vários fatores que devem ser levados em consideração na produção deste gás, como por exemplo, a influência das variáveis físico-químicas.

5.1.3 Testes de condição de cultivo

Com as cepas selecionadas foram testados o meio de cultura, pH e intensidade de radiação, para averiguar qual a melhor condição de crescimento das espécies e dar sequência aos testes de via de produção de hidrogênio, e segunda etapa do projeto, com o objetivo de melhorar a produção de biomassa e, conseqüentemente, a produtividade de hidrogênio.

5.1.3.1 Meios de cultura

Devido ao objetivo do trabalho, conforme já mencionado no levantamento bibliográfico, é importante que o meio de cultura tenha em sua composição uma fonte de carbono orgânico, pois quando os ensaios

estiverem na segunda fase experimental (produção de hidrogênio) este componente será essencial para a sobrevivência dos organismos.

As cepas doadas de *Chlamydomonas* spp. do NREL e as isoladas foram mantidas em meio TAP. Considerando-se que o TAP é um meio específico para o cultivo deste gênero, possui o ácido acético como fonte de carbono orgânico, e meio utilizado mundialmente nas pesquisas e referenciado, optou-se em utilizá-lo em todos os ensaios de produção de hidrogênio, bem como para a manutenção das cepas de *Chlamydomonas* spp.

Quanto à *Anabaena* spp., foram adquiridas cepas mantidas em BG-11, que possui baixa concentração de carbono orgânico, o ácido cítrico, comparado ao TAP (seção 4.1.6). Portanto, optou-se em testar o BG-11, bem como o ASM-1, utilizado também para o cultivo de cianobactérias, com diferentes fontes carbono.

Para tanto, foram testados os padrões destes dois meios de cultivo, e estes com a adição de glicose, ácido acético e ácido cítrico, em concentração equivalente à concentração de átomos de carbono do TAP, com todas as cepas deste gênero selecionadas.

Foi observado que em duas cepas, das três testadas, 1444 (Figura 17) e 1448 (Figura 18), os melhores crescimentos foram no meio BG-11 com a adição de glicose, e de acordo com a Tabela 13 vê-se que os melhores rendimentos também ocorreram neste meio, o que comprova o melhor crescimento. Não houve crescimento destas duas cepas no meio de cultura BG-11 com adição de ácido cítrico, e a cepa 1448 também não sobreviveu no meio ASM-1 com adição de ácido cítrico.

O rendimento da cepa 1444 foi de $0,240 \pm 0,004$ e da cepa 1448 de $0,299 \pm 0,011$ no meio de cultura BG-11 com a adição de glicose, sendo que estes apresentaram diferença significativa com todos os outros meios de cultura. Apenas não houve diferença entre o meio BG-11 com glicose com o meio ASM-1, também com adição de glicose, para a cepa 1448 (Tabela 13).

Figura 17 - Curvas de crescimento (A.U. λ 750 nm) da cepa 1444 de *Anabaena* sp. nos diferentes meios de cultura

ASM + gl – ASM-1 + glicose; ASM + aa – ASM-1 + ácido acético; ASM + ac – ASM-1 + ácido cítrico; BG + gl – BG-11 + glicose; BG + aa – BG-11 + ácido acético; BG + ac – BG-11 + ácido cítrico. Barras indicam desvio padrão (n=3).

Figura 18 - Curvas de crescimento (A.U. λ 750 nm) da cepa 1448 de *Anabaena* sp. nos diferentes meios de cultura

ASM + gl – ASM-1 + glicose; ASM + aa – ASM-1 + ácido acético; ASM + ac – ASM-1 + ácido cítrico; BG + gl – BG-11 + glicose; BG + aa – BG-11 + ácido acético; BG + ac – BG-11 + ácido cítrico. Barras indicam desvio padrão (n=3).

Tabela 13 - Média e desvio padrão dos rendimentos de crescimento (absorbância) das cepas de *Anabaena* spp. nos diferentes meios de cultura

Meio / Cepa	1444	1448	2576
ASM	0,117 ± 0,011	0,156 ± 0,011	0,106 ± 0,005 ^f
ASM + gl	0,198 ± 0,009 ^a	0,262 ± 0,013 ^a	0,136 ± 0,005 ^g
ASM + aa	0,160 ± 0,026 ^b	0,187 ± 0,010	0,105 ± 0,008 ^h
ASM + ac	0,125 ± 0,013	-	-
BG	0,142 ± 0,005	0,168 ± 0,036	0,066 ± 0,006
BG + gl	0,240 ± 0,004 ^c	0,299 ± 0,011 ^e	0,058 ± 0,007
BG + aa	0,161 ± 0,005 ^d	0,201 ± 0,014	0,101 ± 0,003 ⁱ
BG + ac	-	-	-

ASM + gl – ASM-1 + glicose; ASM + aa – ASM-1 + ácido acético; ASM + ac – ASM-1 + ácido cítrico; BG + gl – BG-11 + glicose; BG + aa – BG-11 + ácido acético; BG + ac – BG-11 + ácido cítrico. Letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$):

a: diferença significativa entre o tratamento ASM + gl com: ASM; ASM + aa; ASM + ac; BG; BG + aa.

b: diferença significativa entre o tratamento ASM + aa com: ASM.

c: diferença significativa entre o tratamento BG + gl com: ASM; ASM + gl; ASM + aa; ASM + ac; BG; BG + aa.

d: diferença significativa entre o tratamento ASM + gl com: ASM; ASM + ac.

e: diferença significativa entre o tratamento BG + gl com: ASM; ASM + aa; ASM + ac; BG; BG + aa.

f: diferença significativa entre o tratamento ASM com: BG; BG + gl.

g: diferença significativa entre o tratamento ASM + gl com: ASM; ASM + aa; BG; BG + gl; BG + aa.

h: diferença significativa entre o tratamento ASM + aa com: BG; BG + gl.

i: diferença significativa entre o tratamento BG + aa com: BG; BG + gl.

Em relação às velocidades específicas de crescimento ($\mu_{\max}$) (Tabela 14) e tempos de geração (T_g) (Tabela 15), também pode-se notar melhores resultados para estas duas cepas no meio de cultura BG-11 com a adição de glicose.

A $\mu_{\max}$ da cepa 1444 neste tratamento foi de $0,197 \pm 0,01$, embora não tenha tido diferença estatística quanto à este parâmetro desta cepa quando foi adicionado ácido acético nos dois meios de cultura. Para a cepa 1448 a $\mu_{\max}$ foi de $0,280 \pm 0,05$, não tendo diferença significativa com os demais tratamentos, exceto com o meio BG-11 com a adição de ácido acético.

O T_g (Tabela 15) corrobora com estes resultados, pois para a cepa 1444, este parâmetro foi significativamente menor no meio de cultura BG-11 com glicose, com $3,48 \pm 0,15$, em relação aos demais tratamentos, exceto nos meios em que foi adicionado o ácido acético.

Tabela 14 - Média e desvio padrão das velocidades específicas de crescimento (μ_{max}) (dia^{-1}) das cepas de *Anabaena* spp. nos diferentes meios de cultura

Meio / Cepa	1444	1448	2576
ASM	0,100 $\pm$ 0,02	0,140 $\pm$ 0,0	0,147 $\pm$ 0,01
ASM + gl	0,120 $\pm$ 0,01	0,180 $\pm$ 0,0	0,163 $\pm$ 0,006
ASM + aa	0,153 $\pm$ 0,04	0,143 $\pm$ 0,006	0,157 $\pm$ 0,01
ASM + ac	0,113 $\pm$ 0,006	0,105 $\pm$ 0,007	-
BG	0,110 $\pm$ 0,02	0,207 $\pm$ 0,04 ^c	0,170 $\pm$ 0,06
BG + gl	0,197 $\pm$ 0,01 ^a	0,280 $\pm$ 0,05 ^d	0,167 $\pm$ 0,03
BG + aa	0,157 $\pm$ 0,01 ^b	0,243 $\pm$ 0,006 ^e	0,227 $\pm$ 0,05
BG + ac	-	-	-

ASM + gl – ASM-1 + glicose; ASM + aa – ASM-1 + ácido acético; ASM + ac – ASM-1 + ácido cítrico; BG + gl – BG-11 + glicose; BG + aa – BG-11 + ácido acético; BG + ac – BG-11 + ácido cítrico. Letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$):

a: diferença significativa entre o tratamento BG + gl com: ASM; ASM + gl; ASM + ac; BG.

b: diferença significativa entre o tratamento BG + aa com: ASM.

c: diferença significativa entre o tratamento BG com: ASM + ac.

d: diferença significativa entre o tratamento BG + gl com: ASM; ASM + gl; ASM + aa; ASM + ac; BG.

e: diferença significativa entre o tratamento BG + aa com: ASM; ASM + aa; ASM + ac.

Tabela 15 - Média e desvio padrão dos tempos de geração (Tg) (dia) das cepas de *Anabaena* spp. nos diferentes meios de cultura

Meio / Cepa	1444	1448	2576
ASM	7,14 $\pm$ 1,15	5,01 $\pm$ 0,04	4,72 $\pm$ 0,39
ASM + gl	5,93 $\pm$ 0,57	3,86 $\pm$ 0,09 ^d	4,30 $\pm$ 0,13
ASM + aa	4,78 $\pm$ 1,19 ^a	4,87 $\pm$ 0,14	4,48 $\pm$ 0,42
ASM + ac	6,17 $\pm$ 0,29	-	-
BG	6,28 $\pm$ 1,20	3,44 $\pm$ 0,72 ^e	4,47 $\pm$ 1,67
BG + gl	3,48 $\pm$ 0,15 ^b	2,51 $\pm$ 0,42 ^f	4,34 $\pm$ 0,79
BG + aa	4,51 $\pm$ 0,48 ^c	2,86 $\pm$ 0,08 ^g	3,14 $\pm$ 0,57
BG + ac	-	-	-

ASM + gl – ASM-1 + glicose; ASM + aa – ASM-1 + ácido acético; ASM + ac – ASM-1 + ácido cítrico; BG + gl – BG-11 + glicose; BG + aa – BG-11 + ácido acético; BG + ac – BG-11 + ácido cítrico. Letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$):

a: diferença significativa entre o tratamento ASM + aa com: ASM.

b: diferença significativa entre o tratamento BG + gl com: ASM; ASM + gl; ASM + ac; BG.

c: diferença significativa entre o tratamento BG + aa com: ASM.

d: diferença significativa entre o tratamento ASM + gl com: ASM.

e: diferença significativa entre o tratamento BG com: ASM; ASM + aa.

f: diferença significativa entre o tratamento BG + gl com: ASM; ASM + gl; ASM + aa.

g: diferença significativa entre o tratamento BG + aa com: ASM; ASM + aa.

Quanto à cepa 1448 apresentou Tg significativamente menor em todas os tratamentos com BG-11 comparado à todos os de ASM-1. Porém o

meio BG-11 com adição de glicose demonstrou Tg de $2,51 \pm 0,42$ dia, sendo o menor comparado estatisticamente aos demais meios, embora não tenha tido diferença quanto à este parâmetro com o BG-11 com adição de ácido acético.

O mesmo não ocorreu com a cepa 2576 (Figura 19), pois não obteve o melhor crescimento no mesmo meio de cultura que as cepas 1444 e 1448. Nos dois meios de cultura testados com a adição de ácido cítrico a cepa não sobreviveu.

Em relação ao rendimento de crescimento (Tabela 13), o tratamento que apresentou melhor resultado foi o meio de cultura ASM-1 com adição de glicose, $0,136 \pm 0,005$, sendo este significativamente maior comparado à todos os tratamentos. Além disso, é possível observar que esta cepa apresentou melhor desempenho com o meio de cultura ASM-1, pois todos os tratamentos deste meio apresentaram rendimento significativamente maior comparado aos tratamentos com BG-11, exceto quando neste foi adicionado ácido acético.

Figura 19 - Curvas de crescimento (A.U. λ 750 nm) da cepa 2576 de *Anabaena* sp. nos diferentes meios de cultura.

ASM + gl – ASM-1 + glicose; ASM + aa – ASM-1 + ácido acético; ASM + ac – ASM-1 + ácido cítrico; BG + gl – BG-11 + glicose; BG + aa – BG-11 + ácido acético; BG + ac – BG-11 + ácido cítrico. Barras indicam desvio padrão (n=3).

Porém, quanto aos parâmetros cinéticos de crescimento, estes foram semelhantes em todos os tratamentos, não havendo diferença significativa na $\mu_{\max}$ e T_g entre os meios de cultura testados (Tabelas 14 e 15).

Portanto, de acordo com estes resultados, optou-se em manter as cepas e realizar os experimentos das etapas subsequentes, com o meio BG-11 com a adição de glicose, na mesma concentração que o ácido acético no meio TAP para *Chlamydomonas* spp. Fez-se esta opção porque as cepas 1444 e 1448 tiveram melhor crescimento neste tratamento. Além disso, estas duas cepas apresentaram características de crescimento (seção 5.1.2) melhores quando comparadas a 2576, e esta não apresentou diferença significativa quanto aos parâmetros de crescimento nos diferentes tratamentos.

5.1.3.2 Testes de pH e intensidade de radiação

Foi realizado um planejamento fatorial para testar as variáveis pH e intensidade de radiação, em cinco diferentes níveis, para averiguar qual a condição de melhor crescimento quanto à estes fatores. Os níveis de pH testados foram 6,2, 7,2, 8,2, 9,2 e 10,2, enquanto que as radiações foram de 15, 60, 100, 150 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Com todos os parâmetros cinéticos de crescimento foram verificadas as diferenças estatísticas entre os diferentes pH para cada radiação.

Para tanto, foi escolhida uma cepa de cada gênero para o planejamento fatorial, de modo que os melhores resultados foram aplicados para todas as cepas na etapa subsequente, de testes de produção de hidrogênio e segunda etapa do projeto, evitando assim o excesso de ensaios.

Para este teste com *Chlamydomonas* sp. foi escolhida a cepa CC124 e com *Anabaena* sp. a cepa 1448. Decidiu-se por estas cepas para representar os gêneros neste planejamento por serem as que apresentaram melhor desempenho de crescimento e biomassa de acordo com os resultados anteriores.

5.1.3.2.1 *Chlamydomonas* sp.

De acordo com o planejamento fatorial com a cepa CC124, *C. reinhardtii*, e com os resultados obtidos, demonstrou-se que esta cepa cresce semelhantemente nos pHs 6,2, 7,2 e 8,2, independente da radiação a que está exposta, conforme a demonstração das curvas de crescimento (Figuras 20, 21, 22, 23 e 24, representando as radiações 15, 60, 100, 150 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente).

Em pH 9,2 houve diminuição do crescimento, e em pH 10,2 ocorreu declínio ainda maior, havendo até mesmo senescência em alguns casos, como ocorreu nas intensidades 60, 100 e 150 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, nas quais não puderam ser relatados os resultados da triplicata.

Os valores do rendimento de crescimento (Tabela 16) corroboram com o apresentado nas curvas de crescimento quando se compara os resultados entre os diferentes pH em cada radiação, sendo que em todas elas o rendimento foi significativamente maior nos pH 6,2, 7,2 e 8,2, comparado aos dos pH 9,2 e 10,2, com uma única exceção na radiação de 60 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, na qual não houve diferença entre o obtido em pH 8,2 e em 9,2.

Em todas radiações o maior rendimento ocorreu em pH 6,2 e o menor em pH 10,2. Embora não tenha diferença entre os rendimentos nos pH 6,2, 7,2 e 8,2, foi observado nas intensidades 60, 100, 150 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Figuras 21, 22, 23 e 24) que ao entrar na fase estacionária, em torno do quinto dia, houve uma queda na absorbância, o que explica o menor rendimento destas comparado à radiação de 15 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Na sequência da menor para maior radiação, os maiores e menores rendimentos (A.U. λ 750 nm) obtidos (Tabela 16), respectivamente, foram: $1,24 \pm 0,06$ e $0,39 \pm 0,02$; $1,12 \pm 0,02$ e $0,33 \pm 0,16$; $1,14 \pm 0,03$ e $0,11 \pm 0,03$; $1,07 \pm 0,02$ e $0,28 \pm 0,009$; e $1,03 \pm 0,03$ e $0,21 \pm 0,08$.

Tabela 16 - Média e desvio padrão dos rendimentos de crescimento (A.U. λ 750 nm) da cepa CC124

pH / Luz	15	60	100	150	200
6,2	$1,24 \pm 0,06^a$	$1,12 \pm 0,02^a$	$1,14 \pm 0,03^a$	$1,07 \pm 0,02^a$	$1,03 \pm 0,03^a$
7,2	$1,22 \pm 0,06^a$	$1,11 \pm 0,02^a$	$1,06 \pm 0,04^a$	$0,98 \pm 0,04^a$	$0,97 \pm 0,06^a$
8,2	$1,22 \pm 0,06^a$	$1,05 \pm 0,07^c$	$0,94 \pm 0,05^a$	$0,95 \pm 0,04^a$	$0,88 \pm 0,02^a$
9,2	$0,65 \pm 0,03^b$	$0,70 \pm 0,24$	$0,64 \pm 0,17^b$	$0,60 \pm 0,27$	$0,40 \pm 0,12$
10,2	$0,39 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,16$	$0,11 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,009$	$0,21 \pm 0,08$

Luz indica radiação em $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$):

a: Não há diferença estatísticas entre os pH 6,2, 7,2 e 8,2. Diferença significativa entre estes pH com o 9,2 e 10,2.

b: Diferença significativa entre os pH 9,2 e 10,2.

c: Não há diferença estatísticas entre os pH 6,2, 7,2 e 8,2. Diferença significativa entre o pH 8,2 com 10,2.

Figura 20 - Curvas de crescimento (A.U. λ 750 nm), barras indicam desvio padrão ($n=3$), da cepa CC124 em diferentes pH e radiação de $15 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Além da semelhança das curvas de crescimento e rendimento entre os três menores pH, o mesmo pode ser observado com as μ_{max} , em que não houve diferença significativa entre eles nas radiações de 15, 60 e 100 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Tabelas 17), e com os Tg (Tabela 18), em todas as intensidades.

Figura 21 - Curvas de crescimento (A.U. λ 750 nm), barras indicam desvio padrão (n=3), da cepa CC124 em diferentes pH e radiação de $60 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Figura 22 - Curvas de crescimento (A.U. λ 750 nm), barras indicam desvio padrão (n=3), da cepa CC124 em diferentes pH e radiação de $100 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Nas duas maiores radiações, pode-se observar que as maiores velocidades específicas de crescimento, com diferença significativa, ocorreram apenas nos pH 6,2 e 7,2, e não houve diferença entre eles. Nos demais pH houve diferença estatística nestas intensidades em todas as condições testadas.

Em todas as radiações, o pH 9,2 e 10,2 apresentaram menor $\mu_{\max}$ e maior Tg comparado aos outros pH. A exceção foi observada no Tg das radiações de 15 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, que não houve diferença entre o pH 9,2 com os outros três menores.

Figura 23 - Curvas de crescimento (A.U. λ 750 nm), barras indicam desvio padrão (n=3), da cepa CC124 em diferentes pH e radiação de 150 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Figura 24 - Curvas de crescimento (A.U. λ 750 nm), barras indicam desvio padrão (n=3), da cepa CC124 em diferentes pH e radiação de 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Embora os resultados quanto aos parâmetros de crescimento tenham sido semelhantes nos três menores pH, foi possível observar que as maiores $\mu_{\max}$ (Tabela 17) e menores Tg (Tabela 18), ocorreram no pH 7,2, embora não houvesse diferença significativa com o pH 6,2 e 8,2, de maneira geral, os dados demonstram melhores resultados no pH 7,2 independente da radiação.

Tabela 17 - Média e desvio padrão da $\mu_{\max}$ (dia⁻¹) da cepa CC124 em diferentes pH e radiações

pH / Luz	15	60	100	150	200
6,2	1,73 ± 0,05 ^a	2,29 ± 0,22 ^a	1,91 ± 0,13 ^a	2,68 ± 0,1 ^c	3,65 ± 0,3 ^g
7,2	1,8 ± 0,12 ^a	2,34 ± 0,07 ^a	2,14 ± 0,16 ^a	2,79 ± 0,31 ^d	3,71 ± 0,18 ^d
8,2	1,65 ± 0,05 ^a	1,94 ± 0,25 ^a	1,93 ± 0,08 ^a	2,19 ± 0,11 ^e	2,71 ± 0,15 ^e
9,2	1,03 ± 0,02 ^b	0,84 ± 0,13	0,74 ± 0,39	1,21 ± 0,14 ^f	1,46 ± 0,38 ^f
10,2	0,39 ± 0,06	0,62	0,4	0,57	0,71 ± 0,23

Luz indica radiação em $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$):

a: Não há diferença estatísticas entre os pH 6,2, 7,2 e 8,2. Diferença significativa entre estes pH com o 9,2 e 10,2.

b: Diferença significativa entre os pH 9,2 e 10,2.

c: Diferença significativa entre o pH 6,2 com 9,2 e 10,2.

d: Diferença significativa entre o pH 7,2 com 6,2, 8,2, 9,2 e 10,2.

e: Diferença significativa entre o pH 8,2 com 6,2, 7,2, 9,2 e 10,2.

f: Diferença significativa entre o pH 9,2 com 6,2, 7,2, 8,2 e 10,2.

g: Diferença significativa entre o pH 6,2 com 8,2, 9,2 e 10,2.

Tabela 18 - Média e desvio padrão dos Tg (dia) da cepa CC124 em diferentes pH e radiações

pH / Luz	15	60	100	150	200
6,2	0,40 ± 0,01 ^a	0,30 ± 0,03 ^b	0,36 ± 0,03 ^d	0,26 ± 0,01 ^b	0,19 ± 0,02 ^a
7,2	0,39 ± 0,02 ^a	0,30 ± 0,01 ^b	0,33 ± 0,02 ^{d,e}	0,25 ± 0,03 ^b	0,19 ± 0,01 ^a
8,2	0,42 ± 0,02 ^a	0,36 ± 0,05 ^b	0,36 ± 0,02 ^d	0,32 ± 0,02 ^b	0,26 ± 0,02 ^a
9,2	0,68 ± 0,02 ^a	0,84 ± 0,13 ^c	1,15 ± 0,63	0,58 ± 0,07 ^c	0,50 ± 0,14 ^a
10,2	1,83 ± 0,3	1,12	1,72	1,22	1,09 ± 0,35

Luz indica radiação em $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$):

a: Não há diferença estatísticas entre os pH 6,2, 7,2, 8,2 e 9,2. Diferença significativa entre estes pH com o 10,2.

b: Não há diferença estatísticas entre os pH 6,2, 7,2 e 8,2. Diferença significativa entre estes pH com o 9,2 e 10,2.

c: Diferença significativa entre o pH 9,2 com 10,2.

d: Não há diferença estatísticas entre os pH 6,2, 7,2, 8,2. Diferença significativa entre estes pH com o 10,2.

e: Diferença significativa entre o pH 7,2 com 9,2.

Além disso, comparando estes mesmos parâmetros quanto à radiação, observou-se que em todos os pH testados, as maiores $\mu_{\max}$ e menores Tg ocorreram em $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Porém, o rendimento de crescimento não foi maior na maior intensidade, provavelmente devido à queda de absorvância ao iniciar a fase estacionária.

O que comprova estes resultados encontrados quanto aos parâmetros de crescimento para a melhor condição de cultivo desta cepa é a análise do planejamento fatorial no Design Expert (Figura 25). A partir desta análise observou-se que há uma interação entre as variáveis radiação e pH, com os melhores níveis encontrados em pH 7,2 na radiação $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, embora o pH 6,2 nesta mesma intensidade tenha sido muito semelhante.

Figura 25 - Interação das variáveis pH e radiação ($\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), com barras indicando desvio padrão (n=3), da cepa CC124

Portanto, de acordo com estes resultados, optou-se em dar sequência as etapas da pesquisa utilizando-se pH 7,2 e $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Para tanto, posteriormente, todas as cepas de *Chlamydomonas* sp. selecionadas

foram testadas nestas condições para averiguar se conseguiriam se desenvolver, obtendo-se resultado positivo para todas as cepas.

5.1.3.2.2 *Anabaena* sp.

A partir do resultado dos testes de meio de cultura com fonte de carbono orgânico e a opção do uso de BG-11 com adição de glicose, realizou-se o planejamento fatorial para melhor condição de crescimento quanto ao pH e radiação com a cepa 1448, *Anabaena* sp.

A partir das curvas de crescimento da cepa nos diferentes pH testados em cada radiação (Figuras 26, 27, 28, 29 e 30, representando as radiações 15, 60, 100, 150 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente), foi possível observar que o crescimento da cepa foi muito semelhante nos pH 9,2 e 10,2, havendo até mesmo sobreposição das curvas em alguns casos, como nas intensidades de 60 e 100 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Enquanto que nos demais pH, o crescimento foi inferior, principalmente em 6,2 e 7,2.

Figura 26 - Curvas de crescimento (A.U. λ 750 nm), barras indicam desvio padrão ($n=3$), da cepa 1448 em diferentes pH e radiação de 15 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Os resultados de rendimento de crescimento em absorbância (Tabela 19) corroboram com o apresentado nas curvas de crescimento, pois não houve diferença significativa entre os pH 9,2 e 10,2 em nenhuma radiação.

Tabela 19 - Média e desvio padrão dos rendimentos de crescimento (A.U. λ 750 nm) da cepa 1448

pH / Luz	15	60	100	150	200
6,2	0,39 $\pm$ 0,04	0,31 $\pm$ 0,06	0,38 $\pm$ 0,005	0,38 $\pm$ 0,07	0,36 $\pm$ 0,07
7,2	0,45 $\pm$ 0,001	0,46 $\pm$ 0,01 ^b	0,46 $\pm$ 0,04	0,39 $\pm$ 0,06	0,47 $\pm$ 0,03
8,2	0,53 $\pm$ 0,04	0,60 $\pm$ 0,02 ^c	0,63 $\pm$ 0,02 ^c	0,63 $\pm$ 0,02 ^c	0,64 $\pm$ 0,02 ^c
9,2	0,72 $\pm$ 0,04 ^a	0,74 $\pm$ 0,05 ^a	0,82 $\pm$ 0,06 ^a	0,86 $\pm$ 0,03 ^a	0,87 $\pm$ 0,03 ^a
10,2	0,71 $\pm$ 0,02 ^a	0,76 $\pm$ 0,03 ^a	0,82 $\pm$ 0,01 ^a	0,85 $\pm$ 0,14 ^a	0,78 $\pm$ 0,05 ^a

Luz indica radiação em $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$):

a: Não há diferença estatísticas entre os pH 9,2 e 10,2. Diferença significativa entre estes pH com 6,2, 7,2 e 8,2.

b: Diferença significativa entre o pH 7,2 com 6,2.

c: Diferença significativa entre o pH 8,2 com 6,2 e 7,2.

Os rendimentos, em ordem crescente quanto a radiação no pH 9,2 foram: $0,72 \pm 0,04$; $0,74 \pm 0,05$; $0,82 \pm 0,06$; $0,86 \pm 0,03$; e $0,87 \pm 0,03$. Em quanto que no pH 10,2, na mesma sequência foram: $0,71 \pm 0,02$; $0,76 \pm 0,03$; $0,82 \pm 0,01$; $0,85 \pm 0,14$; e $0,78 \pm 0,05$ (A.U. λ 750 nm).

Figura 27 - Curvas de crescimento (A.U. λ 750 nm), barras indicam desvio padrão ($n=3$), da cepa 1448 em diferentes pH e radiação de $60 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Figura 28 - Curvas de crescimento (A.U. λ 750 nm), barras indicam desvio padrão ($n=3$), da cepa 1448 em diferentes pH e radiação de $100 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Em relação aos parâmetros cinéticos de crescimento, também foi possível comprovar o melhor desempenho desta cepa em valores de pH mais elevados. Em todas as radiações não houve diferença das μ_{max} (Tabela 20) e T_g (Tabela 21) entre pH 8,2, 9,2 e 10,2, e estes, na maioria dos casos, foram diferentes dos pH 6,2 e 7,2. A exceção ocorreu para a μ_{max} na menor radiação, em que houve diferença em pH 9,2, sendo este significativamente maior ($0,78 \pm 0,15$) comparado aos demais pH.

Figura 29 - Curvas de crescimento (A.U. λ 750 nm), barras indicam desvio padrão ($n=3$), da cepa 1448 em diferentes pH e radiação de $150 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Figura 30 - Curvas de crescimento (A.U. λ 750 nm), barras indicam desvio padrão (n=3), da cepa 1448 em diferentes pH e radiação de $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Embora não tenha havido diferenças estatísticas quanto à estes parâmetros de crescimento entre os três maiores valores de pH, é importante ressaltar que em todas as radiações, os resultados de rendimento (Tabela 19) e as curvas de crescimento (Figuras 26, 27, 28, 29 e 30) apresentaram menor crescimento em pH 8,2 em relação a 9,2 e 10,2.

Tabela 20 - Média e desvio padrão da μ_{max} (dia^{-1}) da cepa 1448 em diferentes pH e radiações

pH / Luz	15	60	100	150	200
6,2	$0,32 \pm 0,09$	$0,30 \pm 0,17$	$0,39 \pm 0,04$	$0,39 \pm 0,05$	$0,27 \pm 0,1$
7,2	$0,32 \pm 0,00$	$0,44 \pm 0,01$	$0,45 \pm 0,05$	$0,41 \pm 0,08$	$0,41 \pm 0,07^e$
8,2	$0,50 \pm 0,02^a$	$0,66 \pm 0,04^c$	$0,73 \pm 0,01^d$	$0,67 \pm 0,01^d$	$0,67 \pm 0,03^d$
9,2	$0,78 \pm 0,05^b$	$0,83 \pm 0,11^d$	$0,72 \pm 0,05^d$	$0,75 \pm 0,03^d$	$0,7 \pm 0,02^d$
10,2	$0,54 \pm 0,03$	$0,75 \pm 0,17^d$	$0,74 \pm 0,05^d$	$0,68 \pm 0,03^d$	$0,65 \pm 0,03^d$

Luz indica radiação em $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$):

a: Diferença significativa entre o pH 8,2 com 6,2 e 7,2.

b: Diferença significativa entre o pH 9,2 com 6,2, 7,2, 8,2 e 10,2.

c: Não há diferença estatísticas entre os pH 8,2, 9,2 e 10,2. Diferença significativa entre o pH 8,2 com 6,2

d: Não há diferença estatísticas entre os pH 8,2, 9,2 e 10,2. Diferença significativa entre estes pH com 6,2 e 7,2.

e: Diferença significativa entre o pH 7,2 com 6,2.

Em relação aos valores de pH 6,2 e 7,2 não se observou diferenças estatísticas quanto à estes parâmetros em todas as radiações. Exceto com a

$\mu_{\max}$ e Tg na radiação de $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, em que o desempenho em pH 7,2 foi melhor ($0,41 \pm 0,07 \text{ dia}^{-1}$ e $1,70 \pm 0,30 \text{ dia}$, respectivamente) e também o Tg em $100 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($1,55 \pm 0,14 \text{ dia}$).

Tabela 21 - Média e desvio padrão do Tg (dia) da cepa 1448 em diferentes pH e radiações

pH / Luz	15	60	100	150	200
6,2	$2,27 \pm 0,61$	$2,72 \pm 1,51$	$1,82 \pm 0,16$	$1,80 \pm 0,23$	$2,71 \pm 0,98$
7,2	$2,16 \pm 0,00$	$1,57 \pm 0,01$	$1,55 \pm 0,14^c$	$1,74 \pm 0,32$	$1,70 \pm 0,3^d$
8,2	$1,37 \pm 0,06^a$	$1,05 \pm 0,05^b$	$0,95 \pm 0,01^a$	$1,04 \pm 0,01^a$	$1,04 \pm 0,04^d$
9,2	$0,89 \pm 0,05^a$	$0,84 \pm 0,11^b$	$0,96 \pm 0,06^a$	$0,92 \pm 0,04^a$	$1,00 \pm 0,03^d$
10,2	$1,30 \pm 0,08^a$	$0,93 \pm 0,02^b$	$0,94 \pm 0,06^a$	$1,02 \pm 0,04^a$	$1,07 \pm 0,05^d$

Luz indica radiação em $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$):

a: Não há diferença estatísticas entre os pH 8,2, 9,2 e 10,2. Diferença significativa entre estes pH com 6,2 e 7,2.

b: Não há diferença estatísticas entre os pH 8,2, 9,2 e 10,2. Diferença significativa entre estes pH com 6,2.

c: Diferença significativa entre o pH 7,2 com 6,2.

d: Não há diferença estatísticas entre os pH 7,2, 8,2, 9,2 e 10,2. Diferença significativa entre estes pH com 6,2.

Ao observar à radiação, não houve padrão em qual delas o crescimento foi melhor, pois quanto aos parâmetros cinéticos de crescimento nas melhores condições de pH de todas as intensidades, houve melhores resultados em $60 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, porém os melhores rendimentos de biomassa nestes mesmos pH ocorreram em radiação de maior intensidade.

Portanto, fazendo a análise do planejamento fatorial quanto aos fatores testados em relação à velocidade de crescimento no Design Expert (Figura 31), foi observado que houve interação entre a radiação e o pH, demonstrando os melhores resultados na interação do pH 9,2 em $60 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, corroborando com os resultados anteriores.

Optou-se em realizar os experimentos das etapas subsequentes, juntamente com o meio de cultura selecionado, com o pH 9,2 e $60 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Embora não tenha existido diferença estatística significativa nos parâmetros cinéticos em pH 8,2 e 10,2, foi o pH 9,2 que apresentou melhor desempenho, além de demonstrar maior rendimento

comparado ao pH 8,2, e a análise de interação dos fatores ter se apresentado como a melhor condição.

Figura 31 - Interação das variáveis pH e radiação ($\mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.s^{-1}$), com barras indicando desvio padr\~ao ($n=3$), da cepa 1448

Ao fim, todas as cepas de *Anabaena* sp. selecionadas foram testadas nas condições estabelecidas para averiguar se teriam um bom desempenho em seus crescimentos, obtendo-se resultados positivos.

5.1.4 Testes de produção de hidrogênio

A produção de hidrogênio por microalgas e cianobactérias pode ocorrer em sistemas aeróbios ou anaeróbios. O grande desafio é controlar a produção de oxigênio por estes organismos, liberado durante a fotossíntese, pois este gás inibe a enzima hidrogenase a produção de hidrogênio, apesar de ocorrer a produção rapidamente.

Para maior confiabilidade na pesquisa e antes de iniciar os ensaios de produção de hidrogênio da segunda etapa, todas as cepas foram testadas quanto ao modo como seriam cultivadas, em condição aeróbia e anaeróbia,

para averiguar qual a via de produção de hidrogênio mais adequada à ser seguida para se obter melhores resultados.

Como já mencionado na seção 4.1.7, não houve variação de fatores físico-químicos, os testes foram realizados conforme as condições estabelecidas nos testes de condição de cultivo, sem triplicata, apenas para aperfeiçoamento do método e decisão da via metabólica nos ensaios, aeróbio ou anaeróbio.

5.1.4.1 *Chlamydomonas* spp.

Foram testadas todas as cepas de *Chlamydomonas* spp. em meio de cultivo aeróbio, via biofotólise direta aeróbia, inclusive as que não foram selecionadas anteriormente, para averiguar se alguma cepa com potencial não estaria sendo previamente eliminada.

As cepas N Ch08, N Ch09, N Ch11, N Ch12, não apresentaram bom crescimento em sistema fechado, apesar de aeróbio, e a produção de hidrogênio foi abaixo do limite de detecção, talvez devido à pequena quantidade de biomassa.

Este resultado contribuiu para confirmar as cepas que haviam sido selecionadas para a segunda etapa da pesquisa, e, além disso, estas apresentaram um pico na produção de hidrogênio nesta condição testada (Figura 32), no 9º dia de ensaio para as cepas CC124, D66 e SAG 24.91 (1,20; 0,49; e 3,04 mmol.L⁻¹, respectivamente), enquanto que este pico ocorreu no 18º dia com a cepa CC425 (2,26 mmol.L⁻¹) e no 20º dia com a N Ch03 (4,13 mmol.L⁻¹). Após este pico houve queda na produção e consumo de hidrogênio.

De acordo com estes resultados foram calculadas as produtividades de hidrogênio obtidas nestes picos. Embora a maior produção tenha ocorrido com a cepa isolada no laboratório Biotace, N Ch03, ela foi tardia, portanto, a maior produtividade foi da cepa SAG 24.91, com 14,08 μmol.L⁻¹.h⁻¹, enquanto que da cepa N Ch03 foi de 8,61 μmol.L⁻¹.h⁻¹, sendo esta a segunda maior produtividade obtida.

As cepas CC124, CC425 e D66 apresentaram produtividades de 5,58, 5,23 e 2,28 $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente. A cepa CC425 também obteve produção tardia de hidrogênio, o que a fez ter a segunda menor produtividade, embora tenha quase o dobro de produção máxima de hidrogênio comparada a CC124.

Figura 32 - Produção de hidrogênio (mmol.L^{-1}) por cepas de *Chlamydomonas* spp. em condição aeróbia

Devido aos resultados, outro teste em condição aeróbia foi realizado com estas cepas selecionadas, mas em triplicata, com exceção da N Ch03, que no período do ensaio a cultura não estava hábil. As respostas foram diferentes ao teste realizado anteriormente, como pode ser observado na Figura 33, pois não houve um dia de pico de produção de hidrogênio, a produção foi menor, mas constante a partir do terceiro dia de amostragem para as cepas CC124, D66 e SAG 24.91, e no sexto dia para a CC425.

Apesar de ter ocorrido a produção do gás de interesse, foi observado que a produção foi menor comparada a do teste anterior. Além disso, a cepa que obteve a maior produção também não coincidiu.

A cepa CC425 foi a que apresentou maior produção máxima de hidrogênio, com $0,049 \pm 0,021 \text{ mmol.L}^{-1}$, porém sua produção iniciou

tardamente, comparada as outras, o que fez com que sua produtividade não fosse a melhor neste teste, $0,194 \pm 0,021 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

A melhor produtividade foi da cepa CC124, com $0,228 \pm 0,027 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, sendo a produção máxima de $0,036 \pm 0,004 \text{ mmol.L}^{-1}$. A segunda maior produtividade foi da cepa D66, $0,203 \pm 0,037 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $0,034 \pm 0,007 \text{ mmol.L}^{-1}$ de produção máxima. A cepa que obteve menor produção de hidrogênio e menor produtividade foi a SAG 24.91, com $0,030 \pm 0,005 \text{ mmol.L}^{-1}$ e $0,186 \pm 0,024 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente.

Figura 33 - Produção de hidrogênio (mmol.L^{-1}) por cepas de *Chlamydomonas* spp. em condição aeróbia em triplicata

Após a realização dos testes em condição aeróbia, foi feito o ensaio de produção de hidrogênio em condição anaeróbia, para testar a via de biofotólise direta anaeróbia, com privação de enxofre no meio de cultura TAP, com as cepas selecionadas de *Chlamydomonas* spp. As cepas que não apresentaram resultado positivo no teste aeróbio de hidrogênio não foram testadas anaerobiamente porque não apresentaram bom crescimento em sistema fechado, como já mencionado.

Para este teste não houve o cultivo das culturas em duas fases (seção 4.2). As cepas foram cultivadas diretamente no meio de cultura com privação de enxofre. Na fase exponencial, os frascos foram vedados, a

atmosfera foi trocada pela adição de nitrogênio, e iniciaram-se as leituras cromatográficas de gases do *headspace*.

Os resultados deste teste constam na Figura 34 e foi possível analisar a produção de hidrogênio apenas até o 17º dia de amostragem, pois, posteriormente, não foi possível realizar leituras devido à falhas no cromatógrafo.

De forma semelhante ao ocorrido no segundo teste aeróbio, a maior produção de hidrogênio ocorreu com a cepa CC425, atingindo $0,53 \text{ mmol.L}^{-1}$ e produtividade de $1,31 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Porém, a produção deste gás foi de aproximadamente 10,8 e a produtividade 6,7 vezes maior.

Figura 34 - Produção de hidrogênio (mmol.L^{-1}) por cepas de *Chlamydomonas* spp. em condição anaeróbia.

As cepas CC124, D66 e SAG 24.91 apresentaram produção máxima de hidrogênio de $0,40$, $0,33$ e $0,10 \text{ mmol.L}^{-1}$, respectivamente. A produtividade, nesta mesma sequência de cepas foi de $0,98$, $0,81$ e $0,45 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. A cepa CC425 na condição anaeróbia obteve produção maior as demais cepas, aproximadamente na mesma proporção, comparado ao teste aeróbio.

Mesmo não dando continuidade ao ensaio na condição anaeróbia percebeu-se, com estes resultados preliminares, que a produção nesta

condição foi, de maneira geral, 11 vezes maior que na condição aeróbia, sendo esta inviável à produção de hidrogênio por ser momentânea, conforme visto no primeiro teste, ou até mesmo menor que a produção em condição anaeróbia, como ocorreu comparando com segundo teste aeróbio.

Diversos pesquisadores realizaram ensaios de produção de hidrogênio por *Chlamydomonas* sp. por meio da biofotólise direta anaeróbia, com privação de enxofre, e obtiveram resultados positivos. Porém, realizaram os ensaios em duas fases distintas, primeiramente cultivaram a cepa em meio de cultura normal em aerobiose, e na fase de crescimento exponencial transferiram a biomassa para o meio de cultura sem enxofre e sistema fechado (MELIS et al., 2000; TSYGANKOV et al., 2006; KOSOUIROV et al., 2007; TAMBURIC et al., 2011).

No ensaio de teste para a produção de hidrogênio em anaerobiose não foi feito o cultivo em duas fases. O cultivo foi feito diretamente em meio de cultura sem enxofre, o que pode ter prejudicado o crescimento das culturas, além de poder ter provocado a produção de gás mais tardiamente.

Porém, apenas fazendo testes diretos e sem aplicar ferramentas de otimização da produção de hidrogênio, foi possível obter produções semelhantes às demais pesquisas, demonstrando a possibilidade de se obter resultados melhores.

De acordo com isso, seria possível melhorar a produtividade de cepas de *Chlamydomonas* spp. a partir de ensaios utilizando a via biofotólise direta por anaerobiose com privação de enxofre, com cultivo das culturas em duas fases distintas, para a produção de hidrogênio nas segunda e terceira etapas.

5.1.4.2 *Anabaena* spp.

Os mesmos testes realizados para a clorofícea foram realizados para as cepas selecionadas de *Anabaena* spp., testando-se as vias de biofotólise direta, aeróbia e anaeróbia, sendo neste último caso com a privação de enxofre no meio de cultura BG-11 e troca da atmosfera do *headspace* por nitrogênio. Devido aos resultados encontrados com *Chlamydomonas* spp.,

os testes na condição anaeróbia foram realizados com o cultivo das culturas em duas fases.

O ensaio teste em condição aeróbia foi monitorado, a partir das medições cromatográficas, por 24 dias consecutivos, e nenhuma cepa produziu hidrogênio. Após 60 dias foram realizadas novas leituras e apenas uma cepa apresentou produção de hidrogênio, a 1448, embora tenha sido abaixo do limite de detecção.

Para testar a via de biofotólise direta anaeróbia, as cepas foram cultivadas em meio BG-11 normal e na fase exponencial foram transferidas para o meio BG-11 sem enxofre para diminuir a produção de oxigênio pela fotossíntese, além de troca da atmosfera do *headspace* por nitrogênio. O monitoramento de produção de gases nos fotobiorreatores foi realizado por 20 dias, e nenhuma cepa produziu hidrogênio.

Não se obtendo resultados positivos com os testes por essa via de produção de hidrogênio, optou-se em realizar testes da via de biofotólise indireta, através da privação de nitrogênio no meio de cultura BG-11 na segunda fase de cultivo. Além disso, fez-se testes também associando esta via com a via de biofotólise direta anaeróbia, com a privação de enxofre.

Primeiramente, na primeira fase de cultivo, foram feitos cultivos com a concentração normal de nitrogênio no meio de cultura e cultivos com limitação de nitrogênio (10 mg.L^{-1}), para estimular a formação de heterocistos por ter sido testada a via indireta (fixação de nitrogênio) de produção de hidrogênio. Posteriormente, foram transferidos para fotobiorreatores para a segunda fase de cultivo.

Para tanto, no meio de cultivo da segunda fase do ensaio fez-se os seguintes testes: sem nitrogênio, sem enxofre e sem nitrogênio, e sem enxofre e sem nitrogênio com substituição de NaNO_3 do meio de cultura por NaCl , na mesma concentração molar de sódio (Figura 35). Em todos os casos foi realizada a troca da atmosfera do *headspace* por nitrogênio.

O monitoramento da produção de gases do *headspace* foi realizado por 14 dias e não houve produção de hidrogênio pela cepa 2576 em nenhuma condição testada. As cepas 1444 e 1448 apresentaram produção,

porém foi abaixo do limite de detecção, nas condições sem nitrogênio, e sem nitrogênio e sem enxofre combinadas, tanto nos cultivos com concentração normal de nitrogênio na primeira fase, quanto nos que houve limitação de nitrogênio.

De acordo com o levantamento bibliográfico e conforme será discutido adiante, percebeu-se que o nitrogênio atmosférico no *headspace* poderia estar inibindo a produção de hidrogênio. Devido à isso, optou-se em realizar os mesmos testes realizados anteriormente, das vias de biofotólise indireta e esta associada com a direta, mas com a troca dos gases do *headspace* por argônio.

Figura 35 - Ensaio teste da via de biofotólise direta e indireta anaeróbia com *Anabaena* spp.

Privação de nitrogênio, primeiro fotobiorreator da esquerda para a direita, e associação das biofotólises indireta e direta anaeróbia, com privação de enxofre, segundo (privação de enxofre e nitrogênio) e terceiro (privação de enxofre e nitrogênio com adição de NaCl) fotobiorreatores da esquerda para direita, com as cepas de *Anabaena* spp.

Porém, devido ao tempo e a disponibilidade de culturas, a repetição do teste anterior com argônio foi realizado apenas para as cepas 2576 e 1444 e com a limitação de nitrogênio na primeira fase de cultivo.

A produção de gases neste ensaio foi monitorada por 14 dias e houve a produção de hidrogênio pelas duas cepas na condição de privação de nitrogênio, e também com privação de nitrogênio e enxofre para a cepa 1444 (Figura 36). Os fotobiorreatores das duas cepas na condição de privação de nitrogênio e enxofre com adição de NaCl não produziram hidrogênio.

As produções máximas de hidrogênio ocorreram com a privação de nitrogênio, sendo de 0,34 e 1,38 mmol.L⁻¹ e produtividades de 1,00 e 4,99 μmol.L⁻¹.h⁻¹ para as cepas 2576 e 1444, respectivamente. A cepa 1444 também apresentou produção de hidrogênio na condição de privação de nitrogênio e enxofre, mas foi inferior, sendo de 0,06 mmol.L⁻¹ e produtividade de 0,19 μmol.L⁻¹.h⁻¹.

De acordo com estes resultados foi observado que na etapa subsequente provavelmente seriam obtidos melhores resultados com a cepa 1444 comparada a 2576, além de esta primeira ter apresentado rápida produção, a partir do segundo dia de ensaio.

Figura 36 - Produção de hidrogênio (mmol.L⁻¹) por cepas de *Anabaena* spp.

Linhas inteiras indicam a cepa 2576, e as linhas tracejadas a cepa 1444, em privação de nitrogênio (s/ N), privação de nitrogênio e enxofre (s/ N e S) e privação de enxofre e nitrogênio com adição de NaCl (s/ S e c/ NaCl).

Ao fim destes testes optou-se em realizar os ensaios de produção de hidrogênio com apenas a privação de nitrogênio no meio de cultura, na segunda fase de cultivo, e com a troca da atmosfera do *headspace* por argônio ao montar o fotobiorreator. Além disso, por estar sendo estimulada a via de biofotólise indireta de produção de hidrogênio, foi decidido fazer o

cultivo da primeira fase das culturas em meio de cultivo com limitação de nitrogênio.

5.1.4.3 Comparação dos testes de vias e produções de hidrogênio entre os gêneros

De acordo com os resultados obtidos e as opções feitas pelas vias de produção de hidrogênio que seriam utilizadas nas etapas posteriores do projeto, pode-se fazer uma comparação entre as melhores cepas dos gêneros *Chlamydomonas* e *Anabaena* como prévia dos resultados que poderiam ser esperados (Tabela 22).

Portanto, foi observado que, possivelmente, *Anabaena* poderia apresentar melhores resultados nas etapas seguintes da pesquisa por ter apresentado produção de hidrogênio 2,6 e produtividade 3,8 vezes maior comparada a melhor cepa de *Chlamydomonas*.

Tabela 22 - Resumo das vias de produção de hidrogênio escolhidas para as etapas posteriores e comparação das melhores cepas de cada gênero quanto à produção máxima de hidrogênio e produtividade

Gênero/ cepa	Via de produção de H ₂	Produção máxima mmol.L ⁻¹	Produtividade μmol.L ⁻¹ .h ⁻¹
<i>Chlamydomonas</i> / CC425	Biofotólise direta anaeróbia, com privação de S	0,53	1,31
<i>Anabaena</i> / 1444	Biofotólise direta e indireta, com privação de N	1,38	4,99

Porém, o teste de produção de hidrogênio para a clorofícea não foi realizado em duas fases experimentais para a construção do fotobiorreator, o que pode ter influenciado para a menor produção. Provavelmente, com o cultivo em duas fases, as cepas de *Chlamydomonas* spp. tenderiam a produzir mais hidrogênio em relação ao teste.

5.2 Segunda etapa

Após todos os testes realizados, tanto para as condições de cultivo para as cepas, quanto à metodologia para a produção de hidrogênio adequada para cada gênero, deu-se início à segunda etapa do projeto, caracterizada como uma varredura quanto à produção de hidrogênio de todas as cepas selecionadas.

Para tanto, manteve-se, nos ensaios, as condições físico-químicas estabelecidas na primeira etapa, havendo apenas a variação da radiação em dois diferentes níveis, com o objetivo de escolher uma cepa de cada gênero, a melhor quanto à produtividade de hidrogênio, para a terceira etapa.

5.2.1 *Chlamydomonas* spp.

Os ensaios de produção de hidrogênio para *Chlamydomonas* spp. foram realizados com cinco cepas a partir da biofotólise direta anaeróbia, com privação de enxofre na segunda fase experimental. Para tanto, a primeira fase foi cultivada em meio de cultura TAP normal em $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, e a segunda fase, após a transferência da biomassa, as culturas foram mantidas em meio TAP com privação de enxofre e em duas radiações, 60 e $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, para a análise de produção de hidrogênio.

5.2.1.1 *Produção de hidrogênio*

Foram obtidos resultados positivos para a produção de hidrogênio com as cinco cepas testadas de *Chlamydomonas* spp. de acordo com a metodologia e via de produção adotadas.

O ensaio com a cepa N Ch03 foi o mais longo, com duração de 372 horas (Figura 37). Quanto aos parâmetros de produção de hidrogênio, não houve diferença estatística significativa, em nenhum deles, entre as duas radiações, embora na intensidade mais baixa a produção e a produtividade tenham sido maiores.

Figura 37 - Concentração de hidrogênio (mmol.L^{-1}) produzido pela cepa N Ch03, nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Barras indicam desvio padrão ($n=3$).

Na radiação de 60 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a produção máxima de hidrogênio foi de $1,09 \pm 0,23 \text{ mmol.L}^{-1}$, produtividade de $3,17 \pm 0,81 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, μ_{max} de $0,028 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$ e volume máximo de $25,18 \pm 5,31 \text{ mL.L}^{-1}$ de cultura. Na mesma sequência de parâmetros, na radiação de 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foram obtidos os seguintes resultados: $0,83 \pm 0,006 \text{ mmol.L}^{-1}$, $2,59 \pm 0,09 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, μ_{max} de $0,032 \pm 0,001 \text{ h}^{-1}$ e $19,09 \pm 0,57 \text{ mL.L}^{-1}$ de cultura (Tabela 23).

Quanto à cepa CC124 (Figura 39), o ensaio durou 264 horas. Comparando os parâmetros de produção de hidrogênio entre as duas radiações (Tabela 23), não foi observada diferença estatística, exceto quanto à velocidade de produção, que foi maior na radiação de 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $0,050 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$, contra $0,030 \pm 0,006 \text{ h}^{-1}$ em 60 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Embora não tenham sido encontradas diferenças estatísticas, a produção máxima e volume de hidrogênio foram maiores na radiação mais baixa, $1,26 \pm 0,39 \text{ mmol.L}^{-1}$ e $31,52 \pm 8,03 \text{ mL.L}^{-1}$ de cultura, em relação a mais alta, $1,19 \pm 0,09 \text{ mmol.L}^{-1}$ e $29,75 \pm 2,32 \text{ mL.L}^{-1}$ de cultura, respectivamente.

Em contrapartida, ocorreu o inverso quanto à produtividade, corroborando com os dados de velocidade, em que foram superiores na radiação de $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $7,52 \pm 0,59 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, contra $5,66 \pm 2,65 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em $60 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, nas quais também não apresentaram diferença estatística.

Figura 38 - Concentração de hidrogênio (mmol.L^{-1}) produzido pela cepa CC124, nas radiações de 60 e $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Barras indicam desvio padrão ($n=3$).

O ensaio com a cepa CC425 (Figura 39) durou 204 horas. As produções máximas de hidrogênio foram de $2,88 \pm 0,55$ e $2,64 \pm 0,40 \text{ mmol.L}^{-1}$, enquanto que os volumes de hidrogênio corresponderam a $57,87 \pm 12,68$ e $61,10 \pm 7,16 \text{ mL.L}^{-1}$ de cultura, nas radiações de 60 e $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente (Tabela 23). Não houve diferença estatística quanto à estes parâmetros entre as duas intensidades.

Em relação à produtividade e μ_{max} , também não foi observada diferença comparando-se as radiações, porém, foi observado que foram obtidos melhores resultados quanto à estes parâmetros na radiação mais alta, sendo nesta de $17,02 \pm 3,83 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $0,126 \pm 0,015 \text{ h}^{-1}$, e na mais baixa $14,74 \pm 1,96 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $0,117 \pm 0,007 \text{ h}^{-1}$, respectivamente (Tabela 23).

A cepa D66 (Figura 40) não apresentou diferença estatística em nenhum dos parâmetros ao se comparar os resultados obtidos nas duas radiações. O ensaio desta cepa durou 228 horas.

Figura 39 - Concentração de hidrogênio (mmol.L^{-1}) produzido pela cepa CC425, nas radiação de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Barras indicam desvio padrão ($n=3$).

Figura 40 - Concentração de hidrogênio (mmol.L^{-1}) produzido pela cepa D66, nas radiação de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Barras indicam desvio padrão ($n=3$).

Apesar de não terem diferença, a produção máxima, produtividade e volume de hidrogênio, foram maiores na menor radiação, sendo elas $0,70 \pm 0,10 \text{ mmol.L}^{-1}$, $3,62 \pm 0,35 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $15,96 \pm 2,83 \text{ mL.L}^{-1}$ de cultura, respectivamente. Enquanto que na maior radiação, na mesma sequência de parâmetros foram obtidos $0,57 \pm 0,06 \text{ mmol.L}^{-1}$, $3,21 \pm 0,58 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $13,88 \pm 1,29 \text{ mL.L}^{-1}$ de cultura (Tabela 23).

Em relação à μ_{max} , na qual também não houve diferença entre as radiações, ocorreu o contrário, sendo esta maior na radiação de $200 \text{ } \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $0,041 \pm 0,009 \text{ h}^{-1}$ contra $0,035 \pm 0,007 \text{ h}^{-1}$ em $60 \text{ } \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Tabela 23).

Por fim, o ensaio com a cepa SAG 24.91 (Figura 41) apresentou duração de 204 horas, e semelhantemente às demais, esta também não demonstrou diferença estatística na comparação dos parâmetros entre as radiações, embora foi observado que na menor radiação houve maior produção de hidrogênio (Tabela 23).

Figura 41 - Concentração de hidrogênio (mmol.L^{-1}) produzido pela cepa SAG 24.91, nas radiações de 60 e $200 \text{ } \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Barras indicam desvio padrão ($n=3$).

As produções máximas de hidrogênio foram de $1,06 \pm 0,14$ e $0,84 \pm 0,12 \text{ mmol.L}^{-1}$, os volumes de hidrogênio corresponderam a $25,97 \pm 2,70$ e

$20,67 \pm 3,10 \text{ mL.L}^{-1}$ de cultura, enquanto que as produtividades foram de $6,37 \pm 0,95$ e $5,12 \pm 0,37 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e as μ_{max} $0,040 \pm 0,005$ e $0,043 \pm 0,008 \text{ h}^{-1}$, nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente.

De acordo com estes resultados, pode-se observar, de maneira geral, que não houve diferença estatística, quanto aos parâmetros de produção de hidrogênio, entre as radiações para cada cepa deste gênero, exceto na μ_{max} da cepa CC124 (Tabela 23).

Tabela 23 - Parâmetros de produção de hidrogênio de todas as cepas de *Chlamydomonas* spp. nas radiações 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Cepa	Rad. (μmol)	Produção máxima (mmol.L^{-1})	Volume Máximo (mL)	Produtividade ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	μ_{max} (h^{-1})
N Ch03	60	$1,09 \pm 0,23$	$25,18 \pm 5,31$	$3,17 \pm 0,81$	$0,028 \pm 0,002$
	200	$0,83 \pm 0,006$	$19,09 \pm 0,57$	$2,59 \pm 0,09$	$0,032 \pm 0,001$
CC124	60	$1,26 \pm 0,39$	$31,52 \pm 8,03$	$5,66 \pm 2,65$	$0,030 \pm 0,006$
	200	$1,19 \pm 0,09^{\text{d}}$	$29,75 \pm 2,32^{\text{d}}$	$7,52 \pm 0,59$	$0,050 \pm 0,002^{\text{a}}$
CC425	60	$2,88 \pm 0,55^{\text{b}}$	$57,87 \pm 12,68^{\text{b}}$	$14,74 \pm 1,96^{\text{b}}$	$0,117 \pm 0,007^{\text{b}}$
	200	$2,64 \pm 0,40^{\text{c}}$	$61,10 \pm 7,16^{\text{c}}$	$17,02 \pm 3,83^{\text{c}}$	$0,126 \pm 0,015^{\text{c}}$
D66	60	$0,70 \pm 0,10$	$15,96 \pm 2,83$	$3,62 \pm 0,35$	$0,035 \pm 0,007$
	200	$0,57 \pm 0,06$	$13,88 \pm 1,29$	$3,21 \pm 0,58$	$0,041 \pm 0,009$
SAG 24.91	60	$1,06 \pm 0,14$	$25,97 \pm 2,70$	$6,37 \pm 0,95$	$0,040 \pm 0,005$
	200	$0,84 \pm 0,12$	$20,67 \pm 3,10$	$5,12 \pm 0,37$	$0,043 \pm 0,008$

Rad. indica radiação em $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$):

a: Diferença estatísticas significativa entre as radiações 60 e 200 na cepa CC124.

b: Diferença estatística significativa da cepa CC425 com todas as outras cepas radiação de 60.

c: Diferença estatística significativa da cepa CC425 com todas as outras cepas na radiação de 200.

d: Diferença estatística significativa da cepa CC124 com a cepa D66 na radiação de 200.

Porém, ao comparar todas as cepas quanto à produção de hidrogênio nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, separadamente (Figura 42, A e B, respectivamente), foi observado que a produção máxima de hidrogênio,

produtividade, volume de hidrogênio máximo e $\mu_{\max}$ foram significativamente maiores na cepa CC425 comparado à todas as outras cepas nos dois níveis de radiação testados (Tabela 23).

Figura 42 - Concentração de hidrogênio (mmol.L^{-1}) nas radiações de $60 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (A) e $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (B) produzidos pelas cepas de *Chlamydomonas* spp. Barras indicam desvio padrão ($n=3$)

Entre as demais cepas não houve diferença estatística quanto à todos os parâmetros de produção de hidrogênio, exceto diferença entre a cepa

CC124 e D66 na produção e volume máximos de hidrogênio na maior radiação, sendo melhores na primeira.

Analisando especificamente a produção máxima de hidrogênio, a cepa CC425 apresentou em média 2,94 e 3,29 vezes maior produção comparada as demais cepas nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente. Quanto à produtividade, foram maiores para CC425 em média de 3,41 e 4,36 vezes maior, na menor e maior radiação (Figura 43).

Figura 43 - Produção máxima de hidrogênio (mmol.L^{-1}) indicado por marcadores e produtividade ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) indicados por barras, nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, das cepas de *Chlamydomonas* spp. Barras indicam desvio padrão ($n=3$).

As cepas CC124 e SAG 24.91 apresentaram produtividades semelhantes, sendo que a primeira obteve melhores resultados na maior radiação, e a segunda na menor radiação. Porém, em relação à produção máxima de hidrogênio, a cepa CC124 foi a que apresentou a segunda melhor produção.

A produção máxima de hidrogênio das cepas SAG 24.91 e N Ch03 foram coincidentes, obtendo estas a terceira melhor produção, embora a N

Ch03 cepa tenha apresentado a pior produtividade, devido, provavelmente, ter sido mais lenta no processo, comprovado pelos valores de $\mu_{\max}$ que foram os menores comparado à todas as demais.

Por fim, a cepa D66 foi a que obteve produção e volumes máximos de hidrogênio, além da produtividade, menores que as demais cepas, embora tenha apresentado $\mu_{\max}$ superior à N Ch03, e a diferença estatística apenas com os parâmetros da cepa CC425.

Portanto, diante dos resultados apresentados, optou-se para a terceira etapa da pesquisa, para otimização da biomassa e produção de hidrogênio, a cepa CC425, *C. reinhardtii*, que apresentou o melhor desempenho, e principalmente, as melhores produtividades.

5.2.1.2 *Densidade celular e estimativa de biomassa*

Em todos os ensaios foi estimada a densidade celular no início da segunda fase experimental, ao montar os fotobiorreatores (Tabela 24). Além disso, foi estimada a biomassa a partir da densidade óptica, sólidos e clorofila *a*, nos dias iniciais das culturas (D.0), inicial da segunda fase experimental, e ao fim dos ensaios nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Tabela 25).

A análise estatística foi realizada para comparar se houve diferença na densidade celular entre as radiações para cada cepa, e também entre as cepas. Em relação à estimativa de biomassa, foi feita análise estatística para comparar apenas o início da segunda fase experimental entre as cepas em cada radiação separadamente (Inicial na Tabela 25).

A densidade celular (Tabela 24) não teve diferença significativa entre as duas intensidades de radiação em nenhuma das cepas, demonstrando que quanto à este fator, os fotobiorreatores iniciaram o ensaio da fase de produção de hidrogênio em condições semelhantes.

Ao comparar a densidade celular entre as cepas, foi observado que a menor ocorreu com a cepa N Ch03 nas duas radiações ($0,88 \pm 0,18$ e $1,03 \pm 0,18 \times 10^6$), embora não tenha sido esta que obteve a menor produção máxima de hidrogênio.

Tabela 24 - Densidade celular (ind.mL^{-1}) ($\times 10^6$) no início da segunda fase experimental nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Cepa	Densidade celular	
	60	200
N Ch3	$0,88 \pm 0,18$	$1,03 \pm 0,18$
CC124	$6,84 \pm 0,54^a$	$6,38 \pm 0,85^d$
CC425	$3,67 \pm 0,68^b$	$4,38 \pm 0,32^b$
D66	$9,75 \pm 1,67^c$	$8,16 \pm 0,58^e$
SAG	$8,39 \pm 0,55^a$	$8,97 \pm 1,34^f$

Letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$):

a: CC124 e SAG 24.91 não são diferentes. Estas têm diferenças estatísticas significativas com N Ch03 e CC425.

b: Diferença estatística significativa de CC425 com N Ch03.

c: D66 e SAG 24.91 não são diferentes. D66 tem diferença estatística significativa com N Ch03, CC124 e CC425.

d: Diferença estatística significativa de CC124 com N Ch03.

e: D66 não tem diferença com CC124 e SAG 24.91. D66 tem diferença estatística significativa com N Ch03 e CC425.

f: SAG 24.91 e D66 não são diferentes. SAG 24.91 tem diferença estatística significativa com N Ch03, CC124 e CC425.

A menor produção de hidrogênio (Tabela 23) foi obtida pela cepa D66. De forma contrária, ela apresentou a maior densidade na menor radiação ($9,75 \pm 1,67 \times 10^6 \text{ ind.mL}^{-1}$), sendo estatisticamente maior comparada as cepas N Ch03, CC124 e CC425, e a segunda maior densidade na radiação mais alta ($8,16 \pm 0,58 \times 10^6 \text{ ind.mL}^{-1}$), com diferença entre as cepas N Ch03 e CC425.

A cepa CC425, que foi escolhida para a terceira etapa, apresentou densidade celular maior significativamente em relação à cepa N Ch03, e quanto às demais foi significativamente menor, com $3,67 \pm 0,68$ e $4,38 \pm 0,32 \times 10^6 \text{ ind.mL}^{-1}$, na menor e maior radiações, respectivamente.

A estimativa de biomassa, comparada entre as cepas no início da segunda fase experimental (Tabela 25), demonstrou que a cepa N Ch03, de forma semelhante a densidade celular, apresentou a menor biomassa estatisticamente comparada as demais cepas, tanto em densidade óptica, quanto em sólidos e clorofila *a* ($0,12 \pm 0,02$; $213,33 \pm 90,18 \text{ mg.L}^{-1}$ e $1,20 \pm 0,24 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente).

Tabela 25 - Estimativa de biomassa por absorbância (750 nm), sólidos (mg.L⁻¹) e clorofila a (mg.L⁻¹)

Cepa	Período	Absorbância (750 nm)	Sólidos (mg.L ⁻¹)	Clorofila a (mg.L ⁻¹)
N Ch3	D. 0	0,014 ± 0,00	34,00 ± 0,00	0,39 ± 0,00
	Inicial	0,12 ± 0,02	213,33 ± 90,18	1,20 ± 0,24
	Final – 60	0,20 ± 0,04	326,67 ± 11,55	1,71 ± 0,57
	Final – 200	0,20 ± 0,01	266,67 ± 30,55	0,95 ± 0,12
CC124	D. 0	0,10 ± 0,00	92,31 ± 0,00	3,40 ± 0,00
	Inicial	0,92 ± 0,03 ^a	821,51 ± 31,47 ^b	30,26 ± 1,16 ^e
	Final – 60	0,59 ± 0,02	523,33 ± 55,08	15,49 ± 1,66
	Final – 200	0,59 ± 0,02	480,00 ± 36,06	9,93 ± 1,97
CC425	D. 0	0,08 ± 0,00	83,33 ± 0,00	1,61 ± 0,00
	Inicial	0,59 ± 0,02 ^b	773,33 ± 30,55 ^b	8,73 ± 0,34 ^b
	Final – 60	0,47 ± 0,04	486,67 ± 50,33	5,25 ± 1,20
	Final – 200	0,49 ± 0,01	440,00 ± 40,00	4,74 ± 0,48
D66	D. 0	0,095 ± 0,00	100,00 ± 0,00	1,98 ± 0,00
	Inicial	0,89 ± 0,01 ^a	1250,00 ± 100,00 ^d	19,93 ± 0,56 ^a
	Final – 60	0,63 ± 0,08	777,78 ± 76,98	9,04 ± 2,71
	Final – 200	0,70 ± 0,03	844,44 ± 50,92	7,47 ± 0,83
SAG 24.91	D. 0	0,04 ± 0,00	43,33 ± 0,00	0,81 ± 0,00
	Inicial	0,68 ± 0,05 ^c	710,33 ± 34,45 ^b	13,21 ± 0,64 ^c
	Final – 60	0,57 ± 0,04	600,00 ± 60,00	10,97 ± 0,33
	Final – 200	0,71 ± 0,08	653,33 ± 98,66	8,58 ± 0,52

D.0 – representa o dia 0, início da primeira fase experimental. Inicial – início da segunda fase experimental. Final – 60 e 200 – o fim da segunda fase experimental nas radiações 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$):

a: Diferença estatística significativa com N Ch3, CC425 e SAG 24.91.

b: Diferença estatística significativa com N Ch3.

c: Diferença estatística significativa com N Ch3 e CC425.

d: Diferença estatística significativa com N Ch3, CC124, CC425 e SAG 24.91.

e: Diferença estatística significativa com N Ch3, CC425, D66 e SAG 24.91.

A cepa D66, além de apresentar a maior densidade celular, também demonstrou diferença significativa quanto à biomassa, sendo esta significativamente maior que as demais cepas ($0,89 \pm 0,01$; 1250 ± 100 mg.L⁻¹ e $19,93 \pm 0,56$ mg.L⁻¹, de absorvância, sólidos e clorofila *a*, respectivamente), não apresentando diferença apenas na absorvância com a cepa CC124 e menor concentração de clorofila *a* que esta. A cepa melhor produtora de hidrogênio (CC425) obteve apenas biomassa superior a cepa N Ch03, sendo que sua absorvância, sólidos e clorofila *a* foram estatisticamente menores comparadas as demais cepas ($0,59 \pm 0,02$; $773,33 \pm 30,55$ mg.L⁻¹ e $8,73 \pm 0,34$ mg.L⁻¹, respectivamente), corroborando com os resultados obtidos de densidade celular.

Foi possível observar que todas as cepas durante a segunda fase experimental apresentaram decaimento em suas biomassas, havendo diminuição nos valores de absorvância, concentração de sólidos e clorofila *a*, demonstrando que as cepas entraram na fase estacionária de crescimento e o fotobiorreator tornou-se anóxico com a privação de enxofre. Porém, o mesmo não foi observado com a cepa N Ch03, que apresentou maiores resultados de biomassa no fim do ensaio, comparado ao início da fase de produção de hidrogênio.

Portanto, com estes resultados, de maneira geral, foi observado que a cepa que apresentou melhor desempenho quanto à densidade celular e a produção de biomassa, em termos de sólidos, foi a que obteve menor produção de hidrogênio, e a cepa que demonstrou os segundos menores resultados quanto a estes parâmetros foi a melhor produtora (Figura 44), demonstrando diferenças de metabolismo entre as cepas, conforme será discutido à diante.

Figura 44 - Produção máxima de hidrogênio (mmol.L^{-1}) indicado por marcadores e sólidos no início e fim da segunda fase experimental (mg.L^{-1}) indicados por barras, nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, das cepas de *Chlamydomonas* spp. Barras indicam desvio padrão ($n=3$).

5.2.1.3 Análises bioquímicas

Foram realizadas análises de carboidrato e proteína da biomassa seca das culturas no início e fim da segunda fase experimental, a fim de que fosse possível comparar estatisticamente se houve consumo ou produção destes produtos durante a produção de hidrogênio, e, além disso, se houve diferença ao fim dos ensaios entre as radiações, para cada cepa.

Em relação ao carboidrato, em percentual de mg.L^{-1} de biomassa seca, apenas duas cepas apresentaram diminuição em sua biomassa comparando o início com o fim do experimento, as cepas CC124 e CC425 (Figura 45 - A).

A cepa CC124 iniciou a segunda fase experimental com média de 7,31 % e encerrou com 3,00 % e 3,71 % na menor e maior radiação, respectivamente, havendo diferença significativa entre o início e o fim. Este resultado demonstrou que houve consumo de carboidrato da biomassa

durante a produção de hidrogênio, e, no fim do ensaio, não houve diferença entre as radiações, sendo este consumo, portanto, igual.

A cepa CC425 obteve no início 27,79 %, e no fim 22,46 e 23,21 % de carboidrato em sua biomassa. Porém, não houve diferença estatística entre o início e o fim da composição da biomassa para este elemento durante a produção de hidrogênio, embora tenha sido observado diminuição no percentual. Também não houve diferença entre as radiações ao fim do ensaio.

As cepas N Ch03, D66 e SAG 24.91 demonstraram um aumento no percentual de carboidrato em suas biomassas comparando o início com o fim da segunda fase experimental, embora para a cepa D66 não tenha tido diferença estatística neste aumento, e a cepa SAG 24.91 apenas se apresentou significativamente maior em $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Nenhuma das três cepas apresentou diferença significativa no fim dos ensaios entre as radiações.

Quanto à proteína, também em percentual de mg.L^{-1} de biomassa seca (Figura 45 – B), todas as cepas apresentaram diminuição, significativa estatisticamente, deste componente em sua composição do início ao fim da segunda fase exponencial nas duas radiações.

A exceção ocorreu com a cepa N Ch03, que, embora tenha ocorrido a queda no percentual no fim do ensaio ($15,21 \pm 0,58$ e $13,89 \pm 0,62$ %, nas radiações 60 e $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente) não houve diferença estatística, provavelmente devido ao alto desvio padrão na análise da amostra inicial ($25,46 \pm 10,14$ %).

A cepa CC124 apresentou diminuição média de 34,95 % de proteína em sua biomassa ao fim do ensaio, enquanto que as cepas CC425, D66 e SAG 24.91 obtiveram diminuição média de 47,14, 38,06 e 46,14 %, respectivamente.

Ao comparar o fim dos experimentos foi observado que em $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ o percentual de proteína foi menor que o do fim em $60 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, em todas as cepas, porém em nenhuma delas houve

diferença estatística quanto ao percentual de proteína na biomassa entre as duas radiações.

Figura 45 - Porcentagem (mg.L^{-1}) de carboidrato (A) e proteína (B) no início (inicial) e fim da segunda fase experimental nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, das cepas de *Chlamydomonas* spp. Barras indicam desvio padrão ($n=3$)

De acordo com estes resultados pode-se observar que, de maneira geral, independentemente da produção de hidrogênio pelas cepas, todas apresentaram quedas significativas de proteína em sua composição.

O mesmo não ocorreu em relação ao carboidrato, em que as duas cepas que demonstraram diminuição no percentual de carboidrato durante a segunda fase experimental, foram as que apresentaram as duas melhores produções de hidrogênio (Tabela 23), indicando, possivelmente, menor taxa fotossintética em relação às demais cepas.

5.2.1.4 *Análises físico-químicas*

Foram analisadas as variáveis físico-químicas durante os ensaios quanto à disponibilidade de nutrientes e remoção destes, do início (dia zero) da primeira ao fim da segunda fase experimental, sendo feitas análises de pH, concentração de nitrogênio amoniacal, ortofosfato e demanda química de oxigênio (DQO).

É válido lembrar, que no início da segunda fase experimental, o meio de cultura foi renovado na condição adequada para a produção de hidrogênio, restabelecendo, portanto, a concentração inicial de nutrientes disponíveis às culturas.

Diante disso, foi realizada a análise estatística de remoção de nutrientes quanto ao ensaio, desde o instante do inóculo inicial da cultura até o fim, ou seja, remoção nas duas fases experimentais juntas, e apenas durante a fase de produção de hidrogênio (2ª fase), para nitrogênio, fósforo e DQO, separadamente, entre as cepas e em cada radiação.

Os resultados obtidos de pH e concentrações de nitrogênio amoniacal, ortofosfato e DQO constam na Tabela 26. Os resultados de remoção de nitrogênio, fósforo e DQO estão apresentados em porcentagem de suas concentrações (Tabela 27).

Quanto ao pH, de maneira geral, houve aumento em todas as culturas ao fim dos experimentos, comparado ao início (7,2), tornando-se meios mais básicos.

Tabela 26 - Variáveis físico-químicas do início ao fim dos ensaios: pH, nitrogênio amoniacal (mg.L⁻¹), ortofosfato (mg.L⁻¹) e demanda química de oxigênio (g.L⁻¹)

Cepa	Período	pH	NH ₄ ⁺ (mg.L ⁻¹)	PO ₃ ⁻ (mg.L ⁻¹)	DQO (g.L ⁻¹)
N Ch03	D.0	7,2 ± 0	93,82 ± 0	35,2 ± 0	4,00 ± 0
	fim 1ª f. - 60	*	75,98 ± 0,86	23,47 ± 1,15	3,96 ± 0,02
	fim 1ª f. - 200	*	74,30 ± 2,98	21,60 ± 1,83	3,89 ± 0,10
	fim - 60	7,65 ± 0,01	88,57 ± 0,39	29,47 ± 1,15	3,62 ± 0,03
	fim - 200	7,62 ± 0,04	89,69 ± 0,36	37,07 ± 1,40	3,96 ± 0,04
CC124	D.0	7,2 ± 0	88,42 ± 0	34,4 ± 0	4,47 ± 0
	fim 1ª f. - 60	*	14,99 ± 0,83	17,47 ± 0,23	3,02 ± 0,24
	fim 1ª f. - 200	*	18,45 ± 6,07	19,47 ± 2,20	3,12 ± 0,05
	fim - 60	7,60 ± 0,01	81,79 ± 4,41	42,93 ± 1,29	4,19 ± 0,12
	fim - 200	7,61 ± 0,05	77,16 ± 1,36	43,87 ± 2,05	4,1 ± 0,14
CC425	D.0	7,2 ± 0	91,64 ± 0	34,8 ± 0	4,25 ± 0
	fim 1ª f. - 60	*	70,59 ± 1,47	30,13 ± 3,93	4,05 ± 0,11
	fim 1ª f. - 200	*	70,95 ± 4,18	30,13 ± 0,83	3,94 ± 0,09
	fim - 60	7,60 ± 0,02	112,82 ± 2,87	11,47 ± 2,20	4,09 ± 0,04
	fim - 200	7,68 ± 0,01	107,37 ± 4,90	18,67 ± 0,61	4,14 ± 0,05
D66	D.0	7,2 ± 0	87,48 ± 0	39,6 ± 0	4,18 ± 0
	fim 1ª f. - 60	*	15,74 ± 2,45	25,33 ± 0,61	3,28 ± 0,01
	fim 1ª f. - 200	*	18,54 ± 1,97	25,33 ± 0,46	3,19 ± 0,09
	fim - 60	8,06 ± 0,20	86,91 ± 2,79	32,2 ± 2,55	3,94 ± 0,13
	fim - 200	8,12 ± 0,08	87,88 ± 2,10	35,07 ± 0,61	3,93 ± 0,09
SAG 24.91	D.0	7,2 ± 0	93,81 ± 0	38,0 ± 0	4,79 ± 0
	fim 1ª f. - 60	*	31,25 ± 3,16	25,60 ± 1,20	3,56 ± 0,08
	fim 1ª f. - 200	*	29,91 ± 6,29	26,27 ± 0,83	3,57 ± 0,10
	fim - 60	7,75 ± 0,03	87,43 ± 1,27	27,47 ± 2,27	4,20 ± 0,13
	fim - 200	7,94 ± 0,19	71,05 ± 14,45	27,47 ± 0,61	3,30 ± 0,67

* Não foi detectado; D.0: representa o momento do inóculo da cultura, ou seja, início da primeira fase experimental; fim 1ª f. 60 e 200: representa o momento em que a biomassa foi transferida para o fotobiorreator, ou seja, o fim da primeira fase experimental; fim 60 e 200: representa o fim da segunda fase experimental; 60 e 200: $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

O pH mais básico foi obtido ao fim dos ensaios com a cepa D66, $8,06 \pm 0,20$ e $8,12 \pm 0,08$, em 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. As cepas N Ch03, CC124 e CC425 apresentaram pH muito próximos e mais baixos, em média de $7,62 \pm 0,03$ e $7,64 \pm 0,04$, nas radiações baixa e alta, respectivamente.

Devido ao meio conter ácido acético, estes resultados demonstram que a elevação do pH corroboram com possível consumo do ácido durante a produção de hidrogênio, conforme será relatado a diante.

As cepas que menos assimilaram amônio durante a primeira fase foram N Ch03 e CC425, nas duas radiações. N Ch03 iniciou o experimento com $93,82 \pm 0 \text{ mg.L}^{-1}$ e finalizou a primeira fase com $75,98 \pm 0,86$ e $74,30 \pm 2,98 \text{ mg.L}^{-1}$, na menor e maior radiação respectivamente.

A cepa CC425 foi a única que não assimilou amônio durante a segunda fase experimental, além de ter consumido menos durante a primeira fase ($70,59 \pm 1,47$ e $70,95 \pm 4,18 \text{ mg.L}^{-1}$, em 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) em relação ao início do ensaio, $91,64 \pm 0 \text{ mg.L}^{-1}$ e as outras cepas.

As demais cepas apresentaram assimilação semelhante de amônio durante a primeira fase experimental nas duas intensidades. Além disso, foi observado que todas as cepas assimilaram menos amônio na segunda fase experimental em relação à primeira.

A remoção de nitrogênio pelas cepas durante a segunda fase experimental, foi maior nas cepas CC124 (5,12 e 6,37 %) e SAG 24.91 (3,40 e 12,13 %), não havendo diferença entre elas em 60 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Essa remoção foi significativamente maior pela cepa SAG 24.91 em 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ comparada à todas as cepas.

Em relação à remoção total de nitrogênio, foi observado que se confirmam às melhores assimilações de amônio pelas cepas CC124 (45,27 e 45,93 %), D66 (42,54 e 39,70 %) e SAG 24.91 (36,74 e 46,19 %), sendo que estas apresentaram melhor porcentagem de remoção comparada às cepas N Ch03 e CC425. Porém, na menor radiação SAG 24.91 tenha apresentado remoção estatisticamente menor à CC124 e D66 (Tabela 27).

Tabela 27 - Remoção de nitrogênio (N), fósforo (P) e demanda química de oxigênio (DQO), em porcentagem por concentração, do ensaio total e da segunda fase experimental

Rad.	Cepas	Remoção N (%) (mg.L ⁻¹)		Remoção P (%) (mg.L ⁻¹)		Remoção DQO (%) (g.L ⁻¹)	
		Total	2ª f. exp.	Total	2ª f. exp.	Total	2ª f. exp.
60	NCh03	12,30	2,79 ^d	24,81	8,14 ^g	5,36	4,78
	CC124	45,27 ^a	5,12 ^e	24,61	0,00	19,38 ^e	3,16
	CC425	11,49	0,00	40,23 ^h	33,52 ^j	4,30	1,92
	D66	42,54 ^a	0,73	27,78 ^g	9,34 ^g	13,77 ⁱ	2,93
	SAG	36,74 ^b	3,40 ^d	30,17 ^g	13,86 ^g	19,06 ^e	6,17 ^o
200	NCh03	12,60	2,20	19,32	0,00	2,04	0,62
	CC124	45,93 ^c	6,37	21,70	0,00	19,29 ^m	4,19
	CC425	11,29	0,00	29,88 ^h	23,18 ^j	4,96	1,36
	D66	39,70 ^c	0,30	23,74 ⁱ	5,72 ⁱ	14,89 ^m	3,05
	SAG	46,19 ^c	12,13 ^f	29,30 ^h	13,86 ^k	28,22 ⁿ	15,52 ⁿ

Rad.: radiação de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Total – remoção durante todo o ensaio, durante a primeira e segunda fases juntas; 2ª f. exp. – segunda fase experimental (produção de hidrogênio). Letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

a: CC124 e D66 não são diferentes. Estas têm diferenças estatísticas com N Ch03, CC425 e SAG 24.91.

b: SAG 24.91 é diferente estatisticamente de N Ch03 e CC425.

c: CC124, D66 e SAG 24.91 não são diferentes. Estas têm diferenças estatísticas com N Ch03 e CC425.

d: N Ch03 e SAG 24.91 não são diferentes. Estas têm diferenças estatísticas com CC425 e D66.

e: CC124 e SAG 24.91 não são diferentes. CC124 têm diferença estatística com N Ch03, CC425 e D66.

f: SAG 24.91 é diferente estatisticamente de N Ch03, CC425 e D66.

g: N Ch03, D66 e SAG 24.91 não são diferentes. Estas têm diferença estatística com CC124.

h: CC425 e SAG 24.91 não são diferentes. CC425 têm diferença estatística com N Ch03, CC124 e D66.

i: D66 é diferente estatisticamente de N Ch03 e CC124.

j: CC425 é diferente estatisticamente de N Ch03, CC124, D66 e SAG 24.91.

k: SAG 24.91 é diferente estatisticamente de N Ch03, CC124 e D66.

l: D66 é diferente estatisticamente de N Ch03 e CC425.

m: CC124 e D66 não são diferentes. Estas têm diferenças estatísticas com N Ch03 e CC425.

n: SAG 24.91 é diferente estatisticamente de N Ch03, CC124, CC425 e D66.

o: SAG 24.91 é diferente estatisticamente de CC124 e CC425.

A assimilação de ortofosfato durante a primeira fase experimental foi semelhante ao amônio, sendo que a cepa que menos consumiu foi a CC425 (D.0: $34,8 \pm 0$; 60: $30,13 \pm 3,93$; 200: $30,13 \pm 0,83 \text{ mg.L}^{-1}$) e a que mais

consumiu foi CC124 (D.O: $34,4 \pm 0$; 60: $17,47 \pm 0,23$; 200: $19,47 \pm 2,20$ mg.L⁻¹).

Durante a segunda fase experimental ocorreu situação contrária, havendo maior assimilação de ortofosfato pela cepa CC425, de $11,47 \pm 2,20$ (remoção de 33,52%) e $18,67 \pm 0,61$ mg.L⁻¹ (remoção de 23,18%), na menor e maior radiação, respectivamente, enquanto que não houve assimilação por CC124 (remoção de 0 %) (Tabelas 26 e 27). Devido ao maior consumo nesta fase por CC425, analisando todo o ensaio, ela foi a que apresentou a maior remoção de fósforo (total de 40,23 e 29,88 %, em 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente), sendo significativamente maior que a remoção por todas as outras cepas. A exceção ocorreu para SAG 24.91, quanto ao ensaio total nas duas radiações, que apesar de menor assimilação comparada à CC425, não apresentaram diferença.

Consequentemente, a cepa CC124, embora tenha apresentado a maior assimilação de ortofosfato na primeira fase experimental em relação as demais cepas, foi a que apresentou uma das menores remoção de fósforo no ensaio total (24,61 e 21,70 % em 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente), com diferença estatística entre todas as cepas, exceto com N Ch03.

A assimilação de DQO na primeira fase experimental também foi menor pela cepa N Ch03, sendo a concentração inicial de 4 g.L⁻¹ e a final de $3,96 \pm 0,02$ e $3,89 \pm 0,10$ g.L⁻¹, em 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, seguida por CC425, conforme ocorreu com o amônio e ortofosfato. Porém, durante a produção de hidrogênio na radiação mais baixa, N Ch03 apresentou aumento na assimilação de DQO (Tabela 27).

As maiores assimilações de DQO na primeira fase experimental ocorreram por CC124 e SAG 24.91, nas duas radiações. A CC124 obteve concentração no início de 4,47 g.L⁻¹ e ao fim desta fase $3,02 \pm 0,24$ e $3,12 \pm 0,05$ g.L⁻¹. A cepa SAG 24.91 apresentou concentração inicial de 4,79 g.L⁻¹ e $3,56 \pm 0,08$ e $3,57 \pm 0,10$ g.L⁻¹ ao fim, em 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente.

Houve maior remoção dos compostos de carbono durante a primeira fase experimental com todas as cepas e nas duas radiações, exceto a cepa SAG 24.91 (remoção de 15,52%) e a cepa N Ch03 (remoção de 4,78%), que apresentaram maior assimilação de DQO durante a produção de hidrogênio na maior e menor radiação, respectivamente.

Em relação à remoção total de DQO durante os ensaios, de forma semelhante à assimilação na primeira fase, as cepas CC124 e SAG 24.91 não apresentaram diferença significativa entre elas, e foram superiores as demais cepas na radiação de $60 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Na maior radiação, a remoção total de DQO de SAG 24.91 foi significativamente maior as demais, seguido das cepas CC124 e D66, que não apresentaram diferença entre si.

Portanto, de maneira geral e de acordo com os resultados apresentados (em síntese na Figura 46), as cepas CC124, D66 e SAG 24.91 possuem maior capacidade de remoção de compostos nitrogenados e de carbono, enquanto que a cepa CC425 tem maior potencial para remoção de compostos enriquecidos com fósforo, embora tenha ocorrido maior percentual de remoção durante a fase de produção de hidrogênio.

A cepa N Ch03 foi a que apresentou as menores remoções destes compostos durante os ensaios, embora tenha tido remoção de nitrogênio e DQO semelhantes à cepa CC425 e tenha apresentado maior remoção de fósforo, porém em maior proporção na primeira fase experimental.

Figura 46 - Remoção de nutrientes (%), nitrogênio, fósforo e DQO. Barras indicam remoção total durante o ensaio experimental e marcadores indicam a remoção durante a segunda fase experimental, nas radiações de 60 (A) e 200 (B) $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, das cepas de *Chlamydomonas* spp. Barras indicam desvio padrão (n=3)

5.2.1.5 Análise de ácidos orgânicos e álcoois

As análises de ácidos orgânicos e álcoois foram realizadas para o instante inicial do ensaio (dia 0), e fim da segunda e terceira fases

experimentais. Na segunda fase experimental, por haver renovação do meio de cultura, a concentração de ácido acético inicial desta fase assemelhou-se à do início do ensaio (dia 0), portanto é considerado consumo ou não deste componente em relação à concentração inicial e não à concentração obtida ao fim da primeira fase.

Os resultados consistem naqueles que foram detectados de acordo com o limite de detecção do método. Foram detectados produção/consumo de álcool na forma de etanol e os ácidos orgânicos foram: acético, propiônico, isobutírico, butírico, valérico e capróico.

A análise estatística foi realizada quanto à produção/consumo de ácido acético e etanol, que são os resultados mais relevantes obtidos da análise de ácidos e álcool, comparando o início dos ensaios com fim das primeiras e segundas fases experimentais, bem como a comparação da produção de etanol entre as cepas ao fim dos ensaios.

A cepa N Ch03 (Figura 47) não apresentou assimilação significativa de ácido acético durante a primeira fase exponencial, e a maior concentração deste elemento ao fim da primeira fase experimental ($1115,3 \pm 55,88$ e $1226,5 \pm 118,8$ mg.L⁻¹, em 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente) comparado ao início do ensaio $871,4 \pm 181,9$ mg.L⁻¹, deveu-se, provavelmente, à possíveis erros na análise, como demonstrado com os altos valores de desvio padrão.

Também não houve diferença significativa do fim da segunda fase experimental com o início do ensaio. Os resultados foram significativamente menores comparados ao fim da primeira fase, indicando que pode ter tido assimilação de ácido acético pela cepa, nas duas radiações, embora seja apenas uma hipótese devido ao desvio padrão e ausência de diferença estatística com o resultado inicial.

Quanto aos demais ácidos, houve produção na segunda fase experimental na maior radiação de ácido propiônico, isobutírico, butírico, valérico e capróico, enquanto que na menor radiação houve produção, também nesta fase, apenas de ácido isobutírico e capróico.

Figura 47 - Concentração (mg.L^{-1}) de ácidos orgânicos e álcool pela cepa N Ch03

D.0 – início do ensaio. Fim 1ª e 2ª f. – fim da primeira e segunda fases experimentais. Barras azuis indicam ensaio em $60 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e barras vermelhas indicam ensaio em $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Barras indicam desvio padrão ($n=3$).

Foi detectada a produção de etanol, tanto no fim da primeira fase, quanto ao fim da segunda fase experimental, porém só houve diferença significativa da produção final da segunda fase ($70,8 \pm 30,3$ e $60,7 \pm 9,9 \text{ mg.L}^{-1}$, em 60 e $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente) com o início do ensaio (0 mg.L^{-1}). Além disso, não houve diferença de produção de etanol entre as intensidades de radiação.

A cepa CC124 (Figura 48) apresentou assimilação de ácido acético tanto na primeira quanto na segunda fase experimental, nas duas radiações, havendo diferença estatística entre as concentrações do dia zero ($808,6 \pm 129,5 \text{ mg.L}^{-1}$) e as finais, além de maior consumo significativo de ácido acético na primeira fase comparado a segunda na radiação mais baixa. Não houve diferença de assimilação de ácido acético entre as intensidades em ambas as fases.

Quanto aos demais ácidos, houve apenas produção de ácido isobutírico, ao fim da segunda fase experimental na menor radiação, e ao fim da primeira fase na maior radiação. O restante dos ácidos orgânicos já preexistia no dia inicial dos ensaios.

Figura 48 - Concentração (mg.L^{-1}) de ácidos orgânicos e álcool pela cepa CC124

D.0 – início do ensaio. Fim 1ª e 2ª f. – fim da primeira e segunda fases experimentais. Barras azuis indicam ensaio em $60 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e barras vermelhas indicam ensaio em $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Barras indicam desvio padrão ($n=3$).

A produção de etanol por CC 124 foi superior comparada à N Ch03, sendo detectada desde o fim da primeira fase ($9,6 \pm 16,6$ e $49,8 \pm 32,1$ em 60 e $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente). Porém, não houve diferença significativa entre o dia inicial (0 mg.L^{-1}) e o fim da primeira fase experimental. Provavelmente não houve diferença nesta primeira fase devido ao alto desvio padrão, pois na triplicata, tiveram frascos que produziram etanol e outros não.

A produção final na segunda fase foi significativamente maior comparada ao início e fim da primeira fase, com concentração de $337,3 \pm 112,3$ na menor e $253,3 \pm 82,9$ na maior radiação, e não apresentaram diferença entre elas.

Com a cepa CC425 (Figura 49), melhor produtora de hidrogênio, também foi observado a assimilação de ácido acético, havendo diferença entre o início do ensaio ($887,6 \pm 120,0 \text{ mg.L}^{-1}$) e o fim da segunda fase experimental nas duas radiações ($157,6 \pm 0$ e $69,2 \pm 12,5 \text{ mg.L}^{-1}$), e com a primeira fase apenas em $60 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($196,8 \pm 118,2 \text{ mg.L}^{-1}$). Na

maior radiação houve assimilação significativamente menor de ácido acético na primeira fase ($596,6 \pm 93 \text{ mg.L}^{-1}$).

Não foi observada produção dos demais ácidos orgânicos, pois de acordo com os resultados já haviam concentrações no instante inicial, e as concentrações iniciais e finais foram próximas e, em alguns casos, com desvios padrões elevados, nas quais não foram detectadas diferenças.

Figura 49 - Concentração (mg.L^{-1}) de ácidos orgânicos e álcool pela cepa CC425

D.0 – início do ensaio. Fim 1ª e 2ª f. – fim da primeira e segunda fases experimentais. Barras azuis indicam ensaio em $60 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e barras vermelhas indicam ensaio em $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Barras indicam desvio padrão ($n=3$).

Foi constatada também que a produção de etanol por CC425, durante as duas fases experimentais e nas duas radiações, obteve produção significativamente maior ao fim do ensaio ($138,9 \pm 1,5$ e $124,3 \pm 6,04 \text{ mg.L}^{-1}$, na menor e maior radiação, respectivamente) comparada ao dia 0 ($17,4 \pm 0 \text{ mg.L}^{-1}$), e não houve diferença entre as concentrações finais.

De forma semelhante as demais, a cepa D66 (Figura 50) também apresentou assimilação significativa de ácido acético, havendo diferença no início do experimento ($931,5 \pm 128,2 \text{ mg.L}^{-1}$) e o fim das duas fases experimentais e nas duas radiações, não havendo diferença entre elas (60:

$137,6 \pm 190$ e $268,3 \pm 173 \text{ mg.L}^{-1}$; 200: $89,6 \pm 126$ e 190 e $409,2 \pm 24 \text{ mg.L}^{-1}$, nas 1ª e 2ª fases, respectivamente).

Todos os outros ácidos orgânicos analisados apresentaram concentração inicial nos ensaios, que, igual a cepa CC425, não foi detectada produção por apresentarem resultados finais semelhantes.

O etanol foi produzido em maior concentração durante a fase de produção de hidrogênio, e a produção durante a primeira fase não apresentou diferença com a inicial ($17,5 \text{ mg.L}^{-1}$). Na menor radiação foi obtida concentração de $271,8 \pm 66,8 \text{ mg.L}^{-1}$ e na maior radiação $236,1 \pm 26,3 \text{ mg.L}^{-1}$, não havendo diferença entre elas.

Figura 50 - Concentração (mg.L^{-1}) de ácidos orgânicos e álcool pela cepa D66

D.0 – início do ensaio. Fim 1ª e 2ª f. – fim da primeira e segunda fases experimentais. Barras azuis indicam ensaio em $60 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e barras vermelhas indicam ensaio em $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Barras indicam desvio padrão ($n=3$).

Por fim, com a cepa SAG 24.91 (Figura 51), também houve assimilação significativa de ácido acético nas duas fases experimentais e nas duas radiações, comparada ao dia inicial do ensaio ($935,4 \pm 130 \text{ mg.L}^{-1}$). Não foi encontrada diferença nos consumos entre as radiações.

Na primeira e segunda fases em $60 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ as concentrações foram de $154,1 \pm 170$ e $59,7 \pm 9,8 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente, e

em $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ foi obtido $100,1 \pm 42,1 \text{ mg.L}^{-1}$ na primeira fase e $286,5 \pm 36,7 \text{ mg.L}^{-1}$ durante a produção de hidrogênio.

Conforme relatado anteriormente em relação aos demais ácidos orgânicos, para a cepa SAG 24.91 também não foi detectada a produção deles, uma vez que as concentrações finais foram semelhantes as do início do experimento, não havendo diferenças entre elas.

Figura 51 - Concentração (mg.L^{-1}) de ácidos orgânicos e álcool pela cepa SAG 24.91

D.0 – início do ensaio. Fim 1ª e 2ª f. – fim da primeira e segunda fases experimentais. Barras azuis indicam ensaio em $60 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e barras vermelhas indicam ensaio em $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Barras indicam desvio padrão ($n=3$).

A produção de etanol foi detectada tanto no início do ensaio quanto ao fim das fases experimentais. Diferente das demais cepas, a SAG 24.91 apresentou concentração inicial ($65,9 \pm 0 \text{ mg.L}^{-1}$) maior que as finais da primeira fase, nas duas radiações, embora não tenham apresentado diferença estatística. Este fato pode ter ocorrido devido à existência de etanol em culturas anteriores à esta e sua influência nos repiques de aumento de volume ou devido à erros de análise.

As concentrações de etanol ao fim da produção de hidrogênio foram significativamente maiores que a inicial, sendo que na menor radiação

obteve-se $202 \pm 33,4 \text{ mg.L}^{-1}$ e na maior radiação $204,2 \pm 79,2 \text{ mg.L}^{-1}$, não havendo diferenças entre elas.

De acordo com estes resultados, de maneira geral, pode-se observar que todas as cepas consumiram o ácido acético nas duas fases experimentais, com a única exceção da cepa N Ch03 na primeira fase, demonstrando que este componente é utilizado pela *Chlamydomonas* como fonte de carbono orgânico para o seu crescimento e relação com a produção de hidrogênio.

Todas estas cepas, além de produzirem hidrogênio, também são produtoras de etanol, importante subproduto para produção de biocombustível, embora a cepa que mais produz hidrogênio (CC425) produza menos etanol que as demais. Na radiação de $60 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a cepa CC124 apresentou produção significativamente maior que as cepas N Ch03 e CC425, e na radiação de $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ as cepas CC124 e D66 apresentaram produção maior, estatisticamente, que N Ch03. As demais produções de etanol não apresentaram diferença estatística entre as cepas.

5.2.2 *Anabaena* spp.

Os ensaios de produção de hidrogênio para *Anabaena* spp. foram realizados com três cepas a partir da biofotólise direta e indireta com privação de nitrogênio na segunda fase experimental. A primeira fase foi cultivada em meio de cultura BG-11 normal, porém com limitação de nitrogênio para estímulo de formação de heterocistos, em $60 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, e na segunda fase, as culturas nos fotobiorreatores foram mantidas em meio de cultura com privação de nitrogênio e troca do *headspace* por argônio, em duas radiações, 60 e $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, para a análise de produção de hidrogênio.

5.2.2.1 Produção de hidrogênio

Não foi possível obter resultados positivos com todas as cepas testadas, pois no ensaio com a cepa 2576, monitorado por 180 horas, não foi detectado produção de hidrogênio. Por isso, optou-se em encerrar o ensaio e não foram realizadas análises quanto à biomassa, análises bioquímicas e físico-químicas. Em relação às outras duas cepas de *Anabaena* spp. houve produção do gás de interesse.

O ensaio com a cepa 1444 (Figura 52) obteve duração de 204 horas e a produção de hidrogênio foi semelhante nas duas radiações, não havendo diferença estatística entre elas em todos os parâmetros analisados.

Figura 52 - Concentração de hidrogênio (mmol.L^{-1}) produzido pela cepa 1444, nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Barras indicam desvio padrão ($n=3$)

Embora não tenham apresentado diferenças entre as radiações, na maior intensidade houve melhores resultados. Na radiação de 60 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, a produção máxima de hidrogênio foi de $7,89 \pm 1,37 \text{ mmol.L}^{-1}$, produtividade de $39,61 \pm 7,17 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, μ_{max} de $0,203 \pm 0,021 \text{ h}^{-1}$ e volume máximo de $268,78 \pm 34,42 \text{ mL.L}^{-1}$ de cultura. Na radiação de 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, nesta mesma sequência, foram obtidos os seguintes

resultados: $8,34 \pm 0,23 \text{ mmol.L}^{-1}$, $42,37 \pm 2,45 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, μ_{max} de $0,217 \pm 0,039 \text{ h}^{-1}$ e $268,42 \pm 8,72 \text{ mL.L}^{-1}$ de cultura (Tabela 28).

Quanto à cepa 1448 (Figura 53), o ensaio também foi monitorado por 204 horas e de forma semelhante a cepa anterior, não houve diferença estatística entre as duas radiações quanto aos parâmetros de produção de hidrogênio (Tabela 28).

Tabela 28 - Parâmetros de produção de hidrogênio de todas as cepas de *Anabaena* spp. nas radiações 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Cepa	Rad. (μmol)	Produção máxima (mmol.L^{-1})	Volume máximo (mL)	Produtividade ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	μ_{max} (h^{-1})
1444	60	$7,89 \pm 1,37$	$268,78 \pm 34,42$	$39,61 \pm 7,17$	$0,203 \pm 0,021$
	200	$8,34 \pm 0,23$	$268,42 \pm 8,72$	$42,37 \pm 2,45$	$0,217 \pm 0,039$
1448	60	$8,22 \pm 0,46$	$273,26 \pm 16,19$	$42,56 \pm 0,93$	$0,180 \pm 0,015$
	200	$8,18 \pm 0,46$	$259,12 \pm 9,07$	$42,97 \pm 0,69$	$0,188 \pm 0,017$

Rad. indica radiação em $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Figura 53 - Concentração de hidrogênio (mmol.L^{-1}) produzido pela cepa 1448 nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Barras indicam desvio padrão (n=3)

Apesar de não apresentarem diferenças, as melhores produções e volumes máximos de hidrogênio ocorreram na menor radiação, $8,22 \pm 0,46$ mmol.L⁻¹ e $273,26 \pm 16,19$ mL.L⁻¹ de cultura, contra $8,18 \pm 0,46$ mmol.L⁻¹ e $259,12 \pm 9,07$ mL.L⁻¹ de cultura na maior radiação.

O mesmo não ocorreu com a produtividade, sendo o melhor resultado encontrado na radiação de $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $42,97 \pm 0,69 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, comparado a $42,56 \pm 0,93 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em $60 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Os valores de μ_{max} corroboram com o obtido nas produtividades, sendo esta melhor na maior radiação e inferior na radiação mais baixa, $0,180 \pm 0,015 \text{ h}^{-1}$ e $0,188 \pm 0,017 \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

Diante destes resultados e comparando as duas cepas quanto à produção de hidrogênio nas radiações de 60 e $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, separadamente (Figura 54, A e B, respectivamente), foi observado que não houve diferença estatística quanto a produção máxima de hidrogênio, produtividade, volume de hidrogênio máximo e μ_{max} (Tabela 28) entre elas.

Embora os resultados tenham sido semelhantes e sem diferenças estatísticas, a cepa 1448 apresentou menores desvios padrão em seus resultados, principalmente em relação à produtividade, enquanto a cepa 1444 apresentou alto desvio padrão na radiação mais baixa.

Além disso, a produtividade desta cepa foi ligeiramente superior à de 1444 nas duas radiações (Figura 55). Em contrapartida, as μ_{max} de 1444 foram superiores comparadas a de 1448. Porém, não houve diferenças significativas devido, provavelmente, aos desvios padrão no ensaio da cepa 1444 terem sido grandes, principalmente na menor radiação, em todos os parâmetros de produção de hidrogênio.

Portanto, de acordo com os resultados apresentados, optou-se em fazer a otimização da biomassa e produção de hidrogênio, na terceira etapa, com a cepa 1448, *Anabaena* sp., pois, diante das duas únicas cepas que se obtiveram resultados positivos, optou-se por aquela que demonstrou maior confiabilidade nos resultados, ou seja, que houve menor variação entre as triplicatas.

Figura 54 - Concentração de hidrogênio (mmol.L^{-1}) nas radiações de $60 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (A) e $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (B) produzidos pelas cepas de *Anabaena* spp. Barras indicam desvio padrão ($n=3$)

Além disso, a cepa 1448 apresentou melhores produtividades neste ensaio e foi a única cepa que apresentou produção de hidrogênio em condição aeróbia e também nas condições de privação de nitrogênio com a troca gasosa do *headspace* por nitrogênio, embora os resultados foram abaixo do limite de detecção, demonstrou ser uma cepa com mais potencial para a produção de hidrogênio comparado as demais.

Figura 55 - Produção máxima de hidrogênio (mmol.L^{-1}) indicado por marcadores e produtividade ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) indicados por barras, nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, das cepas de *Anabaena* spp. Barras indicam desvio padrão ($n=3$).

5.2.2.2 Densidade celular e estimativa de biomassa

A densidade celular e a biomassa das cepas de *Anabaena* spp. foram estimadas durante os mesmos períodos em que foi realizado com as cepas de *Chlamydomonas* spp., ou seja, a densidade celular no início da segunda fase experimental (Tabela 29), e a biomassa nos dias iniciais das culturas (D.0), inicial da segunda fase experimental, e ao fim destas nas duas radiações (Tabela 30). As análises estatísticas também foram realizadas da mesma forma.

Em relação à densidade celular inicial dos fotobiorreatores para a fase de produção de hidrogênio (Tabela 29), nenhuma das duas cepas apresentou diferença significativa entre as duas radiações, desta forma, estas fases experimentais iniciaram-se semelhantes.

Ao comparar a densidade celular entre as cepas, foi observado diferença entre elas, tanto na radiação de 60 quanto na radiação de 200

$\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, sendo que a cepa 1448 ($2,8 \pm 0,59$ e $4,13 \pm 0,46 \times 10^5$ ind.mL^{-1} , em 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente) iniciou os fotobiorreatores com densidade celular significativamente maior aos de 1444.

Tabela 29 - Densidade celular (ind.mL^{-1}) ($\times 10^5$) no início da segunda fase experimental nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$

Cepa	Densidade celular	
	60	200
1444	$1,32 \pm 0,33$	$1,41 \pm 0,33$
1448	$2,8 \pm 0,59^a$	$4,13 \pm 0,46^b$

Letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

a: 1448 é diferente de 1444 em 60 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

b: 1448 é diferente de 1444 em 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

De forma semelhante à densidade celular, comparando a biomassa inicial dos fotobiorreatores entre estas duas cepas (Tabela 30), foram detectadas diferenças estatísticas quanto à densidade óptica e clorofila *a*, sendo elas superiores em 1448, com absorvância de $0,17 \pm 0,006$ e $2,79 \pm 0,74$ mg.L^{-1} de clorofila *a*, contra $0,13 \pm 0,02$ e $1,33 \pm 0,05$ mg.L^{-1} , respectivamente, para a cepa 1444.

Porém, o mesmo não pode ser dito sobre os sólidos suspensos totais, o qual não apresentou diferença inicial nesta fase entre as duas cepas (1444: $216,67 \pm 30,55$ mg.L^{-1} ; 1448: $206,67 \pm 7,98$ mg.L^{-1}).

Apesar de 1448 apresentar densidade celular, absorvância e clorofila *a* superiores estatisticamente à 1444, estas duas cepas não apresentaram diferenças quanto à produção máxima e produtividade de hidrogênio em nenhuma das duas radiações.

Foi observado que a absorvância das duas cepas aumentou ao fim do ensaio, porém, as concentrações de clorofila *a* ao fim do experimento de 1444, e de sólidos na maior radiação para 1444 e na menor radiação para 1448, mantiveram-se. A cepa 1448 obteve um decaimento nas concentrações de clorofila *a* ao fim dos ensaios nas duas radiações, e também na concentração de sólidos em 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, apesar do

aumento da absorbância (Tabela 30). Em todos os ensaios as culturas nos fotobiorreatores ficaram amareladas.

Tabela 30 - Estimativa de biomassa por absorbância (750 nm), sólidos (mg.L⁻¹) e clorofila *a* (mg.L⁻¹)

Cepa	Período	Absorbância (750 nm)	Sólidos (mg.L ⁻¹)	Clorofila <i>a</i> (mg.L ⁻¹)
1444	D. 0	0,025 ± 0,00	42,00 ± 0,00	0,20 ± 0,00
	Inicial	0,13 ± 0,02	216,67 ± 7,46	1,33 ± 0,05
	Final - 60	0,19 ± 0,005	206,67 ± 30,55	1,40 ± 0,12
	Final - 200	0,19 ± 0,01	240,00 ± 0,00	1,99 ± 0,85
1448	D. 0	0,020 ± 0,00	32 ± 0,00	0,20 ± 0,00
	Inicial	0,17 ± 0,006 ^a	206,67 ± 7,98	2,79 ± 0,74 ^a
	Final - 60	0,27 ± 0,01	220,00 ± 20,00	1,16 ± 0,38
	Final - 200	0,27 ± 0,03	140,00 ± 20,00	1,34 ± 0,18

D.0 – representa o dia 0, início da primeira fase experimental. Inicial – início da segunda fase experimental. Final – 60 e 200 – o fim da segunda fase experimental nas radiações 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$):

a: Diferença estatística significativa de 1448 com 1444.

Portanto, de acordo com o apresentado, foi observado que a cepa que apresentou melhor desempenho quanto à densidade celular e a produção de biomassa, em termos de clorofila *a* e absorbância (1448), não demonstrou diferença em relação à biomassa por sólidos e produção de hidrogênio com a outra cepa de *Anabaena* sp. testada (Figura 56).

Figura 56 - Produção máxima de hidrogênio (mmol.L^{-1}) indicado por marcadores e sólidos no início e fim da segunda fase experimental (mg.L^{-1}) indicados por barras, nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, das cepas de *Anabaena* spp. Barras indicam desvio padrão ($n=3$).

5.2.2.3 Análises bioquímicas

Foram realizadas análises bioquímicas da biomassa seca das culturas para carboidrato e proteína, no início e fim da segunda fase experimental, e estes resultados foram comparados estatisticamente para averiguar consumo ou produção destes elementos durante a produção de hidrogênio.

As duas cepas demonstraram aumento significativo em sua composição, em percentagens (mg.L^{-1}), de carboidrato (Figura 57 – A), comparando o início com o fim da segunda fase experimental.

A cepa 1444 iniciou esta fase com $25,46 \pm 6,14 \%$, e encerrou com $46 \pm 4,67 \%$, na menor radiação e $38,23 \pm 2,6 \%$, na maior radiação, havendo diferença estatística entre o início e fins do ensaio, e não houve diferença na porcentagem final entre as radiações, embora em 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ tenha ocorrido menor produção de carboidrato.

Figura 57 - Porcentagem (mg.L^{-1}) de carboidrato (A) e proteína (B) no início (inicial) e fim da segunda fase experimental nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, das cepas de *Anabaena* spp. Barras indicam desvio padrão ($n=3$)

Quanto à cepa 1448, obteve no início da segunda fase experimental $39,65 \pm 1,56$ % de sua biomassa em carboidrato, aumentando significativamente para $47,48 \pm 2,05$ % em 60 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, e $47,2 \pm 0,67$ % em 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. No fim do ensaio, não houve diferença estatística entre as duas radiações, demonstrando produção semelhante de carboidrato.

Não foi encontrado o mesmo padrão com as percentagens de proteína nas biomassas destas duas cepas (Figura 57 – B), pois não houve produção e nem consumo deste elemento, não havendo diferenças estatísticas entre os valores iniciais e finais nas duas radiações.

A cepa 1444 iniciou a segunda fase experimental com $19,26 \pm 1,57$ % e ao fim do ensaio apresentou $19,43 \pm 0,71$ % e $17,1 \pm 0,33$ %, na menor e maior radiação, respectivamente, enquanto que a cepa 1448 obteve $20,99 \pm 1,28$ % de carboidrato em sua biomassa no início da segunda fase e no fim $20,96 \pm 0,87$ % e $20,18 \pm 1,18$ %, na mesma sequência. Nenhuma das duas cepas apresentou diferença quanto ao percentual final dos experimentos entre as intensidades.

Estes resultados de carboidrato corroboram com os de aumento de biomassa, comparando o início da segunda fase experimental com o seu fim. Além disso, quanto aos resultados de proteína, as cepas de *Anabaena* spp. mostraram-se diferentes do ocorrido com as cepas de *Chlamydomonas* spp., em que durante a produção de hidrogênio, houve consumo de proteína.

5.2.2.4 Análises físico-químicas

Foram analisadas as mesmas variáveis físico-químicas e durante os mesmos períodos dos ensaios de *Chlamydomonas* spp., sendo eles pH e disponibilidade de nutrientes e remoção destes (nitrato, ortofosfato e demanda química de oxigênio). A análise estatística também foi realizada da mesma forma, a respeito da remoção de nutrientes durante o ensaio inteiro e durante a fase de produção de hidrogênio (2ª fase), entre as cepas e para cada radiação.

No início da segunda fase experimental, o meio de cultura foi renovado para que houvesse a transferência apenas da biomassa para os fotobiorreatores na condição adequada para a produção de hidrogênio, restabelecendo, portanto, a concentração inicial de nutrientes disponíveis às

culturas, exceto quanto às concentrações de nitrato, que foi privado durante esta fase.

Na Tabela 31 constam os resultados obtidos de pH, iniciais e finais dos ensaios, e as concentrações de nitrato, ortofosfato e DQO, no início de cada ensaio e ao fim da primeira e segunda fase experimental. A remoção de nitrogênio, fósforo e DQO calculadas em porcentagem de suas concentrações estão apresentadas na Tabela 32 a seguir.

Tanto com a cepa 1444 quanto com a 1448, houve queda nos valores de pH comparando o início (9,2) com o fim do experimento, tornando-se um meio ácido. Nesta primeira, os pH finais foram de $6,35 \pm 0,06$ e $6,46 \pm 0,07$, enquanto que a outra cepa apresentou pH de $6,38 \pm 0,07$ e $6,32 \pm 0,04$, nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente (Tabela 31).

As concentrações de nitrato no dia zero de ensaio para as duas cepas iniciaram acima da limitação de nitrogênio proposta (10 mg.L^{-1}) devido, provavelmente, à influência deste elemento dos repiques anteriores em que não houve limitação de nitrogênio. Apesar disso, foi possível observar a formação de heterocistos nas culturas ao fim da primeira fase experimental, como desejado (Figura 58).

Figura 58 - Cultura de 1448 com heterocistos, representando o fim da primeira fase experimental, transferida para o fotobiorreator para iniciar a segunda fase experimental (aumento de 400x).

A cepa 1444 iniciou o ensaio com concentração de $33,9 \pm 0 \text{ mg.L}^{-1}$, e houve assimilação deste elemento durante a primeira fase experimental, encerrando-a com as concentrações de $26,45 \pm 0,49$ e $25,95 \pm 0,17 \text{ mg.L}^{-1}$

na menor e maior radiação, respectivamente. Embora na segunda fase experimental não havia adição de nitrato no meio de cultura, em seu final foram obtidos os resultados de $1,58 \pm 0,21$ e $1,27 \pm 0,02$ mg.L⁻¹, na mesma sequência de radiação.

A assimilação e os resultados das concentrações de nitrato do ensaio com a cepa 1448 foram semelhantes a cepa anterior, sendo que no início apresentou concentração de $32,6 \pm 0$ mg.L⁻¹, e em 60 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $25,63 \pm 0,82$ e $1,19 \pm 0,04$ mg.L⁻¹ no fim da primeira e segunda fases, respectivamente, e em 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, $25,60 \pm 0,26$ na primeira fase e $1,10 \pm 0,04$ mg.L⁻¹, na segunda fase experimental.

Tabela 31 - Variáveis físico-químicas do início ao fim dos ensaios: pH, nitrato (mg.L⁻¹), ortofosfato (mg.L⁻¹) e demanda química de oxigênio (g.L⁻¹)

Cepa	Período	pH	NO ₃ ⁻ (mg.L ⁻¹)	PO ₃ ⁻ (mg.L ⁻¹)	DQO (g.L ⁻¹)
1444	D.0	9,2 ± 0	33,9 ± 0	5,4 ± 0	1,78 ± 0
	fim 1ª f. - 60	*	26,45 ± 0,49	4,27 ± 0,06	1,57 ± 0,04
	fim 1ª f. - 200	*	25,95 ± 0,17	4,23 ± 0,06	1,67 ± 0,02
	fim 2ª f. - 60	6,35 ± 0,06	1,58 ± 0,21	6,7 ± 0,3	1,51 ± 0,06
	Fim 2ª f. - 200	6,46 ± 0,07	1,27 ± 0,02	6,3 ± 0,17	1,52 ± 0,06
1448	D.0	9,2 ± 0	32,6 ± 1	5,0 ± 0	1,81 ± 1
	fim 1ª f. - 60	*	25,63 ± 0,82	3,4 ± 0,17	1,72 ± 0,08
	fim 1ª f. - 200	*	25,60 ± 0,26	3,4 ± 0,26	1,70 ± 0,02
	fim 2ª f. - 60	6,38 ± 0,07	1,19 ± 0,04	4,83 ± 0,60	1,54 ± 0,02
	fim 2ª f. - 200	6,32 ± 0,04	1,10 ± 0,04	4,93 ± 0,32	1,59 ± 0,02

* Não foi detectado; D.0: representa o momento do inóculo da cultura, ou seja, início da primeira fase experimental; fim 1ª f. 60 e 200: representa o momento em que a biomassa foi transferida para o fotobiorreator, ou seja, o fim da primeira fase experimental; fim 60 e 200: representa o fim da segunda fase experimental; 60 e 200: $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Quanto à remoção de nitrogênio (Tabela 32), foi analisado apenas durante a primeira fase experimental, pois como houve privação deste

elemento durante a produção de hidrogênio, não foi possível determinar este dado.

Na menor radiação, a cepa 1444 conseguiu remover 10,98% de nitrogênio, enquanto que a cepa 1448 removeu 10,69%, não havendo diferença estatística entre elas. Já na maior radiação, esta primeira removeu significativamente mais que a segunda, com 11,73% contra 10,74%.

Tabela 32 - Remoção de nitrogênio (N), fósforo (P) e demanda química de oxigênio (DQO), em porcentagem por concentração, do ensaio total e da segunda fase experimental

Rad.	Cepas	Remoção N	Remoção P		Remoção DQO	
		(%) (mg.L ⁻¹)	(%) (mg.L ⁻¹)		(%) (g.L ⁻¹)	
		1ª fase exp.	Total	2ª f. exp.	Total	2ª f. exp.
60	1444	10,98	10,49	0,00	13,69 ^c	7,81
	1448	10,69	19,00 ^b	3,00	9,98	7,51
200	1444	11,73 ^a	10,80	0,00	10,64	7,50
	1448	10,74	17,67 ^b	1,67	9,40	6,18

Rad.: radiação de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Total – remoção durante todo o ensaio, durante a primeira e segunda fases juntas; 1ª fase exp. – primeira fase experimental; 2ª f. exp. – segunda fase experimental (produção de hidrogênio). Letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

a: 1444 é diferente de 1448 na remoção de nitrogênio em 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

b: 1448 é diferente de 1444 na remoção de fósforo nas duas radiações.

c: 1444 é diferente de 1448 na remoção de DQO em 60 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

A assimilação do ortofosfato ocorreu diferentemente do nitrato entre as duas cepas, pois a cepa 1448 assimilou mais ortofosfato, tanto na primeira quanto na segunda fase experimental, comparado a cepa 1444.

A cepa 1444 iniciou o ensaio com $5,4 \pm 0 \text{ mg.L}^{-1}$ de ortofosfato e finalizou a primeira fase experimental com $4,27 \pm 0,06$ e $4,23 \pm 0,06 \text{ mg.L}^{-1}$, enquanto que ao fim da segunda fase experimental apresentou $6,7 \pm 0,3$ e $6,3 \pm 0,17 \text{ mg.L}^{-1}$, nas menores e maiores radiações, respectivamente.

Diante desta assimilação, foi constatado que a remoção de fósforo só ocorreu durante a primeira fase do ensaio, 10,49 e 10,80 %, representado como remoção total na Tabela 32, por não ter ocorrido remoção de fósforo durante a produção de hidrogênio.

A concentração de ortofosfato inicial do ensaio com 1448 foi semelhante a cepa anterior, $5,0 \pm 0 \text{ mg.L}^{-1}$ de ortofosfato e obteve assimilação deste componente durante as duas fases experimentais, sendo que na primeira apresentou concentrações finais de $3,4 \pm 0,17$ e $3,4 \pm 0,26 \text{ mg.L}^{-1}$, e na segunda, em menor proporção, de $4,83 \pm 0,6$ e $4,93 \pm 0,32 \text{ mg.L}^{-1}$, nas radiações de 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente.

Analizando a remoção do ensaio todo de fósforo (total na Tabela 32) por esta cepa, foi observado que na menor radiação atingiu 19% e na maior 17,67%, sendo esta remoção significativamente maior comparada à da cepa 1444. Na segunda fase experimental, 1448 também apresentou remoção de fósforo, mas sem diferença com 1444 devido, provavelmente ao desvio padrão.

A assimilação de carbono ocorreu nas duas fases experimentais e radiações pelas duas cepas. A cepa 1444 iniciou o ensaio com $1,78 \pm 0 \text{ g.L}^{-1}$ e ao fim da primeira fase as concentrações eram de $1,57 \pm 0,04$ e $1,67 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}$, em 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, enquanto que no fim da segunda fase experimental, nesta mesma sequência de radiações, foi obtido $1,51 \pm 0,06$ e $1,52 \pm 0,06 \text{ g.L}^{-1}$ de DQO (Tabela 31).

A cepa 1448 apresentou no início do ensaio DQO de $1,81 \pm 0 \text{ g.L}^{-1}$, e houve assimilação de carbono durante o ensaio, pois na menor radiação foram obtidas concentrações de $1,72 \pm 0,08$ e $1,70 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}$, e na maior radiação $1,54 \pm 0,02$ e $1,59 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}$, de DQO, ao fim das primeiras e segundas fases experimentais, respectivamente.

Em relação à remoção de DQO, as duas cepas apresentaram maior porcentagem durante a fase de produção de hidrogênio (Tabela 32), sendo que 1444 no ensaio total removeu 13,69 e 10,64 %, enquanto que durante a segunda fase removeu 7,81 e 7,50 %, em 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente.

A cepa 1448 obteve porcentagem de remoção total de DQO de 9,98 e 9,40 %, e durante a segunda fase experimental 7,51 e 6,18 %, nas menores e maiores radiações. A única diferença estatística encontrada entre as cepas

foi a remoção de DQO de 1444 superior a de 1448 no ensaio total na radiação de $60 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

De acordo com os resultados apresentados e de maneira geral (em síntese na Figura 59), as cepas 1444 e 1448 possuem capacidades semelhantes de remoção de compostos nitrogenados e de carbono, sendo este ultimo principalmente na fase de produção de hidrogênio, enquanto que em relação à compostos fosforados, a cepa 1448 tem maior potencial para sua remoção, embora tenha ocorrido maior percentual de remoção durante a primeira fase experimental.

Figura 59 - Remoção de nutrientes (%), nitrogênio, fósforo e DQO. Barras indicam remoção total durante o ensaio experimental e marcadores indicam a remoção durante a segunda fase experimental, nas radiações de 60 (A) e 200 (B) $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, das cepas de *Anabaena* spp. Barras indicam desvio padrão (n=3)

5.2.2.5 Análise de ácidos orgânicos e álcoois

As análises de ácidos orgânicos e álcoois foram realizadas de forma semelhante à *Chlamydomonas* e nos mesmos períodos do ensaio. De acordo com o limite de detecção do método foram relatados os resultados de álcool apenas na forma de etanol e os ácidos orgânicos foram acético, butírico, isovalérico e capróico.

A análise estatística foi realizada conforme os resultados mais relevantes, que são quanto à produção/consumo de ácido acético, ácido isovalérico e etanol, com a comparação do início dos ensaios, dia zero, com o fim das primeiras e segundas fases experimentais. Além disso, foi feita a comparação da produção de etanol entre as cepas ao fim dos ensaios.

A cepa 1444 (Figura 60) apresentou produção de ácido acético ao fim da segunda fase experimental, em $60 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($6,8 \pm 10,3 \text{ mg.L}^{-1}$), e ao fim das duas fases experimentais em $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($19,1 \pm 0,16$ e $11,5 \pm 14,5 \text{ mg.L}^{-1}$, na primeira e segunda fase, respectivamente), comparada ao início do ensaio, embora não tenham apresentado diferença estatística devido, provavelmente, ao desvio padrão por não ter tido produção de ácido acético em todos os fotobiorreatores da triplicata.

Além do ácido acético, foi observado que houve produção significativa de ácido isovalérico ao fim da fase de produção de hidrogênio nas duas radiações, havendo diferença com o início e fim da primeira fase experimental. Na menor radiação foi detectada concentração de $38,2 \pm 0,7 \text{ mg.L}^{-1}$, e na maior $38,4 \pm 0,07 \text{ mg.L}^{-1}$ de ácido isovalérico, não havendo diferença entre elas.

Em relação ao ácido butírico não foi observado produção ou consumo significativos comparado ao início dos ensaios ($36,7 \pm 0 \text{ mg.L}^{-1}$). Além disso, não houve produção de ácidos propiônico, isobutírico e capróico.

A produção de etanol foi detectada apenas ao fim da primeira fase experimental ($66,3 \pm 8,3$ e $56,9 \pm 1,3 \text{ mg.L}^{-1}$, em 60 e $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente, sem diferença entre elas), sendo as concentrações

significativamente maiores as iniciais e finais da segunda fase experimental, que foram, por sua vez, abaixo do limite de detecção.

Figura 60 - Concentração (mg.L^{-1}) de ácidos orgânicos e álcool pela cepa 1444

D.0 – início do ensaio. Fim 1ª e 2ª f. – fim da primeira e segunda fases experimentais. Barras azuis indicam ensaio em $60 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e barras vermelhas indicam ensaio em $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Barras indicam desvio padrão ($n=3$).

Quanto à cepa 1448 (Figura 61) houve produção de ácido acético apenas em um fotobiorreator ao fim da fase de produção de hidrogênio da triplicata na menor radiação, por isso o alto desvio padrão e não detecção de diferença estatística.

De forma semelhante à cepa anterior, também ocorreu produção de ácido isovalérico no fim da segunda fase experimental nas duas radiações, não havendo diferenças entre elas ($12,7 \pm 21,7$ e $37,5 \pm 0,2 \text{ mg.L}^{-1}$, em 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente). Porém, só foi observada diferença significativa da produção na maior radiação comparada ao início e fim da primeira fase, pois na menor radiação ocorreu o mesmo que a produção de ácido acético, com a produção de ácido isovalérico apenas por um fotobiorreator da triplicata.

Não foi detectada diferença entre o ácido butírico aos fins das fases experimentais com o início do ensaio. Diferentemente da cepa 1444, houve detecção da produção de ácido capróico, ao fim das fases em 60 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($16,7 \pm 14,4$ e $16,8 \pm 14,5$ mg.L^{-1} , nas primeira e segunda fases, respectivamente) e ao fim da primeira fase em 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ($8,4 \pm 14,5$ mg.L^{-1}), embora não tenham sido em todos das triplicatas. Quanto aos ácidos propiônico e isobutírico as concentrações foram abaixo do limite de detecção.

Figura 61 - Concentração (mg.L^{-1}) de ácidos orgânicos e álcool pela cepa 1448

D.0 – início do ensaio. Fim 1ª e 2ª f. – fim da primeira e segunda fases experimentais. Barras azuis indicam ensaio em 60 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e barras vermelhas indicam ensaio em 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Barras indicam desvio padrão ($n=3$).

A produção de etanol também foi detectada apenas ao fim da primeira fase experimental, semelhante a 1444, sendo a produção significativamente maior ao início do ensaio e fim da fase de produção de hidrogênio, com concentração de $84,1 \pm 28,5$ e $56,9 \pm 1,4$ mg.L^{-1} , na menor e maior radiação.

De acordo com estes resultados, foi possível observar que a produção de etanol ao fim da primeira fase pelas cepas 1444 e 1448 não apresentaram diferença estatística nas duas intensidades de radiação.

Além disso, a produção dos ácidos acético e isovalérico ao fim dos ensaios, de maneira geral, são uma hipótese para justificar a diminuição dos pH nos fotobiorreatores, e, além disso, a presença deles e de etanol, indicam possível ocorrência de fermentação durante os ensaios.

5.3 Terceira etapa

Ao fim da segunda etapa e escolhidas as melhores cepas de cada gênero de acordo com todos os parâmetros analisados, principalmente em relação à produtividade de hidrogênio, deu-se início à terceira etapa. As cepas selecionadas, como já mencionado, foram CC124, *Chlamydomonas reinhardtii* e 1448, *Anabaena* sp.

Esta etapa caracterizou-se em fazer a otimização do ensaio realizado na segunda etapa, inicialmente com a primeira fase experimental, com o intuito de melhorar o crescimento e obtenção de biomassa, e posteriormente, a otimização da segunda fase experimental, de produção de hidrogênio.

5.3.1 *Chlamydomonas reinhardtii*

5.3.1.1 Otimização da primeira fase experimental

A otimização da primeira fase experimental foi realizada para melhorar os rendimentos de biomassa com o intuito de que a maior quantia de biomassa nos fotobiorreatores, na segunda fase, fôsse proporcionar melhores produções de hidrogênio.

Para tanto, foi realizado um planejamento fatorial com ponto central, conforme descrito na seção 4.2.2.1 (Tabela 33) com variação de temperatura, pH, radiação e concentração de glicose, em dois níveis, além do ponto central em nível intermediário. O melhor resultado foi comparado

às condições físico-químicas utilizadas na primeira fase experimental da segunda etapa.

De acordo com as variáveis e níveis testados, foram obtidas 17 diferentes condições de cultivo, das quais foram analisadas as curvas de crescimento, rendimento de biomassa, por sólidos suspensos totais, e $\mu_{\max}$.

As curvas de crescimento (Figura 62) demonstraram, de maneira geral, que os melhores resultados foram obtidos com a temperatura de 32°C, na qual o crescimento foi mais rápido e com o pH 6,2 ao invés de 8,2. Independente da temperatura, também apresentaram melhores crescimento. O ponto central do planejamento apresentou melhor desempenho comparado à todas condições na temperatura de 24°C, sendo que o mesmo não foi observado com a maior temperatura.

Figura 62 - Curvas de crescimento em absorvância (A. U. λ 750 nm) do planejamento fatorial da otimização da primeira fase experimental de *Chlamydomonas reinhardtii*

Variação da temperatura (24 e 32°C), pH (6,2 e 8,2), radiação (200 e 500 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e concentração de glicose (0 e 1,05 g.L^{-1} – representada pelo número 1). Linhas contínuas representam condições em 24°C, linha pontilhada o ponto central (28°C, pH 7,2, 350 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 0,525 g.L^{-1} de concentração de glicose) e linhas tracejadas condições em 32°C. Barras indicam desvio padrão (n=3).

Porém, as culturas foram aclimatadas em cada condição testada, por isso iniciaram o ensaio com absorbâncias e biomassas diferentes. Desta forma, melhor análise destes resultados deve-se com o rendimento da biomassa em sólidos (Figura 63).

O rendimento em sólidos demonstrou que, de forma semelhante as curvas de crescimento, *C. reinhardtii* tem melhor desempenho em pH 6,2, tanto em 24°C quanto em 32°C, havendo diferença significativa entre elas. As condições 1, 2, 3 e 4 têm melhor rendimento comparado às 5, 6, 7 e 8, e, além disso, 1 e 2 são superiores à 3, na temperatura de 24°C. Quanto a 32°C, as diferenças entre o pH ocorreram em maiores rendimentos, nas condições de 10 e 11 com as condições de 15, 16 e 17, e a condição 13 com a 16.

Figura 63 - Rendimento da biomassa em sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}) do planejamento fatorial da otimização da primeira fase experimental de *Chlamydomonas reinhardtii*

Tons de vermelho representam pH 6,2, tons de azul pH 8,2, e em cinza, o ponto central, com pH 7,2. radiações de 200, 350 e 500 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e concentrações de glicose de 0, 0,525 e 1,05 g.L^{-1} – representadas pelos número 0, 0,5 e 1, respectivamente. Barras indicam desvio padrão ($n=3$).

Embora todas as condições testadas na temperatura de 32°C tivessem rendimento maior, apenas as condições 10 e 11 ($1060 \pm 58,9$ e $1073,3 \pm 23,1$ mg.L⁻¹, respectivamente) (Tabela 33) foram as que tiveram rendimento significativamente maior à todas as demais, com exceção das condições 13 e 14, e não houve diferença entre elas.

Tabela 33 - Condições e $\mu_{\max}$ (d⁻¹) do planejamento fatorial com ponto central de *Chlamydomonas reinhardtii*

Temperatura (°C)	pH	Radiação ($\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	Adição de Glicose (g.L ⁻¹)	Condição	$\mu_{\max}$ (d ⁻¹)
24	6,2	200	0	1	$1,05 \pm 0,01^a$
			1,05	2	$0,93 \pm 0,06^b$
		500	0	3	$0,90 \pm 0,03^c$
			1,05	4	$0,85 \pm 0,03$
	8,2	200	0	5	$0,86 \pm 0,07$
			1,05	6	$0,74 \pm 0,05$
		500	0	7	$0,74 \pm 0,09$
			1,05	8	$0,79 \pm 0,04$
28	7,2	350	0,525	9	$0,97 \pm 0,04^b$
32	6,2	200	0	10	$1,39 \pm 0,13^d$
			1,05	11	$1,51 \pm 0,08^e$
		500	0	12	$1,28 \pm 0,05^f$
			1,05	13	$1,25 \pm 0,03^f$
	8,2	200	0	14	$1,02 \pm 0,02$
			1,05	15	$1,10 \pm 0,08$
		500	0	16	$0,90 \pm 0,09$
			1,05	17	$1,03 \pm 0,08$

Letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

a: Diferença condição 1 com condições: 3, 4, 5, 6, 7, e 8.

b: Diferença condições 2 e 9 com condições: 6, 7, e 8.

c: Diferença condição 3 com condições: 6 e 7.

d: Diferença condição 10 com condições: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 16 e 17.

e: Diferença condição 11 com condições: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16 e 17.

f: Diferença condições 12 e 13 com condições: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 14, 16 e 17.

De acordo com estes resultados, observa-se também, os melhores rendimentos na radiação de 200 comparado a 500 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, enquanto que não foi observado influência significativa da adição de glicose.

O ponto central do planejamento fatorial (condição 9), apresentou rendimento de biomassa significativamente maior ($975,8 \pm 90,9 \text{ mg.L}^{-1}$) comparado à todas condições testadas na temperatura de 24°C , porém, comparado à maior temperatura, não houveram diferenças estatísticas, apenas na condição 16 ($749,6 \pm 93,8 \text{ mg.L}^{-1}$).

Embora o ponto central não tenha apresentado diferença com as condições de 32°C quanto ao rendimento, houveram diferenças quanto a μ_{max} (Tabela 33), sendo ela inferior ($0,97 \pm 0,04 \text{ d}^{-1}$) comparada a todas as condições nessa temperatura com o pH 6,2. A μ_{max} foi maior na condição 9 comparada apenas as condições 6, 7 e 8.

De forma semelhante ao rendimento de biomassa, as μ_{max} das condições 10 e 11 ($1,39 \pm 0,13$ e $1,51 \pm 0,08 \text{ d}^{-1}$, respectivamente) foram maiores estatisticamente a todas as demais, e não houve diferença entre elas. A exceção ocorreu entre a condição 10 com 12 e 13, entre as quais não houve diferença. Estes resultados demonstram, novamente, a não influência da adição de glicose no meio de cultura, na concentração testada e a interação entre pH e temperatura.

A análise do diagrama de Pareto (Figura 64) confirmaram a interação entre os fatores pH e temperatura em relação à biomassa, havendo diferença significativa nas condições entre eles. Além disso, não houve interação destes fatores com a adição de glicose e melhor rendimento em $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, confirmando os resultados apresentados.

Portanto, diante do diagrama de Pareto, análise de rendimentos de biomassa e μ_{max} , optou-se em realizar os cultivos da primeira fase experimental, para a otimização da produção de hidrogênio, em 32°C , com pH 6,2, radiação de $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, e sem adição de glicose.

Figura 64 – Diagrama de Pareto com a interação dos fatores e análise de Bonferroni de *C. reinhardtii*

5.3.1.1.1 Comparação da otimização da biomassa com a primeira fase experimental da segunda etapa

Fez-se um teste para comprovar o resultado obtido com a otimização do crescimento e obtenção de biomassa, comparando com as condições físico-químicas em que eram realizados na primeira fase experimental na segunda etapa do trabalho, ou seja, a melhor condição encontrada na otimização (32°C , pH 6,2, $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, e sem adição de glicose) foi comparada ao crescimento em 24°C , pH 7,2 e $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Os resultados demonstraram que foi possível melhorar o crescimento e obtenção de biomassa na primeira fase experimental. De acordo com as curvas de crescimento (Figura 65 - A), em absorbância, foi observada a maior angulação da curva e antecipação da fase estacionária demonstrando portanto, crescimento mais rápido com a otimização da biomassa comparada às condições utilizadas na segunda etapa.

Para comprovar o observado, fez-se o rendimento de biomassa por sólidos e cálculos das $\mu_{\max}$ (Figura 65 – B). Na segunda etapa, ao fim desta fase experimental, foi obtido rendimento de $477,5 \pm 23,7 \text{ mg.L}^{-1}$, enquanto que na otimização $547,2 \pm 23,7 \text{ mg.L}^{-1}$, sendo esta significativamente maior.

Figura 65 - Curvas de crescimento em absorbância (A.U. λ 750 nm) (A); e rendimento em sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}), em barras, e $\mu_{\max}$ (d^{-1}), em marcadores (B), comparando a primeira fase experimental da segunda etapa com a otimização desta fase da terceira etapa de *C. reinhardtii*

Em relação ao $\mu_{\max}$ o mesmo foi observado, em que houve aumento significativo, de $0,78 \pm 0,005 \text{ d}^{-1}$ para $1,40 \pm 0,03 \text{ d}^{-1}$, na segunda e terceira etapas, respectivamente.

Portanto, de acordo com esses resultados e as diferenças estatísticas entre os dados, é possível afirmar que houve melhoramento na obtenção da biomassa para a primeira fase experimental, que seria então utilizada para a otimização da produção de hidrogênio de *C. reinhardtii*.

5.3.1.2 Produção de hidrogênio

Para a otimização da segunda fase experimental com *C. reinhardtii* (CC425) foram feitas variações na radiação (60 e $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e concentração de enxofre (0 e $50 \mu\text{M}$), para que pudesse ser analisado se haveria melhor ponto compensatório entre a fotossíntese e respiração. O pH e a temperatura foram mantidos conforme o resultado obtido com a otimização da primeira fase experimental ($6,2$ e 32°C). Além disso, foi testada a fase de crescimento em que foram transferidas as biomassas para os fotobiorreatores, exponencial e estacionária (Tabela 7 e 34).

Tabela 34 - Variáveis testadas na otimização da produção de hidrogênio

Condição	Fase Crescimento	Enxofre (μM)	Radiação
1	Exponencial	0	60
2			200
3		50	60
4			200
5	Estacionária	0	60
6			200
7		50	60
8			200

Radiação: 60 e $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

O ensaio foi realizado simultaneamente para todas as condições e durou 180 horas. As curvas das concentrações de hidrogênio (mmol.L^{-1}) produzidas ao longo do tempo estão apresentadas na Figura 66 a seguir.

As maiores produções de hidrogênio ocorreram nas condições em que não houve adição de enxofre (1, 2, 5, e 6). Porém, ao compararmos estas produções, vê-se que a produção foi maior nas condições em que a biomassa transferida ao fotobiorreator estava na fase exponencial de crescimento. Para averiguar o observado, foi realizada análise estatística entre as condições testadas para todos os parâmetros analisados (Tabela 35).

Figura 66 - Concentração de hidrogênio (mmol.L^{-1}) produzido por *C. reinhardtii* nas 8 condições testadas para a otimização (Tabela 34). Barras indicam desvio padrão ($n=3$)

Em relação à produção máxima de hidrogênio, a segunda condição foi significativamente maior à todas as demais, atingindo $3,57 \pm 0,31 \text{ mmol.L}^{-1}$ de hidrogênio. A segunda maior produção, $2,67 \pm 0,03 \text{ mmol.L}^{-1}$, ocorreu em condição semelhante à anterior, porém, com a transferência da biomassa na fase estacionária (6), embora não tenha tido diferença com a condição 1 por ter apresentando produção próxima ($2,62 \pm 0,002 \text{ mmol.L}^{-1}$) (Figura 67).

O mesmo ocorreu com a produtividade e o volume de hidrogênio produzido por litro de cultura, sendo estes estatisticamente maiores na condição 2 comparada à todas as outras ($21,98 \pm 0,86 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $68,74 \pm 4,12 \text{ mL.L}^{-1}$ de cultura, respectivamente). Além disso, as condições 2 e 6 também foram as que apresentaram o segundo melhor resultado quanto à estes parâmetros, e não apresentaram diferença entre elas (Tabela 35 e Figuras 66 e 67).

Não foi observado o mesmo padrão quanto à μ_{max} , pois o melhor resultado foi encontrado para a condição 4 ($0,073 \pm 0,012 \text{ h}^{-1}$), apesar ter sido detectada diferença significativa apenas com as condições 3 e 7 ($0,041 \pm 0,011$ e $0,033 \pm 0,006 \text{ h}^{-1}$), além de ter sido próxima à melhor condição encontrada (2: $0,066 \pm 0,020 \text{ h}^{-1}$), sendo esta também diferente estatisticamente da condição 7.

De acordo com os resultados e levando em consideração a produtividade e produção máxima de hidrogênio (Figura 67) foi possível observar que a condição 2, obteve produção de hidrogênio 1,3 e produtividade 1,28 vezes, em média, maior que as condições 1 e 6. Comparado às demais condições, 7,6 e 6,8 vezes maior, em média, de produção e produtividade, respectivamente.

Tabela 35 - Parâmetros de produção de hidrogênio de *C. reinhardtii* nas 8 condições testadas para a otimização

Condição	Produção máxima (mmol.L ⁻¹)	Volume máximo (mL)	Produtividade ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	μ_{max} (h ⁻¹)
1	$2,62 \pm 0,002^a$	$52,45 \pm 1,58^a$	$15,45 \pm 0,22^a$	$0,042 \pm 0,004$
2	$3,57 \pm 0,31^b$	$68,74 \pm 4,12^b$	$21,98 \pm 0,86^b$	$0,066 \pm 0,020^c$
3	$0,56 \pm 0,03$	$12,31 \pm 1,26$	$3,65 \pm 0,19$	$0,041 \pm 0,011$
4	$0,38 \pm 0,02$	$8,14 \pm 0,13$	$3,32 \pm 0,14$	$0,073 \pm 0,012^d$
5	$0,58 \pm 0,09$	$11,08 \pm 3,44$	$4,09 \pm 0,33$	$0,046 \pm 0,004$
6	$2,67 \pm 0,03^a$	$55,25 \pm 5,93^a$	$15,14 \pm 1,41^a$	$0,047 \pm 0,007$
7	$0,44 \pm 0,05$	$10,12 \pm 0,92$	$2,91 \pm 0,37$	$0,033 \pm 0,006$
8	$0,46 \pm 0,02$	$9,92 \pm 0,60$	$3,69 \pm 0,77$	$0,049 \pm 0,009$

Condições de 1 a 8 descritas na Tabela 35. Letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

a: Condições 1 e 6 não tem diferenças. Estas são diferentes das condições: 3, 4, 5, 7 e 8.

b: Condição 2 diferente das condições: 1, 3, 4, 5, 6, 7 e 8.

c: Condição 2 é diferente da condição 7.

d: Condição 4 diferente das condições: 3 e 7.

Figura 67 - Produção máxima de hidrogênio (mmol.L^{-1}) indicado por marcadores e produtividade ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) indicados por barras, nas 8 condições testadas (Tabela 34) para otimização da produção de hidrogênio por *C. reinhardtii*. Barras indicam desvio padrão ($n=3$)

Por fim, observou-se que a condição que apresentou os melhores resultados, sem adição de enxofre, radiação de $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e com transferência de biomassa na fase exponencial de crescimento, assemelha-se à utilizada na segunda fase experimental da segunda etapa, diferenciando apenas nas condições de temperatura e pH estabelecidos com a otimização da primeira fase.

5.3.1.3 Densidade celular e estimativa de biomassa

A densidade celular nas oito condições testadas na otimização (Tabela 34) foi estimada no início da segunda fase experimental, para a montagem dos fotobiorreatores. Como esperado, nas condições de 1 a 4, as densidades foram menores, por estarem na fase exponencial de crescimento, e as de 5 a 8, maiores, na fase estacionária de crescimento, não havendo diferenças entre as condições em suas respectivas fases (Tabela 36).

Tabela 36 - Densidade celular (ind.mL⁻¹) ($\times 10^6$) no início da segunda fase experimental nas 8 condições de *C. reinhardtii*

Condição	Densidade celular
1	5,63 $\pm$ 0,90
2	7,35 $\pm$ 2,36
3	8,02 $\pm$ 1,27
4	6,60 $\pm$ 1,18
5	10,68 $\pm$ 2,30
6	9,65 $\pm$ 1,85 ^a
7	11,35 $\pm$ 0,65 ^b
8	11,08 $\pm$ 0,96 ^a

Letras indicam diferença estatísticas ($p < 0,05$)

a: condições 6 e 8 são diferentes da condição 1.

b: condição 7 é diferente das condições: 1, 2 e 4.

Porém, foram observadas diferenças estatísticas na densidade celular quando comparadas as fases de crescimento, sendo que as condições 6 e 8 ($9,65 \pm 1,85 \times 10^6$ e $11,08 \pm 0,96 \times 10^6$ ind.mL⁻¹, respectivamente) apresentaram densidade superior à condição 1, e a condição 7 ($11,35 \pm 0,65 \times 10^6$ ind.mL⁻¹) com maior densidade em relação as condições 1, 2 e 4.

Quanto à biomassa, estimada no início e fim da segunda fase experimental (Tabela 37), fez-se análise estatística comparando a biomassa inicial dos fotobiorreatores entre as condições, e foi observado que, de forma semelhante à densidade celular, as condições de 5 a 8, apresentaram maior biomassa, por estarem na fase estacionária, que as condições de 1 a 4.

Comparando a biomassa entre as condições em que os fotobiorreatores foram montados na fase exponencial não houve diferença estatística em nenhuma das formas de estimativa de biomassa, da mesma forma que, entre as condições da fase estacionária, também não foi observada diferença.

Contudo, ao comparar as condições entre as fases, houve diferença estatística das quatro condições na fase estacionária (de 5 a 8) com as quatro da fase exponencial (de 1 a 4) na absorbância inicial e clorofila *a*, sendo nestas primeiras superiores. As absorbâncias atingidas foram de $1,02 \pm 0,01$, $0,99 \pm 0,01$, $0,99 \pm 0,001$ e $1,00 \pm 0,002$ e as concentrações de

clorofila *a* de $22,72 \pm 2,53$, $21,20 \pm 2,25$, $22,20 \pm 1,65$ e $24,17 \pm 1,07$ mg.L⁻¹, nas condições 5, 6, 7 e 8, respectivamente.

Tabela 37 - Estimativa de biomassa por absorvância (750 nm), sólidos (mg.L⁻¹) e clorofila *a* (mg.L⁻¹) de *C. reinhardtii*

Condição	Período	Absorvância (750 nm)	Sólidos (mg.L ⁻¹)	Clorofila <i>a</i> (mg.L ⁻¹)
TODOS	D.0	$0,076 \pm 0,00$	$72,0 \pm 0,00$	$1,34 \pm 0,00$
1	Inicial	$0,78 \pm 0,02$	$760,0 \pm 60$	$12,58 \pm 0,20$
	Final	$0,84 \pm 0,08$	$783,3 \pm 83,3$	$13,81 \pm 2,70$
2	Inicial	$0,82 \pm 0,05$	$820,0 \pm 34,6$ *	$13,32 \pm 1,41$
	Final	$0,75 \pm 0,08$	$625,0 \pm 11,8$	$7,96 \pm 1,29$
3	Inicial	$0,83 \pm 0,05$	$766,7 \pm 57,7$	$13,71 \pm 2,29$
	Final	$1,12 \pm 0,03$	$1180,0 \pm 40$ *	$24,69 \pm 1,29$ *
4	Inicial	$0,83 \pm 0,06$	$840,0 \pm 52,9$	$15,17 \pm 1,00$
	Final	$1,03 \pm 0,03$	$1172,2 \pm 344,1$	$20,01 \pm 2,84$ *
5	Inicial	$1,02 \pm 0,01$ ^a	$1033,3 \pm 50,3$ ^a	$22,72 \pm 2,53$ ^a
	Final	$1,14 \pm 0,04$	$1088,9 \pm 78,8$	$26,09 \pm 0,17$
6	Inicial	$0,99 \pm 0,01$ ^a	$980,0 \pm 80,0$ ^b	$21,20 \pm 2,25$ ^a
	Final	$1,00 \pm 0,03$	$905,5 \pm 25,4$	$14,62 \pm 0,78$
7	Inicial	$0,99 \pm 0,001$ ^a	$973,3 \pm 30,5$ ^b	$22,20 \pm 1,65$ ^a
	Final	$1,24 \pm 0,03$	$1316,7 \pm 66,7$ *	$29,40 \pm 0,30$ *
8	Inicial	$1,00 \pm 0,002$ ^a	$986,7 \pm 70,2$ ^c	$24,17 \pm 1,07$ ^a
	Final	$1,17 \pm 0,01$	$1138,9 \pm 50,9$ *	$21,43 \pm 0,94$ *

D.0 – representa o dia 0, início da primeira fase experimental. Inicial – início da segunda fase experimental. Final – fim da segunda fase experimental nas 8 condições. Letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$):

*: diferença entre a biomassa no início e fim da segunda fase experimental.

a: condições 5, 6, 7 e 8 não tem diferença entre elas e estas são diferentes de: 1, 2, 3 e 4.

b: condições 6 e 7 não tem diferença entre elas e estas são diferentes de: 1 e 3.

c: condições 8 é das condições: 1, 2 e 3.

Em relação aos sólidos suspensos totais, a condição 5 ($1,033,3 \pm 50,3$ mg.L⁻¹) foi superior à todas as condições da fase exponencial, enquanto que

as condições 6 e 7 ($980,0 \pm 80,0$ e $973,3 \pm 30,5$ mg.L⁻¹, respectivamente) foram significativamente superiores apenas às 1 e 3, e por fim, a condição 8 ($986,7 \pm 70,2$ mg.L⁻¹), não foi maior apenas quando comparada à 4.

Além dessas diferenças, foi observado que nas condições em que houve adição de enxofre (3, 4, 7 e 8) a biomassa final foi superior à inicial no fotobiorreator. A análise estatística feita para sólidos e clorofila *a* entre as concentrações finais e iniciais apontou concentrações maiores de clorofila *a* ao fim dos ensaios nas quatro condições, e para sólidos, nas condições 3, 7 e 8, embora a condição 4 não tenha apresentado diferença, a concentração final também foi superior à inicial (Tabela 37 e Figura 68).

Figura 68 - Produção máxima de hidrogênio (mmol.L⁻¹) indicado por marcadores e sólidos no início e fim da segunda fase experimental (mg.L⁻¹) indicados por barras, nas 8 condições. Barras indicam desvio padrão (n=3).

Estes dados demonstram que, possivelmente, a adição de enxofre tenha prejudicado o ponto compensatório entre fotossíntese e respiração, contribuindo para menor produção de hidrogênio. Além disso, foi observado que as condições que mais produziram hidrogênio (1, 2 e 6) apresentaram redução em suas biomassas ao fim do ensaio, de forma semelhante ao ocorrido na segunda etapa, embora na primeira condição, as concentrações

iniciais e finais foram equivalentes. Na segunda condição, a biomassa inicial foi significativamente maior à final (Figura 68).

5.3.1.4 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas da biomassa seca, proteína e carboidrato, realizadas para o início da segunda fase experimental das condições de 1 a 4, representando a fase exponencial, e no início das condições de 5 a 8, representando a fase estacionária de crescimento, e ao fim dos ensaios, foram comparadas em porcentagem de suas concentrações (mg.L^{-1}) (Figura 69).

Quanto ao carboidrato (Figura 69 – A), foi observado que nas condições de 1 à 4 houve redução em suas concentrações finais comparada ao início, sendo que 26,6% da biomassa inicial para estas condições correspondiam à carboidrato, e encerraram o experimento com 20,5, 15,3, 21,3 e 16,6 %. Apesar desta redução, houve diferença estatística apenas nas condições 2 e 4.

Para as demais condições, o início da concentração de carboidrato foi de 18%, e ao fim dos ensaios das condições 5, 6 e 7 houve aumento para 24,2, 22,4 e 30,9 %, respectivamente, enquanto que a condição 8 manteve a concentração (18%). Apesar disso, a diferença estatística entre o início e fim houve apenas para as condições 5 e 7.

Em relação às percentagens de concentração de proteína (Figura 69 – B), ocorreu o mesmo que na segunda etapa, pois em todas as condições houve consumo significativo de proteína comparando o início da segunda fase experimental (37,4% para as condições de 1 a 4, e 38,2% para as condições de 5 a 8) com o fim dos ensaios.

Os três maiores consumos de proteína ao fim dos ensaios ocorreram nas condições em que houve maior produção de hidrogênio (1, 2 e 6), e a maior redução significativa de carboidrato da biomassa ocorreu na segunda condição, que apresentou melhor produtividade e produção de hidrogênio.

Figura 69 - Porcentagem (mg.L^{-1}) de carboidrato (A) e proteína (B) no início (inicial) e fim da segunda fase experimental nas 8 condições de otimização de *C. reinhardtii*. Barras indicam desvio padrão ($n=3$).

5.3.1.5 Análises físico-químicas

As variáveis físico-químicas (Tabela 38) foram analisadas no início dos ensaios, dia zero, e ao fim da primeira e segunda fases experimentais, e a análise estatística para comparar a porcentagem de remoção de nutrientes (Tabela 39). É válido lembrar que na segunda fase experimental foi utilizado um novo meio de cultura, havendo apenas transferência de biomassa para o fotobiorreator.

Nas oito condições analisadas houve elevação do pH ao fim dos ensaios comparado ao inicial, sendo que nas condições em que foram adicionadas enxofre o pH se apresentou maior (3 - $8,02 \pm 0,07$; 4 - $8,09 \pm 0,03$; 7 - $8,02 \pm 0,15$; 8 - $8,12 \pm 0,05$) comparada as demais condições. O fotobiorreator com menor pH foi o que obteve a melhor produção de hidrogênio (condição 2 – pH de $7,32 \pm 0,19$) (Tabela 38).

Em todas as condições testadas houve assimilação de amônio durante a primeira fase experimental comparada à concentração inicial dos ensaios ($94,95 \text{ mg.L}^{-1}$). Porém o mesmo não ocorreu durante a segunda fase experimental, sendo que assimilação deste componente só foi observada nas condições em que havia adição de enxofre e que foram transferidas para os fotobiorreatores durante a fase exponencial de crescimento (condições 3 e 4).

Ao observar a porcentagem de remoção de nitrogênio durante o ensaio, em relação à concentração de nitrogênio amoniacal, houve remoção significativa durante a produção de hidrogênio apenas nas condições 3 e 4. E a remoção de nitrogênio foi significativamente maior nas condições 5, 6, 7 e 8 comparadas às condições 1, 2 e 4, devido, provavelmente, à maior biomassa por terem sido transferidas aos fotobiorreatores na fase estacionária. As condições 1 e 2, sem adição de enxofre e transferidas na fase exponencial, foram as que reduziram menos nitrogênio.

A assimilação de ortofosfato ocorreu durante as duas fases experimentais em todas as condições, comparada à concentração inicial ($35,6 \text{ mg.L}^{-1}$) dos ensaios, porém, durante a produção de hidrogênio, a assimilação deste componente foi maior. Isto pode ser observado melhor de acordo com os resultados obtidos de remoção de fósforo (Tabela 39).

Todas as condições testadas apresentaram maior remoção de fósforo durante a segunda fase experimental. Apesar disso, tanto nesta fase, quanto em relação ao ensaio total, as remoções de todas as condições foram significativamente maiores comparada as condições 2 (30,90% total, e 21,91%, 2ª fase) e 6 (41,39% total, e 24,91%, 2ª fase), que são semelhantes, modificando apenas a fase de crescimento em que as

biomassas foram transferidas. Além disso, foram as que obtiveram os melhores resultados de produção de hidrogênio.

Tabela 38 - Variáveis físico-químicas do início ao fim dos ensaios de otimização de *C. reinhardtii*: pH, nitrogênio amoniacal (mg.L^{-1}), ortofosfato (mg.L^{-1}) e demanda química de oxigênio (g.L^{-1})

Condições	Período	pH	NH_4^+ (mg.L^{-1})	PO_3^- (mg.L^{-1})	DQO (g.L^{-1})
Todos	D.0	$7,2 \pm 0$	$94,95 \pm 0$	$35,6 \pm 0$	$4,20 \pm 0$
1	fim 1ª f.	*	$64,08 \pm 3,79$	$30,27 \pm 1,29$	$3,72 \pm 0,04$
	fim 2ª f.	$7,52 \pm 0,09$	$114,70 \pm 1,32$	$6,8 \pm 2,12$	$3,99 \pm 0,06$
2	fim 1ª f.	*	$59,88 \pm 5,77$	$28,4 \pm 1,83$	$3,54 \pm 0,21$
	fim 2ª f.	$7,34 \pm 0,19$	$110,07 \pm 17,76$	$15,2 \pm 8,65$	$4,01 \pm 0,19$
3	fim 1ª f.	*	$45,16 \pm 0,98$	$29,07 \pm 0,23$	$3,59 \pm 0,13$
	fim 2ª f.	$8,02 \pm 0,07$	$89,14 \pm 1,01$	$4,53 \pm 1,01$	$3,75 \pm 0,06$
4	fim 1ª f.	*	$59,22 \pm 3,90$	$28,0 \pm 1,74$	$3,52 \pm 0,31$
	fim 2ª f.	$8,09 \pm 0,03$	$90,60 \pm 1,78$	$6,13 \pm 1,01$	$3,89 \pm 0,04$
5	fim 1ª f.	*	$43,72 \pm 2,17$	$23,2 \pm 0,40$	$3,23 \pm 0,07$
	fim 2ª f.	$7,88 \pm 0,07$	$113,80 \pm 2,34$	$9,33 \pm 2,01$	$3,77 \pm 0,06$
6	fim 1ª f.	*	$46,70 \pm 2,,2$	$23,87 \pm 0,83$	$3,28 \pm 0,07$
	fim 2ª f.	$7,61 \pm 0,08$	$118,67 \pm 1,90$	$17,87 \pm 2,05$	$3,98 \pm 0,15$
7	fim 1ª f.	*	$42,33 \pm 2,73$	$22,53 \pm 1,28$	$3,28 \pm 0,07$
	fim 2ª f.	$8,02 \pm 0,15$	$95,62 \pm 3,83$	$10,0 \pm 2,12$	$3,50 \pm 0,18$
8	fim 1ª f.	*	$43,78 \pm 2,31$	$23,60 \pm 1,39$	$3,32 \pm 0,04$
	fim 2ª f.	$8,12 \pm 0,05$	$98,88 \pm 1,95$	$10,0 \pm 1,44$	$3,86 \pm 0,10$

* Não foi detectado; D.0: representa o momento do inóculo da cultura, ou seja, início da primeira fase experimental; fim 1ª f.: representa o momento em que a biomassa foi transferida para o fotobiorreator, ou seja, o fim da primeira fase experimental; fim 2ª f.: representa o fim da segunda fase experimental.

A assimilação de carbono foi semelhante ao ocorrido com a amônio, as maiores assimilações, em relação à concentração inicial ($4,20 \text{ mg.L}^{-1}$),

ocorreram nas condições em que as biomassas foram transferidas aos fotobiorreatores na fase estacionária de crescimento (condições 5, 6, 7 e 8), e além disso, nas condições que houve adição de enxofre.

Foram constatadas também maiores assimilações de carbono durante a primeira fase experimental, independente da condição testada. A porcentagem de remoção de DQO demonstra melhor estes resultados (Tabela 39), havendo remoção significativamente maior das condições de 5 à 8 à condição 2 considerando todo o ensaio, além de 5 e 8 serem superiores à condição 1, e por fim, a condição 7, removeu mais DQO que todas as condições, com exceção de 5 e 8.

Tabela 39 - Remoção de nitrogênio (N), fósforo (P) e demanda química de oxigênio (DQO), em porcentagem por concentração, do ensaio total e da segunda fase experimental da otimização de *C. reinhardtii*

Condições	Remoção N (%) (mg.L ⁻¹)		Remoção P (%) (mg.L ⁻¹)		Remoção DQO (%) (g.L ⁻¹)	
	Total	2ª f. exp.	Total	2ª f. exp.	Total	2ª f. exp.
1	16,25	0,00	47,94 ^e	40,45 ^f	8,31	2,57
2	16,85	0,00	30,90	21,91	7,57	0,97
3	29,27 ^a	3,06 ^d	52,81 ^f	43,64 ^g	12,60	5,37 ^l
4	21,11 ^b	2,29 ^d	52,06 ^f	41,38 ^f	10,49	3,73
5	26,98 ^c	0,00	54,31 ^f	36,89 ^f	16,68 ⁱ	5,08 ^l
6	25,41 ^c	0,00	41,39	24,91	13,67 ^j	2,64
7	28,25 ^c	0,54	54,31 ^f	35,96 ^h	19,39 ^k	8,37 ^m
8	26,95 ^c	0,00	52,81 ^f	35,96 ^h	14,62 ⁱ	4,06

Total – remoção durante todo o ensaio, durante a primeira e segunda fases juntas; 2ª f. exp. – segunda fase experimental (produção de hidrogênio). Letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

a: Condição 3 é diferente das condições: 1, 2, 4 e 6.

b: Condição 4 é diferente das condições: 1 e 2.

c: Condições 5, 6, 7 e 8 não são diferentes e estas são diferentes das condições: 1, 2 e 4.

d: Condições 3 e 4 não são diferentes e estas são diferentes das condições: 1, 2, 5, 6, 7 e 8.

e: Condição 1 é diferente da condição 2.

f: Condições 1, 3, 4, 5, 7 e 8 não são diferentes e estas são diferentes das condições: 2 e 6.

g: Condição 3 é diferente das condições: 2, 6, 7 e 8.

h: Condições 7 e 8 não são diferentes e estas são diferentes das condições: 2, 3 e 6.

i: Condições 5 e 8 não são diferentes e estas são diferentes das condições: 1 e 2.

j: Condição 6 é diferente da condição 2.

k: Condição 7 é diferente das condições: 1, 2, 3, 4 e 6.

l: Condições 3 e 5 não são diferentes e estas são diferentes da condição 2.

m: Condição 7 é diferente das condições: 1, 2, 4, 6 e 8.

Diante destes resultados, notou-se que as principais remoções de nitrogênio e DQO ocorreram durante a primeira fase experimental e de fósforo na segunda. Além disso, as condições que mais produziram hidrogênio foram as que menos assimilaram ortofosfato durante a segunda fase experimental, e também as que menos assimilaram amônio e carbono (Figura 70).

Figura 70 - Remoção de nutrientes (%) de *C. reinhardtii*. Barras indicam remoção total durante o ensaio experimental e marcadores indicam a remoção durante a segunda fase experimental, nas 8 condições. Barras indicam desvio padrão (n=3).

5.3.1.6 Análise de ácidos orgânicos e álcoois

Diante dos resultados de ácidos orgânicos obtidos durante a segunda etapa e os resultados das análises na terceira etapa, optou-se em ressaltar apenas as concentrações de etanol e ácido acético iniciais dos ensaios, e ao fim das primeira e segunda fases nas oito condições testadas para a otimização. Fez-se análise estatística para comparar produção de etanol e o consumo de acético por *C. reinhardtii* entre o início do ensaio e o fim de cada fase experimental de cada condição, além da produção final de etanol entre todas as condições.

Quanto ao etanol (Figura 71 – A), não foi detectado no início do ensaio, mas houve a produção deste ao fim das primeiras e segundas fases em todas as condições, embora tenha sido em maior proporção durante a fase de produção de hidrogênio. Da condição 1 à 5 e 8 houve diferença significativa entre a produção final das duas fases com o dia zero, e também diferença entre o fim da primeira com o fim da segunda, sendo nesta maior a produção. Nas condições 6 e 7 houve apenas diferença na produção entre o fim da segunda fase com o início.

Comparando a produção final de etanol entre as diferentes condições, ao término dos ensaios, não foi observado diferença significativa entre as concentrações, embora os melhores resultados tenham se apresentando nas condições 4, 5, 6 e 8 ($203,2 \pm 31,5$; $196,8 \pm 32,2$; $255,14 \pm 125,9$; $216,6 \pm 67,3$, mg.L⁻¹, respectivamente). As menores concentrações foram obtidas nas condições que mais produziram hidrogênio (1 e 2) ($133,9 \pm 16,7$; $160,7 \pm 40,3$, mg.L⁻¹, respectivamente), com exceção da condição 6, que apesar de ter produção significativamente maior de hidrogênio comparada à demais condições, apresentou grande desvio padrão de análise nas concentrações de etanol.

Em relação ao ácido acético (Figura 71 – B), houve assimilação durante as duas fases experimentais e em todas as condições testadas comparadas ao início dos ensaios ($909,6 \pm 31$ mg.L⁻¹), havendo diferença estatística entre as concentrações iniciais e finais. Nas condições 1, 4, 5 e 6 houve diferença estatística também entre os fins de cada fase, sendo que na condição 4 a assimilação do ácido acético foi maior durante a segunda fase experimental, e nas demais condições, maior assimilação na primeira fase experimental.

Figura 71 - Concentração (mg.L^{-1}) de etanol (A) e ácido acético (B). D.0 – início do ensaio. Fim 1ª e 2ª f. – fim da primeira e segunda fases experimentais, nas 8 condições da otimização de *C. reinhardtii*. Barras indicam desvio padrão ($n=3$)

Nas condições que houve maior produção de hidrogênio e menor produção de etanol, 1 e 2, foram também as que apresentaram menor assimilação de ácido acético, principalmente a condição 2, que obteve a menor assimilação durante as duas fases experimentais ($396,3 \pm 77,2 \text{ mg.L}^{-1}$ ao fim da primeira fase e $370,6 \pm 91,6 \text{ mg.L}^{-1}$ ao fim da segunda fase experimental).

5.3.2 *Anabaena* sp.

5.3.2.1 Otimização da primeira fase experimental

Com o mesmo objetivo proposto para *C. reinhardtii*, foi realizado para a *Anabaena* sp., inicialmente, a otimização da primeira fase experimental dos ensaios. Foi realizado um planejamento fatorial, conforme descrito na seção 4.2.2.1 (Tabela 6 e 40), com a variação, em dois níveis, de temperatura, pH, radiação e concentração de glicose, além do ponto central com nível intermediário. O melhor resultado obtido quanto à obtenção de biomassa, foi comparado às condições estabelecidas na primeira fase de cultivo da segunda etapa.

De acordo com as variáveis e níveis testados, totalizando 17 condições, foram elaboradas as curvas de crescimento (Figura 72) e calculados o rendimento de biomassa em sólidos suspensos totais e $\mu_{\max}$ (Tabela 40). O meio de cultura em que não houve adição de glicose (simbolizado por 0), manteve-se com a concentração utilizada no início com os testes de meio de cultura e utilizadas na segunda etapa, ou seja, 1,05 g.L⁻¹. As condições em que houve adição de glicose nesta otimização totalizou 2,1 g.L⁻¹ de glicose no meio de cultura (simbolizado por 1).

Analisando as curvas de crescimento, observa-se, de maneira geral, que os melhores resultados foram obtidos com a temperatura de 32°C, com o pH 10,2 e 2,1 g.L⁻¹ de glicose, seguido do ponto central que apresentou melhor desempenho comparado às condições de pH 8,2, independente da temperatura, radiação e concentração de glicose (Figura 72).

Estes resultados podem ser melhor analisados com o rendimento de biomassa em sólidos suspensos totais (Figura 73), os quais esclarecem que o pH mais elevado e a adição de glicose (2,1 g.L⁻¹) favorecem o crescimento de *Anabaena* sp., sendo os rendimentos das condições 6, 8, 15 e 17 significativamente maiores às demais condições ($658,88 \pm 16,14$, $674,01 \pm 23,94$, $675,44 \pm 59,84$ e $588,99 \pm 83,23$ mg.L⁻¹, respectivamente), e sem diferença entre eles. Não ocorreu diferença significativa apenas entre condições 6 e 8 com 10, 12, 13 e a condição 17 com a 9.

Figura 72 - Curvas de crescimento em absorbância (A. U. λ 750 nm) do planejamento fatorial da otimização da primeira fase experimental de *Anabaena* sp.

Varição da temperatura (24 e 32°C), pH (8,2 e 10,2), radiação (30 e 90 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e concentração de glicose (0 e 1,05 g.L^{-1} – representada pelo número 1). Linhas contínuas representam condições em 24°C, linha pontilhada o ponto central (28°C, pH 9,2, 60 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 0,525 g.L^{-1} de concentração de glicose) e linhas tracejadas condições em 32°C. Barras indicam desvio padrão (n=3).

Ao comparar o efeito apenas da radiação, foi observado que o rendimento de biomassa não apresentou diferença entre as condições, havendo diferença significativa apenas entre as condições 2 e 4 (temperatura de 24°C, pH 8,2 e com adição de glicose, com concentrações de $191,67 \pm 64,14$ e $284,65 \pm 20,41$, nas radiações de 30 e 90 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente).

O ponto central do planejamento fatorial (condição 9), apresentou diferença significativa com todas as condições com o menor pH (8,2), independente da temperatura, com rendimento de biomassa de $479,90 \pm 59,07 \text{ mg.L}^{-1}$, com exceção da condição 11, com a qual não apresentou diferença.

Figura 73 - Rendimento da biomassa em sólidos suspensos totais (mg.L⁻¹) do planejamento fatorial da otimização da primeira fase experimental de *Anabaena* sp.

Tons de vermelho representam pH 8,2, tons de azul pH 10,2, e em cinza, o ponto central, com pH 9,2. radiação de 30, 60 e 90 μmol.fótons.m⁻².s⁻¹ e concentrações de glicose de 0, 0,525 e 1,05 g.L⁻¹ – representadas pelos número 0, 0,5 e 1, respectivamente. Barras indicam desvio padrão (n=3).

Porém, estes mesmos resultados não foram observados quanto à $\mu_{\max}$ (Tabela 40), a qual foi significativamente maior nas condições 12 e 13 em relação à todas as demais condições ($2,30 \pm 0,11$ e $2,26 \pm 0,12$ d⁻¹, respectivamente).

As melhores condições quanto ao rendimento de biomassa, 6, 8, 15 e 17, apresentaram as seguintes $\mu_{\max}$, na mesma sequência: $0,36 \pm 0,02$, $0,40 \pm 0,03$, $1,26 \pm 0,04$ e $1,13 \pm 0,24$ d⁻¹. Estas duas primeiras foram significativamente menores à todas as demais condições, enquanto que a condição 15 e 17 apresentaram $\mu_{\max}$ estatisticamente maior com as condições 5, 6, 7 e 8, e a 17 também apresentou diferença com a condição 9.

Ao observar apenas os resultados de $\mu_{\max}$, observa-se que o crescimento é mais rápido na maior temperatura (32°), e no menor pH (8,2), enquanto que com o rendimento de biomassa não se observa diferença entre as temperaturas e melhores resultados com pH 10,2.

Tabela 40 - Condições e $\mu_{\max}$ (d^{-1}) do planejamento fatorial com ponto central de *Anabaena* sp.

Temperatura (°C)	pH	Radiação ($\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)	Adição de Glicose (g.L ⁻¹)	Condição	$\mu_{\max}$ (d^{-1})
24	8,2	30	1,05	1	$0,70 \pm 0,04^a$
			2,1	2	$0,81 \pm 0,02^b$
		90	1,05	3	$0,90 \pm 0,05^c$
			2,1	4	$0,76 \pm 0,02^a$
	10,2	30	1,05	5	$0,46 \pm 0,03^d$
			2,1	6	$0,36 \pm 0,02$
		90	1,05	7	$0,52 \pm 0,05^e$
			2,1	8	$0,40 \pm 0,03$
28	9,2	60	1,525	9	$0,98 \pm 0,06^f$
32	8,2	30	1,05	10	$1,52 \pm 0,08^g$
			2,1	11	$1,46 \pm 0,08^h$
		90	1,05	12	$2,30 \pm 0,11^i$
			2,1	13	$2,26 \pm 0,12^i$
	10,2	30	1,05	14	$1,05 \pm 0,07^a$
			2,1	15	$1,26 \pm 0,04^j$
		90	1,05	16	$1,23 \pm 0,15^a$
			2,1	17	$1,13 \pm 0,24^a$

Letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

a: Diferença condições 1, 4, 14, 16 e 17 com condições: 5, 6, 7, e 8.

b: Diferença condição 2 com condições: 1, 5, 6, 7, e 8.

c: Diferença condição 3 com condições: 1, 4, 5, 6, 7 e 8.

d: Diferença condição 5 com condição 6.

e: Diferença condição 7 com condições: 6 e 8.

f: Diferença condição 9 com condições: 1, 2, 4, 5, 6, 7 e 8.

g: Diferença condição 10 com condições: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 14, 15, 16 e 17.

h: Diferença condição 11 com condições: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 14 e 17.

i: Diferença condições 12 e 13 com condições: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 14, 15, 16 e 17.

j: Diferença condição 15 com condições: 5, 6, 7, 8 e 9.

De acordo com o diagrama de Pareto (Figura 74) e pela análise de Bonferroni, confirma-se a interação existente entre os fatores pH e glicose em relação à biomassa, e diante desta interação não há influência da radiação e temperatura. Além disso, de acordo com esta análise, a temperatura mais elevada, possui um efeito positivo no crescimento, e comparando-se apenas as radiações com a temperatura de 32°C, obteve-se melhores resultados com a menor radiação.

Figura 74 - Diagrama de Pareto com a interação dos fatores e análise de Bonferroni de *Anabaena* sp.

Portanto, diante do diagrama de Pareto e as análise de rendimentos de biomassa, fez-se a opção pela condição 15 para realizar os cultivos da primeira fase experimental, para a otimização da produção de hidrogênio, 32°C, pH 10,2, 30 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, e com adição de glicose (2,1 g.L^{-1}), não levando em consideração a μ_{max} , pois o objetivo desta otimização era a melhor obtenção de biomassa.

5.3.2.1.1 Comparação da otimização da biomassa com a primeira fase experimental da segunda etapa

O resultado obtido com a otimização do crescimento e obtenção de biomassa para a primeira fase experimental foi comparado com as condições realizadas para esta fase durante a segunda etapa (24°C, pH 9,2, 60 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 1,05 g.L^{-1} de glicose). Para isso, fez-se um teste para comparar as curvas de crescimento, rendimento por sólidos suspensos totais e μ_{max} .

De acordo com as curvas de crescimento (Figura 75 - A), em absorbância, realizadas tanto nas concentrações normais de nutrientes no meio de cultura quanto com a limitação de nitrogênio, foi observado que foi possível melhorar o crescimento e obtenção de biomassa na primeira fase experimental com a otimização, havendo maior angulação das curvas e antecipação da fase estacionária. Além disso, a formação do heterocisto manteve-se nesta nova condição de crescimento no meio com limitação de nitrogênio.

Os resultados de rendimento de biomassa e cálculos das $\mu_{\max}$ (Figura 75 – B) comprovam o resultado positivo da otimização da biomassa. O rendimento ao fim da segunda etapa foi de $585,31 \pm 68,84 \text{ mg.L}^{-1}$, enquanto que com a otimização obteve-se $692,27 \pm 29,54 \text{ mg.L}^{-1}$ de sólidos, havendo diferença estatística entre eles. A $\mu_{\max}$ também foi significativamente maior com a otimização, $1,13 \pm 0,05 \text{ d}^{-1}$, contra $0,73 \pm 0,04 \text{ d}^{-1}$ conforme as variáveis utilizadas na segunda etapa.

Portanto, diante destes resultados e com as diferenças estatísticas comprovando as diferenças de obtenção de biomassa para a primeira fase experimental entre a 2ª etapa e a otimização, estabeleceu-se que as variáveis e níveis estabelecidos com a otimização da biomassa na primeira fase experimental seriam utilizados para a otimização da produção de hidrogênio para *Anabaena* sp.

Figura 75 - Curvas de crescimento em absorbância (A. U. λ 750 nm) (A), linhas contínuas indicam BG-11 padrão e linhas pontilhadas BG-11 com limitação de nitrogênio (10 mg.L^{-1}); e rendimento em sólidos suspensos totais (mg.L^{-1}), em barras, e μ_{max} (d^{-1}), em marcadores (B), comparando a primeira fase experimental da segunda etapa com a otimização desta fase da terceira etapa de *Anabaena* sp.

5.3.2.2 Otimização da produção de hidrogênio

A otimização da produção de hidrogênio com *Anabaena* sp. foi realizada de acordo com a variação na concentração de glicose, sendo elas as mesmas utilizadas na segunda etapa e de acordo com o estabelecido na otimização da biomassa ($1,05$ e $2,1 \text{ g.L}^{-1}$) e variação na concentração de

amônio (0 e 0,5 mM). O pH, temperatura e radiação foram mantidos conforme o resultado obtido com a otimização da primeira fase experimental (10,2, 32°C e 30 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Foi realizado também o teste da fase de crescimento, exponencial e estacionária, em que as biomassas foram transferidas para os fotobiorreatores (Tabela 8 e 41).

Tabela 41 - Variáveis testadas na otimização da produção de hidrogênio por *Anabaena* sp.

Condição	Fase Crescimento	Glicose (g.L^{-1})	Amônio (mM)
1	Exponencial	1,05	0
2			0,5
3		2,1	0
4			0,5
5	Estacionária	1,05	0
6			0,5
7		2,1	0
8			0,5

As oito condições testadas foram realizadas simultaneamente e o ensaio obteve duração de 180 horas. De acordo com os resultados foram elaboradas as curvas de concentração de hidrogênio (mmol.L^{-1}), conforme Figura 76.

Diante das curvas de produção de hidrogênio (mmol. L^{-1}) foi observado semelhança nos resultados, porém, embora se sobressaíam, as condições que possuem maiores concentrações de glicose demonstraram melhor desempenho, com exceção da condição 8.

De acordo com os parâmetros de produção de hidrogênio foi possível analisar melhor estes resultados e compará-los estatisticamente (Tabela 42). Segundo a ANOVA, foi detectada diferença significativa entre as oito condições quanto à produção máxima de hidrogênio ($p = 0,03$), volume ($p = 0,02$) e produtividade ($p = 0,04$), e não foi observada diferença para a μ_{max} .

Figura 76 - Concentração de hidrogênio (mmol.L^{-1}) produzido por *Anabaena* sp. nas 8 condições testadas para a otimização (Tabela 41). Barras indicam desvio padrão ($n=3$).

Porém, com o teste de post hoc para analisar as diferenças entre as condições, para todos os parâmetros, não foi detectada diferença significativa, devido, provavelmente, ao desvio padrão. A única exceção ocorreu com a produtividade, em que foi observada diferença estatística entre as condições 7 e 2.

Apesar disso, foi observado que nas condições de 1 a 4, as quais representam a transferência de biomassa durante a fase exponencial, foram as que apresentaram, de modo geral, os melhores resultados quanto aos parâmetros de produção de hidrogênio, comparado às condições na fase estacionária.

A única exceção foi a condição 7, que por sua vez, foi a que apresentou um dos maiores resultados de produção máxima de hidrogênio ($11,25 \pm 3,70 \text{ mmol.L}^{-1}$), volume ($408,56 \pm 65,04 \text{ mL.L}^{-1}$ de cultura), produtividade ($87,87 \pm 8,17 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), sendo esta maior significativamente que a da condição 2 ($47,62 \pm 7,76 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), e μ_{max} ($0,290 \pm 0,083 \text{ d}^{-1}$), porém, seus desvios padrões foram elevados e os resultados se assemelharam às condições 3 e 4.

Tabela 42 - Parâmetros de produção de hidrogênio de *Anabaena* sp. nas 8 condições testadas para a otimização

Condição	Produção máxima (mmol.L ⁻¹)	Volume máximo (mL)	Produtividade (μmol.L ⁻¹ .h ⁻¹)	μ _{max} (h ⁻¹)
1	9,73 ± 0,41	360,42 ± 45,61	67,07 ± 2,13	0,306 ± 0,027
2	7,66 ± 0,98	312,28 ± 32,08	47,62 ± 7,76	0,246 ± 0,083
3	10,54 ± 1,45	360,38 ± 33,39	71,17 ± 5,36	0,269 ± 0,067
4	11,52 ± 2,15	394,01 ± 7,04	71,29 ± 10,36	0,225 ± 0,015
5	7,35 ± 0,95	311,73 ± 2,83	56,93 ± 1,75	0,190 ± 0,066
6	5,64 ± 2,12	287,77 ± 52,72	54,30 ± 33,40	0,378 ± 0,216
7	11,25 ± 3,70	408,56 ± 65,04	87,87 ± 8,17 ^a	0,290 ± 0,083
8	6,24 ± 1,44	280,09 ± 41,35	60,04 ± 13,01	0,272 ± 0,106

Condições de 1 a 8 descritas na Tabela 42. Letras indicam diferença estatística (p < 0,05).

a: Condição 7 é diferente da condição 2.

Independente da fase de crescimento utilizada para a transferência de biomassa para o reator foi observado que as condições com maiores concentrações de glicose (3, 4, 7), apresentaram melhor desempenho, e quanto ao amônio, com estes resultados, não é possível afirmar se foi benéfica ou não ao processo (Figura 77).

Figura 77 - Produção máxima de hidrogênio (mmol.L⁻¹) indicado por marcadores e produtividade (μmol.L⁻¹.h⁻¹) indicados por barras, nas 8 condições testadas (Tabela 42) para otimização da produção de hidrogênio por *Anabaena* sp. Barras indicam desvio padrão (n=3)

As condições 3 e 4, foram as que apresentaram resultados semelhantes à 7, com produção máxima de $10,54 \pm 1,45$ e $11,52 \pm 2,15$ mmol.L⁻¹ e produtividades de $71,17 \pm 5,36$ e $71,29 \pm 10,36$ $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente (Figura 77).

De acordo com estes resultados de produção máxima e produtividade (Figura 77) e devido à não existência de diferenças significativas com o teste de Tukey, embora tenha ocorrido diferenças entre as condições na análise de variâncias, não foi possível afirmar qual a melhor condição de produção de hidrogênio nesta otimização, embora haja evidências de melhores resultados utilizando-se a biomassa na fase exponencial para transferência aos fotobiorreatores e com concentrações de 2,1 g.L⁻¹ de glicose.

5.3.2.3 Densidade celular e estimativa de biomassa

As densidades foram estimadas no início da segunda fase experimental, e as condições de 1 a 4, que representam os ensaios na fase exponencial de crescimento, apresentaram densidades significativamente menores às das condições de 5 a 8 (Tabela 43). Além disso, não houve diferença entre as condições de cada fase de crescimento, comprovando que os fotobiorreatores iniciaram com densidades celulares semelhantes.

Tabela 43 - Densidade celular de *Anabaena* sp.(ind.mL⁻¹) ($\times 10^5$) no início da segunda fase experimental nas 8 condições

Condição	Densidade celular
1	$2,25 \pm 0,19$
2	$1,77 \pm 0,47$
3	$1,98 \pm 0,56$
4	$1,93 \pm 0,41$
5	$11,60 \pm 1,33^a$
6	$10,25 \pm 1,39^a$
7	$8,5 \pm 1,83^a$
8	$10,83 \pm 2,33^a$

Letras indicam diferença estatísticas ($p < 0,05$)

a: condições 5, 6, 7 e 8 não tem diferença entre elas e estas são diferentes de: 1, 2, 3 e 4.

O mesmo foi observado quanto à biomassa estimada no início da segunda fase experimental (Tabela 44), tanto por absorvância quanto por sólidos e clorofila *a*, sendo a biomassa diferente estatisticamente nas condições de 5 à 8 comparada as demais, com exceção apenas na estimativa de sólidos das condições 5 ($573,33 \pm 117,19 \text{ mg.L}^{-1}$) e 8 ($593,33 \pm 11,55 \text{ mg.L}^{-1}$) com a 3 ($360,0 \pm 20,0 \text{ mg.L}^{-1}$), entre as quais não houve diferença.

Tabela 44 - Estimativa de biomassa de *Anabaena* sp. por absorvância (750 nm), sólidos (mg.L^{-1}) e clorofila *a* (mg.L^{-1})

Condição	Período	Absorvância (750 nm)	Sólidos (mg.L^{-1})	Clorofila <i>a</i> (mg.L^{-1})
Todas	D.0	$0,020 \pm 0,00$	$56,0 \pm 0,00$	$0,15 \pm 0,00$
1	Inicial	$0,150 \pm 0,03$	$300,0 \pm 40$	$0,79 \pm 0,09$
	Final	$0,270 \pm 0,01$	$293,33 \pm 61,1$	$0,91 \pm 0,24$
2	Inicial	$0,132 \pm 0,01$	$273,3 \pm 110,15$	$0,81 \pm 0,07$
	Final	$0,300 \pm 0,05$	$380,0 \pm 52,92$	$0,91 \pm 0,15$
3	Inicial	$0,159 \pm 0,04$	$360,0 \pm 20$	$0,79 \pm 0,41$
	Final	$0,310 \pm 0,03$	$366,67 \pm 50,33$	$0,96 \pm 0,45$
4	Inicial	$0,156 \pm 0,02$	$300,0 \pm 72,11$	$0,96 \pm 0,13$
	Final	$0,480 \pm 0,09$	$573,33 \pm 144,68^*$	$1,26 \pm 0,51$
5	Inicial	$0,500 \pm 0,12^a$	$573,33 \pm 117,19^b$	$4,02 \pm 1,40^a$
	Final	$0,710 \pm 0,01$	$846,67 \pm 50,33^*$	$5,97 \pm 0,71$
6	Inicial	$0,540 \pm 0,08^a$	$633,33 \pm 152,75^a$	$4,12 \pm 0,67^a$
	Final	$0,780 \pm 0,03$	$890,0 \pm 14,14$	$3,21 \pm 3,05$
7	Inicial	$0,536 \pm 0,07^a$	$620,0 \pm 52,91^a$	$3,87 \pm 0,70^a$
	Final	$0,890 \pm 0,06$	$1080,0 \pm 60,0^*$	$3,26 \pm 0,58$
8	Inicial	$0,579 \pm 0,04^a$	$593,33 \pm 11,55^b$	$5,03 \pm 0,26^a$
	Final	$0,980 \pm 0,04$	$1200,0 \pm 100,0^*$	$5,60 \pm 1,66$

D.0 – representa o dia 0, início da primeira fase experimental. Inicial – início da segunda fase experimental. Final – fim da segunda fase experimental nas 8 condições. Letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$):

*: Diferença entre a biomassa no início e fim da segunda fase experimental.

a: Condições 5, 6, 7 e 8 não tem diferença entre elas e estas são diferentes de: 1, 2, 3 e 4.

b: Condições 5 e 8 não tem diferença entre elas e estas são diferentes de: 1, 2 e 4.

Além disso, entre as condições de 1 a 4 e entre 5 a 8, não houve diferenças em nenhuma destas estimativas quanto à concentração de biomassa que iniciaram nos fotobiorreatores.

As absorvâncias das condições de 5 a 8 foram em média de $0,54 \pm 0,03$ superiores às condições de 1 à 4, com média de $0,15 \pm 0,01$. As concentrações de sólidos e clorofila *a* também foram superiores nas condições testadas na fase estacionária, com médias de $605,0 \pm 26,87 \text{ mg.L}^{-1}$ e $4,26 \pm 0,52 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente, e média de $308,33 \pm 36,67 \text{ mg.L}^{-1}$ de sólidos e $0,84 \pm 0,08 \text{ mg.L}^{-1}$ de clorofila *a*, nas condições correspondentes à transferência de biomassa na fase exponencial.

Foram analisadas também a relação da concentração de sólidos e clorofila *a* final com a inicial durante a segunda fase experimental para cada condição, e foi detectado que nas condições 4, 5, 7 e 8 houve aumento significativo da concentração de sólidos ao fim do ensaio ($573,33 \pm 144,68$, $846,67 \pm 50,33$, $1080,0 \pm 60,0$, $1200,0 \pm 100,0 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente) (Figura 78). Nas demais condições e com as concentrações de clorofila *a*, não houveram diferenças nas concentrações, embora as culturas tornaram-se amareladas (Figura 79).

Figura 78 - Produção máxima de hidrogênio (mmol.L^{-1}) com *Anabaena* sp. indicado por marcadores e sólidos no início e fim da segunda fase experimental (mg.L^{-1}), indicados por barras, nas 8 condições. Barras indicam desvio padrão ($n=3$).

Figura 79 – Fotobiorreatores de *Anabaena* sp. (1448) na segunda fase experimental (produção de hidrogênio), com cultura amarelada.

Ao comparar a biomassa pela concentração de sólidos, foi observado que, tanto a inicial quanto a final durante a segunda fase experimental, nas condições de 1 a 4 houve menor concentração de biomassa nos fotobiorreatores, porém, apresentaram melhor produção de hidrogênio comparada as condições utilizadas na fase estacionária (5 à 8) e, conseqüentemente, com mais biomassa, à exceção da condição 7 (Figura 78).

5.3.2.4 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas, carboidrato e proteína, mensurados em porcentagem por mg de biomassa seca, analisadas no início, das duas fases de crescimento testadas, e fim da segunda fase experimental, para cada condição, demonstraram resultados semelhantes aos obtidos na segunda etapa da pesquisa.

Em relação ao carboidrato (Figura 80 – A), em todas as condições houve o aumento de percentual de carboidrato em suas biomassas, aumentando a reserva energética. Este resultado corrobora com os aumentos de sólidos suspensos totais ao fim dos ensaios, embora nem todas as condições tenham tido diferenças quanto à este parâmetro comparado à biomassa inicial.

Figura 80 - Porcentagem (mg.L^{-1}) de carboidrato (A) e proteína (B) no início (inicial) e fim da segunda fase experimental nas 8 condições de otimização de *Anabaena* sp. Barras indicam desvio padrão ($n=3$)

Apesar do aumento das concentrações de carboidrato na maioria das condições, este foi significativamente diferente comparado ao início (45,9% referente as condições 3 e 4, e 44% às condições 7 e 8) apenas com o fim das condições 3, 4, 7 e 8 (63,2, 62,9, 64,7 e 65,6 %, respectivamente), que são as com maiores concentrações de glicose, independente da concentração de amônio, e, além disso, estas três primeiras foram as com maiores produções de hidrogênio e produtividades.

Quanto à porcentagem de proteína na biomassa de *Anabaena* sp. durante o ensaio (Figura 80 – B), foi observado situação contrária à do carboidrato, havendo consumo deste componente durante a segunda fase experimental, exceto na condição 2.

Apesar disso, a diferença estatística entre o início e fim das concentrações só ocorreu nas condições da fase estacionária de crescimento (de 5 a 8), sendo que nestas condições apresentaram início de 27,7% e reduziram para 23,0, 23,2, 14,4, e 17,2 % de proteína, nas condições 5, 6, 7 e 8, respectivamente.

As condições que possuíam maiores concentrações de glicose (3, 4, 7 e 8) e melhores produções de hidrogênio (exceto 8), foram as que mais reduziram os percentuais de proteína em suas biomassas, embora não tenha ocorrido diferença significativa entre as concentrações iniciais e finais nas condições 3 e 4.

5.3.2.5 Análises físico-químicas

Foram analisados o pH, concentrações de nitrato, ortofosfato e DQO, no início dos ensaios e ao fim das primeira e segunda etapas (Tabela 45), bem como análises estatística da remoção de nutrientes (Tabela 46). Durante a segunda fase experimental houve renovação do meio de cultura no qual houve privação de nitrogênio, portanto, a remoção de nitrogênio foi analisada apenas durante a primeira fase experimental.

O pH, nas oito condições testadas, diminuiu no fim dos ensaios e apresentou menores valores nas condições da fase estacionária de

crescimento (5 a 8), atingindo $5,67 \pm 0,65$; $5,25 \pm 0,22$; $5,55 \pm 0,78$ e $5,69 \pm 0,13$, nestas condições em ordem crescente.

Tabela 45 - Variáveis físico-químicas do início ao fim dos ensaios de otimização de *Anabaena* sp.: pH, nitrato (mg.L^{-1}), ortofosfato (mg.L^{-1}) e demanda química de oxigênio (g.L^{-1})

Condições	Período	pH	NO_3^- (mg.L^{-1})	PO_3^- (mg.L^{-1})	DQO (g.L^{-1})
Todas	D.0	$10,2 \pm 0$	$41,10 \pm 0$	$5,30 \pm 0$	$4,20 \pm 0$
1	fim 1ª f.	*	$35,23 \pm 1,12$	$4,13 \pm 0,06$	$2,82 \pm 0,05$
	fim 2ª f.	$6,89 \pm 0,13$	$3,20 \pm 0,15$	$5,60 \pm 0,30$	$1,48 \pm 0,03$
2	fim 1ª f.	*	$36,40 \pm 1,85$	$4,20 \pm 0,20$	$2,82 \pm 0,05$
	fim 2ª f.	$6,68 \pm 0,09$	$4,29 \pm 0,71$	$1,10 \pm 1,32$	$1,38 \pm 0,04$
3	fim 1ª f.	*	$35,90 \pm 1,13$	$4,00 \pm 0,17$	$2,79 \pm 0,03$
	fim 2ª f.	$6,14 \pm 0,33$	$3,65 \pm 0,14$	$5,80 \pm 0,20$	$2,13 \pm 0,70$
4	fim 1ª f.	*	$34,90 \pm 0,61$	$4,27 \pm 0,06$	$2,87 \pm 0,09$
	fim 2ª f.	$5,79 \pm 0,36$	$4,72 \pm 1,18$	$3,20 \pm 0,90$	$2,39 \pm 0,10$
5	fim 1ª f.	*	$4,23 \pm 0,15$	$0,18 \pm 0,06$	$2,25 \pm 0,05$
	fim 2ª f.	$5,67 \pm 0,65$	$4,87 \pm 0,56$	$0,08 \pm 0,010$	$1,68 \pm 0,61$
6	fim 1ª f.	*	$5,97 \pm 0,55$	$0,24 \pm 0,06$	$2,21 \pm 0,45$
	fim 2ª f.	$5,25 \pm 0,22$	$5,68 \pm 0,40$	$1,52 \pm 1,72$	$1,32 \pm 0,04$
7	fim 1ª f.	*	$5,80 \pm 1,57$	$0,22 \pm 0,04$	$2,25 \pm 0,02$
	fim 2ª f.	$5,55 \pm 0,78$	$5,58 \pm 0,58$	$1,56 \pm 1,70$	$2,22 \pm 0,12$
8	fim 1ª f.	*	$4,09 \pm 0,69$	$0,12 \pm 0,05$	$2,31 \pm 0,07$
	fim 2ª f.	$5,69 \pm 0,13$	$5,68 \pm 0,40$	$0,41 \pm 0,55$	$2,18 \pm 0,16$

* Não foi detectado; D.0: representa o momento do inóculo da cultura, ou seja, início da primeira fase experimental; fim 1ª f.: representa o momento em que a biomassa foi transferida para o fotobiorreator, ou seja, o fim da primeira fase experimental; fim 2ª f.: representa o fim da segunda fase experimental.

A concentração inicial do nitrato ($41,10 \text{ mg.L}^{-1}$), acima do determinado para a limitação de nitrogênio (10 mg.L^{-1}) durante a primeira fase

experimental, ocorreu devido, provavelmente, à concentração antecedente do inoculo inicial do ensaio. Apesar disso, houve a formação de heterocistos. Ao fim da segunda fase experimental, embora não tenha sido adicionado nitrato no meio de cultura, foram detectadas concentrações de nitrato em todas as condições.

Durante a primeira fase experimental houve assimilação de nitrato em todas as condições, porém, as culturas que permaneceram na primeira fase experimental até a fase estacionária de crescimento assimilaram mais nitrato do que as demais condições, como esperado, atingindo média ao fim desta fase de $5,02 \text{ mg.L}^{-1}$.

De acordo com o percentual de assimilação de nitrogênio na primeira fase experimental é possível confirmar estes resultados (Tabela 46 e Figura 81), os quais demonstram que a remoção de nitrogênio nas condições de 1 a 4, representando a transferência de biomassa na fase exponencial de crescimento, foi em média de 6,7%, enquanto que a média nas condições de 5 a 8, fase estacionária, foi de 43,9%, sendo estas significativamente maiores às demais.

Quanto ao ortofosfato, foi observado que durante as duas fases experimentais houve assimilação, em todas as condições, comparado à concentração no início do ensaio ($5,30 \text{ mg.L}^{-1}$). Porém, durante a primeira fase experimental, houve consumo significativamente menor pelas condições de 1 a 4 comparado às condições de 5 a 8, semelhante ao ocorrido com a assimilação de nitrato. Durante a segunda fase experimental também houve consumo maior de ortofosfato pelas condições na fase estacionária.

De acordo com a remoção de fósforo (Tabela 46 e Figura 81) é possível observar estes resultados de assimilação de ortofosfato. Durante a produção de hidrogênio houve maior remoção de fósforo pelas condições de 5 a 8, embora tenha ocorrido significativa remoção pela condição 2. Houve diferença das condições 5 e 8 com 1, 3 e 4, e entre as condições 6 e 7 com 1 e 3.

Tabela 46 - Remoção de nitrogênio (N), fósforo (P) e demanda química de oxigênio (DQO), em porcentagem por concentração, do ensaio total e da segunda fase experimental da otimização de *Anabaena* sp.

Condições	Remoção N	Remoção P		Remoção DQO	
	(%) (mg.L ⁻¹)	(%) (mg.L ⁻¹)	(%) (mg.L ⁻¹)	(%) (g.L ⁻¹)	(%) (g.L ⁻¹)
	1ª f. exp.	Total	2ª f. exp.	Total	2ª f. exp.
1	7,14	11,01	0,00	26,66 ^e	24,79 ^g
2	5,72	50,00 ^b	39,62 ^b	28,33 ^e	26,47 ^g
3	6,33	12,26	0,00	9,21	6,89
4	7,54	29,56	19,81	11,15	9,89
5	44,86 ^a	97,52 ^a	49,25 ^c	38,61 ^f	27,06 ^g
6	42,91 ^a	92,26 ^a	44,53 ^d	41,49 ^f	27,82 ^g
7	42,94 ^a	83,18 ^a	35,28 ^d	23,71 ^e	12,12 ^h
8	45,03 ^a	95,06 ^a	46,16 ^c	23,42 ^e	12,86 ^h

Total – remoção durante todo o ensaio, durante a primeira e segunda fases juntas; 1ª fase exp. – primeira fase experimental; 2ª f. exp. – segunda fase experimental (produção de hidrogênio). Letras indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

a: Condições 5, 6, 7 e 8 não são diferentes e estas são diferentes das condições: 1, 2, 3 e 4.

b: Condição 2 é diferente das condições: 1 e 3.

c: Condições 5 e 8 não são diferentes e estas são diferentes das condições: 1, 3 e 4.

d: Condições 6 e 7 não são diferentes e estas são diferentes das condições: 1 e 3.

e: Condições 1, 2, 7 e 8 não são diferentes e estas são diferentes das condições: 3 e 4.

f: Condições 5 e 6 não são diferentes e estas são diferentes das condições: 1, 2, 3, 4, 7 e 8.

g: Condições 1, 2, 5 e 6 não são diferentes e estas são diferentes das condições: 3, 4, 7 e 8.

h: Condições 7 e 8 não são diferentes e estas são diferentes da condição 3.

Diante disso, as remoções durante todo o ensaio nas condições da fase estacionária foram significativamente maiores às demais condições (5: 97,5%, 6: 92,3%, 7: 83,2%, 8: 95,06%).

As condições que apresentaram melhores resultados de produção de hidrogênio foram as que menos removeram fósforo durante a segunda fase experimental, sendo elas a 3, a qual não apresentou remoção, a 4, com 19,8% e a 7, com remoção de 35,3%, que apesar de maior em relação à 3 e à 4, foi superior por ter tido fase de crescimento diferente, porém a menor remoção comparada às condições da fase estacionária.

A assimilação de carbono foi semelhante ao ocorrido com a de nitrato e ortofosfato durante a primeira fase experimental, pois ocorreu mais assimilação pelas culturas que permaneceram nesta fase até a estacionária, comparado à concentração inicial (4,20 mg.L⁻¹).

Figura 81 - Remoção de nutrientes (%), nitrogênio, fósforo e DQO. Barras indicam remoção total durante o ensaio experimental e marcadores indicam a remoção durante a segunda fase experimental, nas 8 condições da otimização de *Anabaena* sp. Barras indicam desvio padrão (n=3)

Além disso, de forma semelhante ao ortofosfato, ocorreu mais assimilação de carbono durante a fase de produção de hidrogênio, e maior pelas condições de 5 a 8. As condições que mais produziram hidrogênio (3, 4 e 7) foram as que menos assimilaram DQO comparando-as com as condições de acordo com suas fases de crescimento.

Estes resultados podem ser confirmados com os dados de remoção de DQO (Tabela 46 e Figura 81). Durante a segunda fase experimental, as condições de 5 (27,1%) e 6 (27,8%) removeram mais DQO, com diferença estatística, do que todas as outras condições, e as condições 1 (24,7%), 2 (26,5%), 7 (12,1%) e 8 (12,9%) removeram mais significativamente que as condições 3 (6,9%) e 4 (9,9%). Estas diferenças demonstraram a menor assimilação de carbono pelas condições 3, 4 e 7, sendo que esta última só foi superior as 3 e 4 por ter tido sua biomassa transferida ao fotobiorreator na fase estacionária.

Portanto, diante destes resultados, foi observado que durante a primeira fase experimental houve maiores remoções de todos os nutrientes pelas culturas que estavam na condição testada de fase estacionária de crescimento, como esperado. Além disso, de maneira geral, as melhores

remoções de fósforo e DQO ocorreram durante a segunda fase experimental, e as melhores condições de produção de hidrogênio foram as que menos assimilaram fósforo e carbono.

5.3.2.6 *Análise de ácidos orgânicos e álcool*

Conforme os resultados de ácidos orgânicos e álcool obtidos durante a segunda etapa do projeto e os resultados obtidos nesta terceira etapa com a otimização de hidrogênio, fez-se a ressalva apenas das concentrações de etanol, e ácidos acético e isovalérico, comparando o início dos ensaios com o fim da primeira e segunda fase experimental para as oito condições testadas, além da comparação da produção final de etanol entre elas.

Quanto ao etanol (Figura 82 – A) não foi detectado concentração no início dos ensaios (0 mg.L^{-1}), porém, houve produção deste álcool em todas as condições e durante as duas fases experimentais. Nas condições representadas pela biomassa transferida na fase exponencial, houve diferença na concentração de todas ao fim da primeira e segunda fases com o início dos ensaios. Foi detectada diferença nas concentrações entre o fim das fases nas condições 1 e 4 (fim 1ª fase: $43,4 \pm 4,4$ e $40,9 \pm 2,9 \text{ mg.L}^{-1}$; fim 2ª fase: $32,3 \pm 3,4$ e $30,2 \pm 1,2 \text{ mg.L}^{-1}$, respectivamente).

Nas condições representadas pela fase estacionária, todas elas apresentaram diferença estatística na concentração de etanol ao fim das duas fases com a inicial, e nas condições 6, 7 e 8, houve maior produção significativa ao fim da segunda fase comparada à primeira. A condição 5 também apresentou maior produção durante a produção de hidrogênio, porém não foi detectada diferença devido ao desvio padrão.

Figura 82 - Concentração (mg.L^{-1}) de etanol (A), ácido acético (B) e ácido isovalérico (C). D.0 – início do ensaio. Fim 1ª e 2ª f. – fim da primeira e segunda fases experimentais, nas 8 condições da otimização de *Anabaena* sp. Barras indicam desvio padrão ($n=3$)

Ao comparar a produção final de etanol de todas as condições do ensaio, observou-se que as condições de 5 a 8 produziram mais etanol que as demais (5: $69,8 \pm 27,3$; 6: $87,5 \pm 2,3$; 7: $120,2 \pm 6,1$; 8: $95,6 \pm 17,6$ mg. L⁻¹), porém foi detectado pelo ANOVA apenas que a concentração obtida pela condição 7 foi superior as condições 1, 2, 3 e 4, condição 6 superior à 4, e a condição 8 produziu mais significativamente que as condições 1 e 4.

De acordo com os resultados de ácido acético notou-se que durante as duas fases experimentais houve sua produção (Figura 82 – B), o que pode ser uma hipótese para justificar a queda do pH durante os ensaios.

Porém houve variação da produção pelos fotobiorreatores da triplicata, gerando grandes desvios padrão, o que provocou a detecção de diferença estatística entre o fim das fases experimentais com o início do ensaio e também entre os finais de cada fase, com exceção da condição 1, que apresentou maior produção significativa de ácido acético ao fim da primeira fase ($22,3 \pm 8,3$ mg.L⁻¹) comparada ao fim da segunda ($2,4 \pm 0,9$ mg.L⁻¹).

Ocorreu também a produção de ácido isovalérico durante o ensaio em todas as condições testadas, justificando também a diminuição do pH. No início do ensaio a concentração deste ácido foi abaixo do limite de detecção e houve produção deste durante as duas fases experimentais, havendo maior produção durante a fase de produção de hidrogênio (Figura 82 – C).

Foi detectada diferença estatística do fim das duas fases experimentais com o início em todas as condições, e entre as concentrações finais não houve diferença entre as condições, exceto na 1, que apresentou produção significativamente maior ao fim da segunda fase ($20,0 \pm 0,2$ mg. L⁻¹) comparada à primeira ($18,6 \pm 0,02$ mg.L⁻¹).

5.4 Comparação da otimização com a produção de hidrogênio da segunda etapa

A fim de constatar se houve a melhora na produção de hidrogênio com a otimização, foram comparados os resultados obtidos nesta com os da

segunda etapa do projeto com as duas cepas CC425, *C. reinhardtii*, e 1448, *Anabaena* sp.

5.4.1 *C. reinhardtii*

Em relação à produção de hidrogênio por *C. reinhardtii* foi observado que as condições que apresentaram melhores produções na otimização foram semelhantes às utilizadas na segunda etapa, modificando-se apenas as condições de pH e temperatura estabelecidas na otimização de biomassa da primeira fase experimental.

De acordo com a análise de variância foi detectada diferença entre os resultados da segunda etapa e as condições da otimização para todos os parâmetros de produção de hidrogênio. Porém, o teste Tukey não indicou diferenças entre todas as comparações.

Quanto à produção máxima de hidrogênio (Figura 83 – A) foi detectada diferença quanto aos resultados das duas radiações da segunda etapa, sendo elas superiores estatisticamente, às condições 3, 4, 5, 7 e 8 da terceira etapa.

As duas melhores produções da terceira etapa, 2 ($3,57 \pm 0,31$ mmol. L⁻¹) e 6 ($2,67 \pm 0,31$ mmol.L⁻¹), apesar de terem tido produções superiores à segunda etapa, não apresentaram diferença com ela comparando com a menor radiação. A condição 6 também não obteve diferença com a maior radiação, porém, a condição 2 apresentou produção máxima de hidrogênio significativamente maior que a condição de 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ da segunda etapa.

As mesmas diferenças estatísticas foram encontradas em relação ao volume de hidrogênio produzido por litro de cultura e a produtividade (Figura 83 – B e D), ou seja, nas duas radiações da segunda etapa foram produzidos volume e produtividades significativamente maiores que as condições 3, 4, 5, 7 e 8. Não foi detectado diferença no volume produzido na segunda etapa com as condições 1, 2 e 6.

Quanto à produtividade (Figura 83 – D) também não houve diferença nos resultados da segunda etapa com as condições 1 e 6, porém a condição 2 demonstrou produtividade ($21,98 \pm 0,86 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) estatisticamente maior que a da menor radiação na segunda etapa ($14,74 \pm 1,96 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Não foi detectada diferença com a produtividade da maior radiação ($17,02 \pm 3,83 \mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), apesar de a probabilidade ter sido próxima ao considerado significativo ($p = 0,06$).

Figura 83 - Comparação dos parâmetros de hidrogênio, produção máxima (mmol.L⁻¹) (A), volume (mL⁻¹ por litro de cultura) (B), μ_{max} (h⁻¹) (C) e produtividade ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) (D), entre a segunda etapa nas duas radiações (60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e as oito condições da otimização de *C. reinhardtii* na terceira etapa. Barras indicam desvio padrão (n=3)

Embora com a otimização tenha sido possível obter melhores produções de hidrogênio e produtividade, foi detectado que o mesmo não ocorreu com a $\mu_{\max}$, pois todas as condições da terceira etapa apresentaram $\mu_{\max}$ significativamente menores às obtidas na segunda etapa (Figura 83 – C).

Apesar disso e de acordo com os resultados apresentados, pode-se afirmar que foi possível melhorar a produção de hidrogênio com a otimização das duas fases experimentais, pois foi possível aumentar em 49% a produtividade de produção de hidrogênio, comparando a condição 2 com a radiação de $60 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ na segunda etapa, e 29% com $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

5.4.2 *Anabaena* sp.

A produção de hidrogênio por *Anabaena* sp. com a otimização na terceira etapa apresentou melhores resultados em três diferentes condições, todas elas com o dobro de concentração de glicose comparado à utilizada na segunda etapa, sendo duas delas com transferência de biomassa ao fotobiorreator na fase exponencial de crescimento (3 e 4) e uma na fase estacionária (7). O pH, temperatura e radiações utilizadas foram diferentes à da segunda etapa, estabelecidas na otimização de biomassa da primeira fase experimental.

A partir da análise de variância foi detectada diferença estatística entre os resultados da segunda etapa e as condições da otimização com a produção máxima de hidrogênio, produtividade e volume. Porém, o teste Tukey não indicou diferenças entre todas as comparações. Não houve diferença na análise de variância na comparação da $\mu_{\max}$, apesar de as duas condições testadas na segunda etapa terem tido menores resultados comparadas à todas as condições da terceira etapa (Figura 42 – C).

Quanto à produção máxima de hidrogênio (Figura 84 – A) foi observado que algumas condições da otimização apresentaram melhores resultados que as duas radiações testadas na segunda etapa, como as

condições 3, 4 e 7 ($10,54 \pm 1,45$; $11,52 \pm 2,15$; $11,25 \pm 3,70$ mmol.L⁻¹), porém não foi detectada diferença estatística entre a segunda e terceira etapa, em nenhuma das condições, apesar de terem aumentado a produção de hidrogênio em média de 28, 40 e 37 %, respectivamente, em relação à segunda etapa nas duas radiações.

Figura 84 - Comparação dos parâmetros de hidrogênio, produção máxima (mmol.L⁻¹) (A), volume (mL⁻¹ por litro de cultura) (B), $\mu_{\max}$ (h⁻¹) (C) e produtividade ($\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) (D), entre a segunda etapa nas duas radiações (60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) e as oito condições da otimização de *Anabaena* sp. na terceira etapa. Barras indicam desvio padrão (n=3)

Em relação ao cálculo de volume de hidrogênio produzido (Figura 84 – B) todas as condições da otimização apresentaram resultados maiores

comparadas às duas radiações da segunda etapa, porém foi detectada diferença significativa apenas destas, sendo elas significativamente menores, com as condições 4 e 7 ($394,01 \pm 7,04$ e $408,56 \pm 65,04$ mL.L⁻¹ de cultura, respectivamente).

Quanto à produtividade, a condição 7 foi significativa maior em 105 % em relação à média das condições da segunda etapa, enquanto que as condições 3 e 4 não apresentaram esta mesma diferença, embora tenha tido produtividade média 66 % superior à segunda etapa.

5.5 Comparação *C. reinhardtii* e *Anabaena* sp. após otimização da produção de hidrogênio

De acordo com os resultados obtidos foi possível observar que a otimização da produção de hidrogênio, na terceira etapa, foi positiva tanto para *C. reinhardtii* quanto para *Anabaena* sp.

Embora a produção de hidrogênio por estas duas espécies tenha sido realizada por processos diferentes, biofotólise direta por fotossíntese anaeróbia para *C. reinhardtii* e biofotólise indireta para *Anabaena* sp., além de meios de cultura e condições físico-químicas divergentes, fez-se uma comparação dos melhores resultados obtidos por ambas com a otimização, conforme condições descritas na Tabela 47.

Tabela 47 - Condições das melhores produções de hidrogênio de *C. reinhardtii* e *Anabaena* sp. após a otimização

Espécie	C.	Temp. (°C)	pH	Rad.	Fase crescimento	Enxofre (μM)	Glicose (g.L ⁻¹)	Amônio (mM)
<i>C. reinhardtii</i>	2		6,2	200	Exponencial	0	--	--
	6				Estacionária			
<i>Anabaena sp.</i>	3	32	10,2	30	Exponencial	--	2,1	0
	4				Exponencial			0,5
	7				Estacionária			0

C. - representa a condição de acordo com a otimização na terceira etapa. Temp. – temperatura. Rad.: radiação em μmol.fótons.m⁻².s⁻¹. -- não foi testado.

De acordo com as curvas de produção de hidrogênio (Figura 85), com ensaio para as duas espécies com duração de 180 horas, foi observado que as três melhores condições da otimização de *Anabaena* sp. apresentaram produções superiores às duas condições de *C. reinhardtii* que se destacaram na terceira etapa.

Figura 85 - Comparação das curvas de produção de hidrogênio (mmol.L^{-1}) (A) entre *C. reinhardtii* nas condições 2 e 6 (C. 2 e C. 6) e *Anabaena* sp. nas condições 3, 4 e 7 (A. 3, A. 4 e A. 7) com a otimização. Barras indicam desvio padrão ($n=3$)

A análise de variância dos parâmetros de produção de hidrogênio permite a confirmação dos resultados observados com as curvas de produção de hidrogênio. As condições 3, 4 e 7 de *Anabaena* sp. obtiveram produção máxima, volume máximo, produtividade e μ_{max} significativamente superiores aos das condições 2 e 6 de *C. reinhardtii* (Tabela 48).

Em relação à produção máxima de hidrogênio, a condição 3 de *Anabaena* sp. foi 2,95 e 3,95 vezes superior as condições 2 e 6 de *C. reinhardtii*, enquanto que a condição 4, nesta mesma sequência, foi maior em 3,22 e 4,32 vezes e a condição 7 superou a clorófitica em 3,15 e 4,22, respectivamente.

Quanto à produtividade, os resultados da cianobactéria também foram superiores, sendo que as condições 3, 4 e 7 apresentaram 3,24, 3,24 e 4

vezes a mais que a condição 2 da clorófitica, e 4,70, 4,71 e 5,80 vezes melhores que a condição 6 de *C. reinhardtii*, na mesma sequência.

Tabela 48 - Comparação dos parâmetros de produção de hidrogênio entre as melhores condições de *C. reinhardtii* e *Anabaena* sp. após a otimização

Espécie	C.	Produção máxima (mmol.L ⁻¹)	Volume máximo (mL.L ⁻¹)	Produtividade (μmol.L ⁻¹ .h ⁻¹)	μ _{max} (h ⁻¹)
<i>C. reinhardtii</i>	2	3,57 ± 0,31	68,74 ± 4,12	21,98 ± 0,86	0,066 ± 0,02
	6	2,67 ± 0,03	55,25 ± 5,93	15,14 ± 1,41	0,047 ± 0,01
<i>Anabaena</i> sp.	3	10,54 ± 1,45 ^a	360,38 ± 33,39 ^b	71,17 ± 5,36 ^c	0,269 ± 0,07 ^d
	4	11,52 ± 2,15 ^a	394,01 ± 7,04 ^b	71,29 ± 10,36 ^c	0,225 ± 0,02 ^d
	7	11,25 ± 3,70 ^a	408,56 ± 65,04 ^b	87,87 ± 8,17 ^c	0,290 ± 0,08 ^d

C. representa a condição de acordo com a otimização na terceira etapa. Letras indicam diferença estatística (p < 0,05).

a: Condições 3, 4 e 7 de *Anabaena* sp. não são diferentes quanto à produção máxima de hidrogênio, e estas são diferentes das condições: 2 e 6 de *C. reinhardtii*.

b: Condições 3, 4 e 7 de *Anabaena* sp. não são diferentes quanto ao volume de hidrogênio, e estas são diferentes das condições: 2 e 6 de *C. reinhardtii*.

c: Condições 3, 4 e 7 de *Anabaena* sp. não são diferentes quanto à produtividade, e estas são diferentes das condições: 2 e 6 de *C. reinhardtii*.

d: Condições 3, 4 e 7 de *Anabaena* sp. não são diferentes quanto à μ_{max}, e estas são diferentes das condições: 2 e 6 de *C. reinhardtii*.

Portanto, diante destes resultados, pode-se afirmar que a *Anabaena* sp. apresentou, de modo geral, melhor desempenho de produção de hidrogênio comparado a *C. reinhardtii*, apesar de serem processos e fatores limitantes distintos, de acordo com a metodologia adotada de duas fases experimentais, com transferência de biomassa após crescimento das culturas para fotobiorreatores com sistema fechado e troca do gás atmosférico do *headspace*.

6 DISCUSSÃO

Microalgas são um grupo de microrganismos fotoautotróficos altamente diversificado e com importantes funções no ecossistema aquático. As divisões deste grupo são distinguidas pela diversidade química e diferenças morfológicas (STEVENSON, 1996), além das diferenças quanto à estrutura e integração dos componentes dos pigmentos fotossintéticos, como o transporte de elétrons e enzimas (MACINTYRE; CULLEN, 2004).

O grupo das microalgas varia amplamente quanto à composição bioquímica e respostas fisiológicas, o que reflete na determinação das características do ambiente em que crescem (MACINTYRE; CULLEN, 2004). Devido à isto possuem diferentes modos de vida, respondendo de modo distinto à radiação luminosa, temperatura e regime de nutrientes (WETZEL, 1993), podendo ocorrer numa enorme variedade de ambientes (BICUDO, 2006).

As microalgas são organismos versáteis capazes de converter energia luminosa em uma variedade de produtos comerciais, e a biomassa pode ser utilizada como matéria-prima para a produção de diversos biocombustíveis, como biodiesel, etanol, metano e hidrogênio (DEMIRBAS, 2010; RAZEGHIFARD, 2013; DUBINI; GHIRARDI, 2015), por produzirem quantidades úteis de açúcares e lipídeos, dependendo da espécie e suas condições de cultivo (SLADE; BAUEN, 2013).

Um dos produtos do metabolismo das microalgas é a fonte de energia hidrogênio, e uma de suas principais vantagens é não liberar produtos tóxicos em sua combustão e ser fonte inesgotável (DUBINI; GHIRARDI, 2015).

Por essa diversidade e diferenças entre grupos taxonômicos, optou-se em trabalhar com cepas de espécies de grupos distintos, *Anabaena* sp., representando as cianobactérias, e *Chlamydomonas* sp., as clorofíceas, que além de possuírem distintas morfologias, possuem diferentes pigmentos fotossintéticos e enzimas para a produção de hidrogênio.

Chlamydomonas é utilizada como organismo modelo para a compreensão do metabolismo de produção de hidrogênio em microalgas e diferentes hipóteses são testadas para aperfeiçoar esta produção e torná-la aplicável comercialmente (DUBINI; GHIRARDI, 2015). *Anabaena* sp. é utilizada para estudos de produção de hidrogênio a partir da nitrogenase, enzima existente apenas em cianobactérias, além da hidrogenase (BENEMANN, 2000; BOTHE et al., 2010; WEBER et al., 2014), o que à diferencia das pesquisas com a clorofícea.

Além de diferentes gêneros, também foram testadas nesta pesquisa diferentes cepas. A decisão de se trabalhar com diferentes cepas de um mesmo gênero de *Anabaena* sp. e *Chlamydomonas* sp., é devido à produção de hidrogênio poder ser influenciada pelo tipo de cepa e tamanho dos microrganismos, além de serem versáteis e sobreviverem em diferentes condições ambientais. A caracterização das diferentes cepas fornecem informações importantes para a eficiência no processo de produção do hidrogênio (JO et al., 2006; TAMAGNINI et al., 2002; CHANDRA; MOHAN, 2011).

As cepas adquiridas nos bancos de microrganismos foram de acordo com trabalhos já realizados com elas, de ambos gêneros, além de cepas ainda não estudadas ou pouco estudadas, como a *Chlamydomonas* sp. isolada de um reservatório (NCh03) e a de *Anabaena* sp. 1448.

Anteriormente à produção de hidrogênio, na primeira etapa da pesquisa, as cepas foram purificadas, sendo que as que foram possíveis de axenizar foram pré-selecionadas para dar sequência à pesquisa, pois a presença de bactérias pode influenciar no crescimento das microalgas (WETZEL, 1993), e, além disso, a presença delas poderia produzir ou consumir hidrogênio, a partir dos diferentes tipos de enzimas hidrogenase (BERCHTOLD; BACHOFEN, 1979; DAS; VEZIROGLU, 2001), influenciando nos resultados.

Com as cepas selecionadas após a purificação fez-se a caracterização do crescimento delas e a quantificação de biomassa. Além disso, foi realizado teste para melhorar as condições de cultivo das cepas,

uma vez que elas estavam sendo mantidas conforme instruções dos bancos de microrganismos, a partir da manipulação de variáveis físico-químicas.

Esta caracterização de crescimento e testes de condição de cultivo foram realizados para que pudessem ser obtidos melhores resultados nas etapas posteriores da pesquisa e possivelmente prever a cepa que poderia ter melhor desempenho na produção de hidrogênio ao se destacar quanto ao seu crescimento e obtenção de biomassa, uma vez que é necessário elevada densidade das culturas para que ocorra a produção de hidrogênio (KOSOUROV et al., 2002; TAMBURIC et al., 2011; ANTAL et al., 2015).

As algas possuem rápido crescimento quando adaptadas ao ambiente, podendo dobrar sua densidade dentro de horas quando se encontram nas condições ideais de crescimento, até mesmo em sistemas de fotobiorreatores fechados (RAZEGHIFARD, 2013).

O cultivo em sistema fechado foi mais um dos testes realizados com as cepas selecionadas, pois todos os ensaios deveriam ser realizados em sistemas fechados para que o gás produzido pudesse ser capturado.

Uma das ferramentas para otimizar o cultivo de microalgas é por meio da manipulação de variáveis físico-químicas (SANTOS, 2013). Pesquisas desenvolvidas por Tiwari e Pandey (2002), Kaushik e Anjana (2011) e Das e Veziroglu (2008) relatam a influência das condições físico-químicas das culturas de microalgas para a produção de hidrogênio, como pH, radiação, temperatura e condições nutricionais.

Devido à variedade de fatores e cepas, optou-se em melhorar as condições de crescimento dos cultivos com uma cepa de cada gênero apenas com a variação de diferentes níveis de pH e radiação, que além de influenciar no crescimento, são estudadas por influenciarem na produção de hidrogênio (DASGUPTA et al., 2010; ALLAHVERDIYEVA et al., 2010; KAUSHIK; ANJANA, 2011; SALEEM et al., 2012).

Se compararmos os dois gêneros em estudo, pode-se notar, observando as curvas de crescimento das Figuras de 20 à 31, que o comportamento de crescimento delas quanto ao pH é divergente, pois a

clorofícea apresentou melhor desempenho em pH mais baixos, 6,2 e 7,2, e a cianobactéria, nos pH 9,2 e 10,2.

Os melhores resultados obtidos para o crescimento de *Chlamydomonas* spp. corroboram com resultados de melhores produções de hidrogênio em pesquisas anteriores com: pH 7, ao testar pH 6, 7 e 8 (JO et al., 2006), 7,5, testando a faixa de pH 7,5 à 9,5 (SALEEM et al., 2012) e 7,7, com variação de 6,5 à 8,2 (KOSOUROV et al., 2003). Portanto, adotou-se para a segunda etapa o pH 7,2.

Quanto à *Anabaena* sp. o melhor crescimento foi obtido em meio de cultura mais básico, porém há referências para a produção de hidrogênio com melhores resultados em pH mais baixos à estes. Em teste nas faixas de pH de 4 a 9 com *Lyngbya* sp., encontrou-se melhor resultado em pH 8 (KAUSHIK; ANJANA, 2011), e em testes com *Anabaena* sp., Allahverdiyeva et al. (2010), comparando o pH 7,5 e 8,2, obteve maior produção de hidrogênio em 7,5, embora não tenha ocorrido diferença estatística. Jeffries et al. (1978) analisou o pH 7,4 e 9,4 para a produção de hidrogênio com *Anabaena cylindrica* e obteve melhores resultados com o pH mais básico.

Devido à estes resultados, fez-se a opção de realizar a segunda etapa da pesquisa com pH 9,2, pois tem-se relatos de produção de hidrogênio com pH próximo à este, e com o intuito de esta variável não influenciar no desenvolvimento da cepa, uma vez que, em pH mais ácido, demonstrou menor crescimento.

As radiações com melhor resultado para o melhoramento do cultivo nesta etapa, 60 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para *Anabaena* spp. e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ para *Chlamydomonas* spp., foram compatíveis à intensidades ideais para a produção de hidrogênio de acordo com resultados obtidos na literatura (MASUKAWA et al., 2001; KOSOUROV et al., 2002).

Em relação aos resultados obtidos com a caracterização das cepas foi observado que a cepa de melhor desempenho de *Chlamydomonas* sp. foi CC124, tanto em relação aos parâmetros de crescimento quanto em obtenção de biomassa. Inicialmente acreditou-se que esta cepa seria a melhor produtora de hidrogênio na segunda etapa da pesquisa, pois a

produtividade e a velocidade específica de crescimento da cepa estão diretamente relacionadas (SANTOS, 2013).

Além destas evidências, várias pesquisas já foram realizadas com esta cepa para a mesma finalidade, demonstrando ter potencial para produção de hidrogênio, além de estudos caracterizando o seu genoma (ZHANG; HAPPE; MELIS, 2002; KOSOUROV et al., 2003; SCOMA et al., 2012; TAMBURIC et al., 2012).

Quanto às cepas de *Anabaena* spp., na primeira etapa da pesquisa, foi observado desempenho semelhante nos parâmetros de crescimento entre 1444 e 1448, e melhores que 2576, porém, foi esta última que apresentou maior crescimento. A hipótese levantada foi que as cepas 1444 e 1448 teriam melhor produtividade de hidrogênio devido ao crescimento mais rápido, além de melhor desempenho destas no teste de meio de cultivo com a fonte de carbono orgânico, a glicose.

Porém, muitas pesquisas de produção de hidrogênio foram desenvolvidas com a cepa 2576 (referenciada também como *Nostoc* - PCC7120) (TAMAGNINI et al., 2000; SCHUTZ et al., 2004; MARQUES et al., 2011; KOSOUROV et al., 2014), embora há desenvolvimento de estudos também com 1444 (referenciada também como ATCC 29413) (TAMAGNINI et al., 2000; LIU et al., 2006; BERBEROGLU et al., 2008; MARKOV et al., 2015), comprovando que são cepas produtoras de hidrogênio pelas vias de hidrogenase (biofotólise direta) e nitrogenase (biofotólise indireta).

Com os testes de metodologia das vias de produção de hidrogênio realizado ao fim da primeira etapa do projeto, verificou-se que a biofotólise direta aeróbia não é uma via rentável para a produção de hidrogênio com estas cepas, para ambos os gêneros, sendo que a produção de *Anabaena* spp. foi abaixo do limite de detecção e *Chlamydomonas* spp. apresentou picos momentâneos de hidrogênio em um dos testes, e em outro, produção prolongada, porém em baixa concentração comparado à testes posteriores.

Esses dados corroboram com a literatura em que a produção de hidrogênio em condição aeróbia é momentânea e de difícil detecção, comparado ao processo anaeróbio, no qual ocorre maior produção e por

período prolongado, tanto por *Chlamydomonas* sp. quanto por *Anabaena* sp. (VYAS; KUMAR, 1994; MCKINLAY; HARWOOD et al., 2010; GHIRARDI, 2015).

Durante a fotossíntese, os fótons são absorvidos pelos cloroplastos e a energia luminosa facilita a oxidação fotoquímica da água no fotossistema II, transformando-a em prótons H^+ e oxigênio. Este processo gera elétrons, que por sua vez são transportados à enzima hidrogenase de ferro através da ferredoxina. A enzima [Fe] – hidrogenase catalisa os prótons e elétrons para produzir o hidrogênio. Porém a atividade desta enzima é inibida na presença de oxigênio molecular, limitando o processo de biofotólise direta aeróbia (BENEMANN, 1997; TAMBURIC et al., 2011).

No teste de produção de hidrogênio por biofotólise direta anaeróbia por *Chlamydomonas* sp., a partir da privação de enxofre, foi possível obter concentração deste gás em média 11 vezes maior do que no aeróbio, e a cepa que obteve maior produção foi CC425, 32% a mais que CC124, a qual foi estimada em ser melhor inicialmente.

De acordo com estes testes optou-se então por esta última via de produção de hidrogênio e com privação de enxofre para as cepas de clorofíceas nas etapas subsequentes do projeto, embora não tenha sido realizado em duas fases experimentais, com as quais tenderia haver melhoras na produção de hidrogênio. Esta questão será discutida adiante com a integração dos resultados da segunda etapa.

Após o teste aeróbio para *Anabaena* sp., fez-se o teste da via biofotólise direta anaeróbia com a privação de enxofre e da biofotólise indireta, com privação de nitrogênio, sendo estas separadamente ou associadas, com a troca da atmosfera do *headspace* por nitrogênio. Em todas as condições testadas a produção de hidrogênio foi abaixo do limite de detecção.

Por fim, ao testar estas duas vias com a troca da atmosfera do *headspace* por argônio, foi possível detectar a produção de hidrogênio, porém em maior proporção na condição em que só houve privação de nitrogênio, seguido da condição com privação de nitrogênio e enxofre. A

cepa 1444 apresentou melhor desempenho que 2576, como esperado a partir da caracterização delas.

A condição em que houve privação de enxofre e o nitrato de sódio do meio de cultura foi substituído por cloreto de sódio não houve produção significativa de hidrogênio, provavelmente por ter ocorrido influência e toxicidade da salinidade no crescimento da cepa (RAI; ABRAHAM, 1995), além da provável influência da ausência do enxofre.

Com a privação de enxofre, juntamente com a de nitrogênio, houve menor produção de hidrogênio, comparado à privação de nitrogênio apenas, provavelmente porque o enxofre é um componente estrutural da nitrogenase (cofator FeMo), limitando portanto a síntese desta enzima (EADY, 1996; BOTHE et al., 2010; WEBER et al., 2015).

Os testes realizados nas mesmas condições e concentrações nutricionais dos meios de cultura apenas alterando-se o gás do *headspace*, demonstra que o nitrogênio atmosférico foi fator limitante para a produção de hidrogênio, conforme relatado por Lambert et al. (1979) e Yeager et al. (2011), em que a presença deste gás inibe a síntese de nitrogenase e consequentemente, a produção de hidrogênio por esta enzima.

Em relação à produção positiva de hidrogênio com argônio no *headspace*, Allahverdiyeva et al. (2010), Liu et al. (2006) e Neilson et al. (1971) relatam que este gás é inerte e que trocar a atmosfera dos fotobiorreatores por ele, proporciona um ambiente microaeróbio, técnica utilizada em muitas pesquisas (MASUKAWA et al., 2001; LINDBLAD et al., 2002; SCHUTZ et al., 2004; KAUSHIK; ANJANA, 2011; YEAGER et al., 2011), além da privação de nitrogênio, que também auxilia a propiciar este ambiente, cujo processo será discutido adiante.

Ao fim dos testes e com a definição das vias de produção de hidrogênio com as cepas dos dois gêneros, fez-se a opção para as etapas subsequentes em realizar os ensaios em duas fases experimentais, devido às privações nutricionais realizadas, pois a deficiência nutricional ocasiona estresse sobre a fisiologia celular, reduzindo a taxa de crescimento das

microalgas, podendo ser fatal para elas (ANDERSEN, 2005; ANTAL et al., 2015).

Portanto, para ocorrer produção eficaz de hidrogênio, o cultivo das microalgas realizado em duas etapas, a primeira fotossintética aeróbia, sem limitação nutricional, para que acumule reservas de carbono, e posteriormente, a fase de produção do gás por um período em anaerobiose, evita a perda de biomassa e o consumo de compostos orgânicos durante a primeira fase experimental, além disso, atingem densidade celular suficiente para a produção de hidrogênio (TAMBURIC et al., 2011; ANTAL et al., 2015).

O método de cultivo em duas fases experimentais com privação de enxofre na segunda fase, para as cepas de *Chlamydomonas* sp., foi eficiente para a produção de hidrogênio com todas as cepas estudadas na segunda etapa do projeto, corroborando com a eficiência do método conforme as pesquisas elaboradas por Ghirardi et al. (2000), Kim et al. (2006) e Tolstygina et al. (2009).

A eliminação do enxofre provoca a diminuição da atividade fotossintética no fotossistema II e consequente decréscimo na produção de oxigênio liberado durante a fotossíntese, e para que haja uma produção contínua de hidrogênio é necessário que o ambiente de cultivo torne-se anóxico (BENEMANN, 1997; MELIS et al., 2000; ZHANG; HAPPE; MELIS, 2002; TAMBURIC et al., 2011; ANTAL et al., 2015).

Portanto, há uma compensação da produção com o consumo de oxigênio, pois a evolução de oxigênio vai diminuindo gradualmente, enquanto a respiração é mantida, sendo então o metabolismo da alga responsável em proporcionar um ambiente anaeróbio e consequente produção de hidrogênio, não havendo inibição da hidrogenase pelo oxigênio (TAMBURIC et al., 2011; XU et al., 2014).

Porém, o principal problema quanto à este processo para que se tenha bons resultados é certificar-se que a fotossíntese será realmente reduzida para que ocorra pequena liberação de oxigênio, e este seja consumido pela respiração, e que a luz irá fornecer energia suficiente para a

liberação de hidrogênio pela hidrogenase. Desta forma, a cepa que consegue ter maior taxa respiratória consegue produzir hidrogênio mais rapidamente e em maior quantidade, devido ao maior consumo de oxigênio (XU et al., 2014; ANTAL et al., 2015).

Em pesquisas desenvolvidas para produção de hidrogênio com diferentes cepas de *C. reinhardtii*, a partir do cultivo em duas fases, e transferência da biomassa sob privação de enxofre, em condições normais de temperatura e pressão, foram obtidas as seguintes concentrações: 9,82 mmol.L⁻¹, por 140 horas (KIM et al., 2006); 12,32 mmol.L⁻¹, por 96 horas (KOSOUROV et al., 2003); 4,67 mmol.L⁻¹, por 80 horas (MELIS et al., 2000); 0,23 mmol.L⁻¹, durante 90 horas (TAMBURIC et al., 2011); 0,4 mmol.L⁻¹, por 144 horas (TSYGANKOV et al., 2006); 5,36 mmol.L⁻¹ por 120 horas (ZHANG; HAPPE; MELIS, 2002).

Os resultados encontrados nesta pesquisa estão de acordo com os resultados referenciados, tanto em relação à produção máxima de hidrogênio, quanto em produtividade, sendo até mesmo superior a alguns. Porém é válido lembrar que apenas CC124, CC425 e D66 pertencem à esta espécie referenciada, SAG 24.91 corresponde à outra espécie do mesmo gênero, *C. moewusii*, e N Ch03 não foi identificada em nível de espécie.

A cepa CC425 apresentou o melhor desempenho, produzindo média em cerca de 3 vezes mais hidrogênio e produtividade 3,8 maior comparada as demais cepas deste gênero, com 2,88 e 2,64 mmol de hidrogênio por litro de cultura na menor e maior radiação, respectivamente, em 204 horas.

A cepa CC425 foi uma das que produziu menor quantidade de biomassa e μ_{max} na caracterização das cepas e durante os ensaios da segunda etapa, não sendo inferior apenas à N Ch03. Esta cepa também foi a que apresentou melhor produção nos ensaios testes de metodologia.

A cepa CC124, estimada inicialmente a ser melhor produtora de hidrogênio na primeira etapa da pesquisa, obteve biomassa inicial na segunda fase experimental semelhante à CC425, porém, mesmo estas sendo de mesma espécie, *C. reinhardtii*, CC425 obteve produtividades 160% e 126% maior em 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, respectivamente. A cepa

D66, de mesma espécie também, obteve em média 1,6 vezes a mais de biomassa que estas outras duas, mas foi uma das cepas que apresentou menor produtividade.

A cepa N Ch03 demonstrou produção de hidrogênio semelhante à SAG 24.91, e superior à D66, mesmo obtendo biomassa 3,3 e 5,8 vezes menor que estas, respectivamente. Porém obteve baixa produtividade por ter baixa velocidade de crescimento e de produção de hidrogênio em relação às demais. Ferramentas de otimização no cultivo desta cepa, isolada do ambiente durante esta pesquisa, podem melhorar o seu potencial como produtora de hidrogênio.

A diferença de produção de hidrogênio também ocorreu entre diferentes espécies do gênero *Chlamydomonas*. A cepa SAG 24.91, *C. moewusii*, obteve biomassa semelhante às cepas CC124 e CC425. A produção de hidrogênio e produtividade de SAG 24.91 foi inferior à CC425, e não apresentou diferença com a CC124.

Estes resultados confirmam a divergência na produção de hidrogênio por diferentes cepas e espécies, conforme relatado por Jo et al. (2006) e Chandra e Mohan (2011), além de haver diferentes tipos da enzima hidrogenase, e com diferenças genéticas entre elas, podem ser diferentes entre espécies (VIGNAIS; BILLOUD, 2007). Este fato pode justificar os resultados divergentes obtidos entre as cepas desta pesquisa por esta enzima influenciar no metabolismo envolvido na produção deste gás.

Em experimento realizado comparando a produção de hidrogênio entre cepas de *C. reinhardtii* e *C. moewusii* (SAG 24.91), os pesquisadores demonstraram que a primeira, em meio TAP com privação de enxofre, atingiu anaerobiose com aproximadamente 30 horas e a fotoprodução de hidrogênio se iniciou com 26 horas, atingindo 120 mL.L⁻¹ de hidrogênio. *C. moewusii*, nas mesmas condições, mostrou ligeiro declínio do oxigênio após 80 horas de privação de enxofre e não teve produção significativa de hidrogênio (MEUSER et al., 2009).

Além disso, Meuser et al. (2009) encontraram evidências que *C. moewusii*, apesar de ter atividade significativa da hidrogenase in vitro,

apresentou dificuldades para a absorção do acetato, o que pode ter contribuído para o ambiente não ter ficado totalmente anaeróbio ou pela demora do consumo de oxigênio comparado à *C. reinhardtii* (MELIS et al., 2000).

Os resultados destes pesquisadores podem ser um indicativo da menor produção de hidrogênio por *C. moewusii* nesta pesquisa, que é a mesma cepa, e ter menor assimilação de acetato e consequente menor metabolismo mixotrófico e decréscimo do oxigênio no meio.

A partir de pesquisas de produção de hidrogênio com *Chlamydomonas* em condições de autotrofia e mixotrofia, Fouchard et al. (2005), Tsygankov et al. (2006) e Kosourov et al. (2007) confirmaram produção superior em condições mixotróficas, confirmando a importância da presença do ácido acético no meio de cultura e sua assimilação, além deste contribuir para tornar o meio anaeróbio.

Outro fator que pode ter contribuído para a diferença de produção de hidrogênio entre estas cepas são em relação aos genes envolvidos na expressão da hidrogenase e os transportadores de elétrons, as ferredoxinas. Em *C. reinhardtii*, dois tipos de hidrogenases podem ser expressas, codificadas pelos genes HYDA1, sendo esta a principal enzima, e HYDA2, que contribui na fotoprodução com aproximadamente 25% em relação a primeira (FORESTIER et al., 2003; MEUSER et al., 2012). Porém estes genes só conseguem se expressar quando estão em condições anaeróbias ou microaeróbias. Além destes há também os genes responsáveis pela maturação das hidrogenases, HYDEF e HYDG, altamente sensíveis ao oxigênio (POSEWITZ et al., 2005).

Conforme os resultados obtidos, a terceira etapa da pesquisa foi realizada com a cepa CC425, sendo inicialmente realizada a otimização da primeira fase experimental com variações do pH, radiação e temperatura. Com a otimização desta fase foi possível obter maior rendimento de biomassa, o que pode permitir maior eficiência na produção de hidrogênio (TAMBURIC et al., 2011; ANTAL et al., 2015).

A otimização da segunda fase experimental de *C. reinhardtii* consistiu em manter as condições de temperatura e pH estabelecidos na primeira fase, embora o pH utilizado seja mais ácido (6,2) que o recomendado para a produção de hidrogênio, como discutido anteriormente, e temperatura mais elevada (32°C). Houve variação da radiação nos mesmos níveis estabelecidos na segunda etapa, pela faixa ótima para produção de hidrogênio ser de 50 a 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (DASGUPTA et al., 2010), e com o intuito de testar a compensação do oxigênio entre fotossíntese e respiração sob privação de enxofre ou adição deste na concentração de 50 μM .

Kosourov et al. (2002) fez ensaios com privação de enxofre e com enxofre nas concentrações de 12,5, 25, 50 e 100 μM , em 300 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, enquanto que Zhang, Happe e Melis (2002) fez privação de enxofre e adição de 50 μM de enxofre, em 120 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Este primeiro obteve melhores resultados de produção de hidrogênio com a adição de 25 μM de enxofre na segunda fase experimental e com 50 μM em situações de fotoperíodo de 14h claro/10 h escuro, enquanto que o segundo obteve melhor produção com a adição de enxofre de 50 μM .

Nestes casos, com a adição destas concentrações de enxofre combinadas às radiações, foi possível estabelecer melhor ponto compensatório entre as taxas fotossintéticas e respiratórias do oxigênio, permitindo maior produção de hidrogênio.

Porém, há várias pesquisas que contradizem o efeito positivo de baixas concentrações de enxofre durante a segunda fase experimental, em luz contínua, como melhora para a produção de hidrogênio. Laurinavichene et al. (2006) fez testes com privação de enxofre e adições de 10, 20 e 460 μM , com radiação de 120 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, e Pinto (2011) testou a privação e 50 μM de enxofre, em 480 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Nestas duas pesquisas as melhores produções de hidrogênio ocorreram com a privação de enxofre.

O mesmo foi observado com os resultados obtidos na atual pesquisa, em que a ausência do enxofre procedeu a melhores resultados, embora as

radiações tenham sido diferentes, não se conseguindo atingir o objetivo de melhorar a produção de hidrogênio com este fator, devido, provavelmente, às radiações utilizadas. Rühle et al. (2008) pesquisaram o efeito da luz e o ponto compensatório de várias cepas selvagens e mutantes, e afirmaram que a radiação em que ocorre ponto compensatório para a cepa CC425 é de $27,2 \pm 6,4 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, inferior à utilizada no ensaio de otimização.

Contudo, foi possível através da otimização da segunda fase experimental melhorar a produtividade de hidrogênio, havendo produções na radiação de $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ superiores em 49% e 29% a menor e maior radiação da segunda etapa, respectivamente. Estes resultados demonstraram que fatores como a temperatura (32°C) e o pH (6,2) interferiram na produção de hidrogênio, que foram o diferencial entre as melhores produções da segunda e terceira etapas da pesquisa, corroborando com Dasgupta et al. (2010) e Das e Veziroglu (2008).

A transferência de biomassa para os fotobiorreatores com a cultura na fase exponencial de crescimento demonstrou melhores resultados que a transferência na fase estacionária. Isto pode ter ocorrido devido ao menor metabolismo das microalgas durante a fase estacionária (ANDERSEN, 2005), prejudicando a produção de hidrogênio, porém o ensaio testando as fases de crescimento para a transferência de biomassa foi realizado devido à escassez de pesquisas com culturas na fase estacionária.

Quanto às cepas de *Anabaena* spp. para a produção de hidrogênio, nas segunda e terceira etapas, também foi utilizado o método de cultivo em duas fases experimentais, mas com a privação de nitrogênio na segunda fase, como já mencionado, e troca do *headspace* por argônio. Além disso, para *Anabaena* spp. fez-se limitação de nitrogênio na primeira fase experimental para estimulação de formação de heterocistos, porém, o crescimento e obtenção de biomassa para a realização dos ensaios não foram afetados, pois os cultivos anteriores de aclimação e aumento de volume da cultura foram realizados com meio de cultura BG-11 normal.

De forma semelhante ao ocorrido com *Chlamydomonas* spp., o método aplicado de cultivo em duas fases também foi eficiente para a

produção de hidrogênio com as cepas de *Anabaena* spp., conforme pesquisas realizadas por Schutz et al. (2004), Barbosa (2009) e Ferreira et al. (2012). Todavia, não foi possível obter resultados positivos com a cepa 2576, referenciada em várias pesquisas com potencial para esta finalidade.

A privação de nitrogênio no meio de cultura e no headspace proporcionam a formação de heterocistos, até três vezes mais (WEISSMAN; BENEMANN, 1977), e a síntese de nitrogenase, possibilitando a produção de hidrogênio através da biofotólise indireta (NEILSON et al., 1971; BERCHTOLD; BACHOFEN, 1979; BOTHE et al., 2010) até quatro vezes mais (LINDBLAD et al., 2002).

Além disso, a limitação por nitrogênio reduz a capacidade fotossintética levando o meio à anaerobiose (WEISSMAN; BENEMANN, 1977; ANTAL et al., 2015), embora seja possível haver a produção de hidrogênio pela nitrogenase em meio aeróbio, mesmo esta sendo sensível ao oxigênio, por esta enzima localizar-se nos heterocistos (HOUCHINS, 1984). Os heterocistos são células com parede celular espessa e contem apenas um fotossistema (PS I) do aparato fotossintético, possibilitando então a anaerobiose celular local (RIVIERS, 2008).

Na ausência de nitrogênio, os carreadores de elétrons da nitrogenase, ao invés de fixar o nitrogênio molecular e transformá-lo no íon amônia e hidrogênio, direcionam os elétrons apenas para a formação de hidrogênio, a partir de prótons H^+ (LINDBLAD et al., 2002; YEAGER et al., 2011; WEBER et al., 2014).

Porém, um dos principais problemas da geração de hidrogênio a partir da nitrogenase, além do gasto energético, é a presença da hidrogenase de captação na membrana dos heterocistos, presente em todas as cianobactérias que possuem heterocistos, reciclando o hidrogênio molecular em prótons e elétrons (TAMAGNINI et al., 2002; VIGNAIS; BILLOUD, 2007; BOTHE et al., 2010).

A adição de glicose durante a fase de produção de hidrogênio ameniza a ação da hidrogenase de captação, aumentando assim, a produção de hidrogênio a partir da nitrogenase sob a privação de nitrogênio

(TAMAGNINI et al., 2002; TIWARI; PANDEY, 2012), além de servir de substrato para as funções da nitrogenase e fornecer energia para superar a alta demanda energética para a síntese de hidrogênio (ROSENBAUM; SCHRÖDER, 2010).

Na atual pesquisa, a adição de glicose na primeira fase experimental auxiliou no crescimento das culturas de *Anabaena* spp. e aumento da reserva energética para a fase subsequente, por apresentarem melhor desempenho com a adição de glicose, corroborando com (STEBEGG, 2011). A adição dela na segunda fase contribuiu, provavelmente, para auxiliar na minimização do efeito da hidrogenase de captação.

Além da privação de nitrogênio, a presença do gás argônio no *headspace* também proporciona anaerobiose, como já discutido, além de não prejudicar o crescimento de *Anabaena* spp., uma vez que as cianobactérias são capazes de crescer neste meio (STEWART; PEARSON, 1970).

Por isso, além de ocorrer a produção de hidrogênio por biofotólise indireta, possivelmente ocorre também a produção por biofotólise direta anaeróbia através da hidrogenase, não ocorrendo a inibição desta pela presença do oxigênio.

Embora o heterocisto seja uma estrutura internamente anaeróbia, a hidrogenase pode estar presente na membrana deles, juntamente com a hidrogenase de captação, ou nas células vegetativas. O local onde se encontram depende do tipo de enzima e da cepa (TAMAGNINI et al., 2002). Sendo assim, é necessário que o meio esteja anaeróbio para que a produção de hidrogênio a partir da hidrogenase seja eficiente.

Para poder distinguir a proporção de hidrogênio produzido por estas enzimas sob as condições de privação de nitrogênio e anaerobiose, é muito utilizada a técnica de inserção de gás acetileno no *headspace*, geralmente na proporção de 10%, juntamente com argônio, para avaliar a atividade da nitrogenase pelas cianobactérias. A presença e ativação da nitrogenase são comprovadas pela redução do acetileno (C_2H_2) à etileno (C_2H_4) (STEWART;

PEARSON, 1970; HOUCHINS, 1984; TSYGANKOV et al., 1997; KOSOUROV et al., 2014).

Na atual pesquisa, não foi possível avaliar a atividade da nitrogenase pelas cepas de *Anabaena* spp. durante os ensaios de produção de hidrogênio devido à ausência de logística para a realização das análises cromatográficas de acetileno. Por isso, não é possível afirmar por qual via, hidrogenase e nitrogenase, e proporções que ocorreu a produção de hidrogênio. Porém, devido ao discutido, as condições proporcionadas para a realização dos ensaios, e os resultados obtidos, acredita-se que houve uma associação de produção por biofotólise direta e indireta.

Apesar de algumas pesquisas anteriores alegarem que a produção de hidrogênio por cianobactéria tem maior gasto energético e é menos rentável que a produção por clorofíceas, devido à hidrogenase de captação ligada à membrana (BENEMANN, 1997; DUTTA et al., 2005; ROSENBAUM; SCHRÖDER, 2010), em estudos realizados com cepas de *Anabaena* sp. foram encontrados resultados similares aos relatados com *C. reinhardtii*, demonstrando que este microrganismo tem potencial à produção de hidrogênio.

De acordo com a mesma metodologia adotada nesta pesquisa, porém sem adição de glicose, em condições normais de temperatura e pressão, Chen et al. (2014) relatou produção de hidrogênio de $1,93 \text{ mmol.L}^{-1}$ de cultura em 120 horas e Berberoglu et al. (2008) obteve $5,09 \text{ mmol.L}^{-1}$ de hidrogênio em 192 horas por litro de cultura, ambos com a cepa 1444, a mesma utilizada na segunda etapa desta pesquisa.

Porém, valores inferiores à clorofícea também já foram registrados, como por Masukawa et al. (2001) que obteve aproximadamente $0,002 \text{ mmol.L}^{-1}$ de hidrogênio por litro de cultura em 144 horas, com a cepa 1444, e Allahverdiyeva et al. (2010) que fez um *screening* com 15 cepas de *Anabaena* sp. obteve produção máxima de hidrogênio de $0,215 \text{ mmol.L}^{-1}$ e mínimo de $0,025 \text{ mmol.L}^{-1}$, por litro de cultura, em ensaios de 24 horas.

De acordo com os resultados obtidos na segunda etapa da atual pesquisa com a cepa 1444, foi possível obter produções de hidrogênio

superiores em 1,59 vezes e 4055 vezes, em relação a melhor e pior produção, respectivamente, comparado à literatura.

Estes dados demonstram que a metodologia adotada, com o diferencial de adição de glicose e limitação de nitrogênio durante a primeira fase experimental para antecipar a formação de heterocistos e síntese de nitrogenase, foram eficazes mesmo anteriormente à etapa de otimização de biomassa e produção de hidrogênio.

Segundo levantamento por Tamagnini et al. (2000) sobre os diversos tipos de hidrogenase e genes que as expressam em diferentes cepas de cianobactérias, detectaram a presença de genes que codificam a hidrogenase de captação e a hidrogenase bidirecional na cepa 1444, comprovando que a produção de hidrogênio por esta pode ter ocorrido por biofotólise direta, a partir da hidrogenase, embora tenha a presença da hidrogenase de captação, mas que pode ter sido inibida com a glicose.

Em relação ainda à segunda etapa da pesquisa, a cepa 1448, apresentou produções de hidrogênio e produtividade superiores à 1444, apesar de não haver diferença estatística. Devido à isto, baixos desvios padrões em seus resultados e a ausência de referências desta cepa na literatura, optou-se em realizar a terceira etapa com a cepa 1448.

Inicialmente foi realizada a otimização da primeira fase experimental com variações do pH, radiação e temperatura, com a qual foi possível obter melhor rendimento de biomassa em relação à segunda etapa. Antal et al. (2015), Tamagnini et al. (2002) e Liu et al. (2006), afirmam a importância de se ter cultura densa em biomassa de cianobactérias para eficientes produções de hidrogênio.

Na otimização da segunda fase experimental de *Anabaena* sp. manteve-se as condições estabelecidas de pH (10,2), temperatura (32°C) e radiação ($30 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) da primeira fase, embora o pH utilizado na segunda etapa e conforme levantamento bibliográfico para a produção de hidrogênio sejam inferiores à este, conforme já discutido, e a radiação luminosa inferior à utilizada nos ensaios anteriores. Hallenbeck e Benemann

(2002) afirmam que a produção de hidrogênio eficiente por biofotólise direta ocorre em baixas intensidades.

Porém, a temperatura mais elevada favorece a produção de hidrogênio em cianobactérias (ALLAHVERDIYEVA et al., 2010; TIWARI; PANDEY, 2012) sendo ela ótima na faixa de 30 a 40°C para esta finalidade (DUTTA et al., 2005), o que pode ter contribuído para o aumento da produção e produtividade de hidrogênio nesta etapa.

Devido à importância da presença de glicose durante a produção de hidrogênio para inibir a ação da hidrogenase de captação, para a otimização desta fase fez-se ensaios mantendo a concentração utilizada na etapa anterior, para verificar apenas o efeito da variação das condições físico-químicas da primeira fase experimental, e com o dobro da concentração de glicose.

Além disso, foram testadas também a adição de nitrogênio na forma de cloreto de amônio, na concentração de 0,5 mM no meio de cultura, e a ausência de amônio (NH_4Cl), neste caso havendo a presença deste elemento apenas na forma de citrato de amônio férrico de acordo com a concentração do meio de cultura BG-11.

Várias pesquisas foram desenvolvidas testando diferentes concentrações da adição de NH_4Cl , por o íon amônio ativar a produção de hidrogênio na ausência de nitrogênio, porém é limitante em concentrações superiores a 15 mM (LIU et al., 2010). Gutthann et al. (2007) obteve resultados positivos com adição de 5 mM de NH_4Cl ; Lindberg et al. (2002) com 2,5 mM, Troshina et al. (1995) com 0,5 mM, e Jeffries et al. (1978) com adição de 0,2 mM.

Não foi observado o efeito da adição de NH_4Cl para a produção de hidrogênio nas condições testadas, devido à ausência de diferenças estatísticas e divergências de resultados entre as condições comparadas, talvez por ter sido testada uma única concentração.

Embora não tenham ocorrido diferenças entre as condições testadas na otimização da produção de hidrogênio, foi notável que a produção e produtividade de hidrogênio foram superiores nas situações em que a

concentração de glicose foi maior, demonstrando a importância da fonte de carbono orgânico para a produção de hidrogênio com cianobactérias, e corroborando com as pesquisas que relatam a ação da glicose como inibidor da hidrogenase de captação.

Comparando à segunda etapa e somando-se o efeito da glicose e a otimização da primeira fase experimental, de acordo com os resultados obtidos com a transferência da biomassa para o fotobiorreator na fase exponencial de crescimento, foi possível obter em média aumento de 34% na produção de hidrogênio e 79% na produtividade.

Além disso, foi possível observar o efeito da temperatura, pH e radiação quando comparados todos os resultados de parâmetros de produção de hidrogênio da segunda etapa com os da terceira etapa nas condições de menor concentração de glicose e com transferência de biomassa na fase exponencial ($1,05 \text{ g.L}^{-1}$ – condições 1 e 2), sendo a maioria dos resultados superiores com a otimização.

Quanto aos ensaios de hidrogênio com transferência de biomassa em diferentes fases de crescimento, exponencial e estacionária, também não foram detectadas diferenças, embora Berchtold e Bachofen (1979) e Tamagnini (2002) afirmam que o tempo da cultura influencia na produção de hidrogênio.

Por fim, a semelhança na produção de hidrogênio entre as radiações de 60 e $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ na segunda etapa da pesquisa para os dois gêneros estudados, e também para *C. reinhardtii* na terceira etapa devem-se, provavelmente, as intensidades testadas estarem entre a faixa ótima (50 – $200 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, DASGUPTA et al., 2010). O efeito da radiação poderia ter sido melhor estudado com maior variação desta faixa.

Além disso, outro fator que pode ter interferido na falta de diferença entre os resultados nas radiações testadas é a ausência de agitação constante das culturas, pois Laurinavichene et al. (2006) e Tamburic et al. (2011) afirmam que este fator pode interferir no crescimento e produção de hidrogênio, além de dificultar a mistura dos gases no *headspace*.

Diante do discutido e resultados apresentados, observa-se que a otimização da produção de hidrogênio foi positiva para *C. reinhardtii* e *Anabaena* sp. Porém, se compararmos estes dois gêneros ficou evidente que a cianobactéria obteve melhores resultados, obtendo produção máxima de hidrogênio, produtividade e velocidade de produção 255, 314 e 362 % superiores à clorófitica, respectivamente.

Todavia, diante da metodologia aplicada, provavelmente *Anabaena* spp. também produziu hidrogênio por hidrogenase (biofotólise direta), contribuindo com a melhor produção de hidrogênio em relação à *Chlamydomonas* spp., além do auxílio da glicose no processo.

Além dos processos de biofotólise, a produção de hidrogênio pelos dois gêneros pode ter sido acrescida pela via fermentativa, pois durante a segunda fase experimental os fotobiorreatores foram estimulados à anaerobiose, além da presença de carbono orgânico, ácido acético para *Chlamydomonas* spp. e glicose para *Anabaena* spp., tornando-se ambiente favorável à fotofermentação.

Ao sistema tornar-se anaeróbio, as microalgas tem a capacidade de modificar o seu metabolismo para fermentativo anaeróbio, que, além de envolver o uso da energia luminosa para a quebra da água, gerando adenosina trifosfato e energia, irá ocorrer também a quebra de carboidrato para a geração de ácidos orgânicos, álcoois, dióxido de carbono e hidrogênio (HALLENBECK; BENEMANN, 2002; TAMBURIC et al., 2011; YANG et al., 2013), havendo assim, acúmulo de metabólitos produtos da fermentação.

Porém, levando em consideração que parte importante do metabolismo anaeróbio do piruvato ocorre no cloroplasto, no caso das clorófiticas, ou no citoplasma pelas cianobactérias, há uma competição entre a redução de hidrogênio e a formação dos elementos da fermentação (CATALANOTTI et al., 2013; ANTAL et al., 2015).

Durante as segunda e terceira etapas da atual pesquisa, as cepas de *Chlamydomonas* spp. produziram etanol, algumas em maior proporção que outras. Porém não houve produção de outros compostos provenientes da

fermentação. As cepas de *Anabaena* spp. também apresentaram subprodutos durante a produção de hidrogênio, como o etanol e ácidos acético e isovalérico, e não houve diferença entre as cepas, ao contrário do que ocorreu com a clorofícea.

A divergência nas concentrações dos produtos fermentativos entre as cepas de *Chlamydomonas* spp., principalmente entre *C. reinhardtii* (CC425) e *C. moewusii* (SAG 24.91) deve-se, provavelmente, à diferença entre elas na expressão da hidrogenase e nas vias da fermentação anaeróbia que envolvem o equilíbrio das reações de oxido redução dos elétrons, contribuindo para as diferentes atividades da hidrogenase e a segregação dos metabólitos secundários da fermentação (YANG et al., 2013). Meuser et al. (2009), também encontrou diferenças quanto ao catabolismo do amido e os produtos finais da fermentação entre essas duas espécies.

A cepa CC425, melhor produtora de hidrogênio de *Chlamydomonas*, foi a que menos produziu etanol comparado às outras cepas do gênero, mas esta produziu em torno de duas vezes mais que as cepas de *Anabaena*. Pesquisas realizadas por Catalanotti et al. (2013) e Philipps et al. (2012) comprovam a capacidade fermentativa de produção de hidrogênio por *Chlamydomonas*, McNeely et al. (2014) e Antal e Lindblad (2005) por cianobactérias, sendo escasso a pesquisa de via fermentativa com *Anabaena*.

A menor produção de metabólitos da fermentação por *Anabaena* sp. comparada à *C. reinhardtii* também justificam a melhor produção de hidrogênio pela cianobactéria, pois nas células desta há, provavelmente, menor competição da carreação de elétrons entre a produção de hidrogênio e formação de produtos da fermentação.

Por fim, diante dos resultados, a produção de hidrogênio a partir do metabolismo fermentativo pelos dois gêneros, mesmo que em menor proporção, não pode ser descartada, devido à detecção de metabólitos secundários.

Apesar disso, só foi detectado diminuição das taxas de carboidrato da biomassa nas cepas CC124 e CC425, na segunda etapa, e desta última na

terceira etapa, nas condições em que a biomassa foi transferida para os fotobiorreatores na fase exponencial. O maior consumo de carboidrato foi detectado na condição em que ocorreu a maior produção de hidrogênio.

Estes dados demonstram que, apesar do consumo de carboidrato por CC425, este não foi utilizado para a rota metabólica fermentativa e sim, possivelmente, para a obtenção de energia para a produção de hidrogênio, conforme relatado por Ballester et al. (2015), corroborando com Yang et al. (2013) que as cepas tem diferentes genes e expressões das hidrogenases e das vias fermentativas.

O que explica este fato é que nas primeiras 24 horas da privação de enxofre, há diminuição da reprodução dos aparatos fotossintéticos, o que resulta no acúmulo de amido. Posteriormente a este período, até em torno de 72 horas, quando a cultura estabelece condições de anoxia na luz, devido à inativação do fotossistema II, a assimilação do CO₂ é inibida, porém o transporte de elétrons fotossintéticos continua ativo, sendo posteriormente reduzido, e o amido acumulado é consumido (MELIS et al., 2000; TIMMINS et al., 2009; ANTAL et al., 2015).

Várias pesquisas relataram o decréscimo de concentrações de carboidrato na biomassa das microalgas quando produzem hidrogênio, como a de Fouchard et al. (2005), Kosourov et al. (2003) (CC124) e Melis et al. (2000).

Diferentemente, a cepa que apresentou bons resultados de produção de etanol (SAG 24.91), e consequentemente melhor via fermentativa, aumentou a sua concentração de carboidrato. De acordo com o relatado e com os resultados abordados, é provável que este processo de consumo de carboidrato tenha sido mais lento em *C. moewusii* comparado à *C. reinhardtii*, pois esta primeira apresenta ligeiro declínio de oxigênio após 80 horas sob privação de enxofre, corroborando com a hipótese de que o ambiente de *C. moewusii* tornou-se anóxico mais lentamente (MEUSER et al., 2009), como já discutido.

Além disso, há relatos na pesquisa de revisão de Melis (2007), que pode ocorrer acúmulo de carboidrato durante a produção de hidrogênio

devido à presença de ácido acético e metabolismo mixotrófico de *Chlamydomonas*. Na atual pesquisa, ficou comprovado o consumo do ácido acético por todas as cepas, com exceção de N Ch03.

Quanto as cepas de *Anabaena* spp., não houve redução nas concentrações de carboidrato em nenhuma das condições, tanto na segunda quanto na terceira etapa, com aumento da reserva energética devido à adição de glicose e capacidade de melhor crescimento em mixotrofia (STEBEGG, 2011). Além disso, verificou-se que as maiores concentrações de carboidrato ocorreram nas condições em que houve maior produção de hidrogênio na otimização.

Em compensação, as concentrações de proteína em todos os ensaios com *Chlamydomonas* spp. decresceram durante a fase de produção de hidrogênio, enquanto que *Anabaena* spp. não apresentou diferenças na concentração de proteína nos ensaios da segunda etapa, e na terceira houve ligeira queda nas concentrações, sendo elas com maior declínio nas condições em que houve maior produção de hidrogênio.

As condições estabelecidas nos fotobiorreatores, de estresse e limitação nutricional, como as privações de enxofre e nitrogênio, alteram as rotas metabólicas proteicas, diminuindo a produção de moléculas nitrogenadas e direcionando o fluxo de carbono à formação de moléculas como carboidratos e lipídeos (RIGANO et al., 1998; SANTOS, 2013), o que justifica a diminuição das concentrações de proteína e aumento, em algumas situações, das concentrações de carboidrato na biomassa das cepas na atual pesquisa.

De forma semelhante ao ocorrido nesta, pesquisas relatam o decréscimo de proteínas durante a produção de hidrogênio, e consequentemente de clorofila, por ser composto nitrogenado, com cepas de *Chlamydomonas* em privação de enxofre (KOSOUROV et al., 2002; ONCEL; VARDAR-SUKAN, 2009; PINTO, 2011).

Há também relatos com *Anabaena* em privação de nitrogênio, que além de afetar a síntese de proteínas e clorofila, havendo decréscimo em suas concentrações, também ocorre a degradação de ficocianinas,

causando o amarelamento das culturas, além de cessar o crescimento (NEILSON et al., 1971; SVESHNIKOV et al., 1997). O amarelamento das culturas sob privação de nitrogênio foi evidente em todos os ensaios com *Anabaena* spp.

A privação de enxofre e nitrogênio provoca a redução na taxa de crescimento das algas devido ao estresse causado a fisiologia celular, fazendo com que a cultura entre na fase estacionária de crescimento, cessando a divisão celular devido ao declínio na síntese de elementos nitrogenados (ANDERSEN, 2005; ANTAL et al., 2015).

Estes relatos justificam, portanto, a diminuição de biomassa, tanto em sólidos quanto em clorofila *a* por *Chlamydomonas* spp. nas duas etapas da pesquisa durante a produção de hidrogênio, embora tenha ocorrido aumento nas condições de otimização em que houve acréscimo de 50 μ M de enxofre, comprovando a influência deste elemento na síntese proteica.

Em relação à *Anabaena* spp., embora haja evidências na literatura sobre o efeito da limitação de nitrogênio na síntese proteica e influência na fotossíntese, como já discutido, foi observado declínio de biomassa, tanto em sólidos quanto em clorofila *a*, durante a produção de hidrogênio apenas com a cepa 1448, durante a segunda etapa, e na terceira etapa apenas nas condições em que o cloreto de amônio foi ausente e biomassa utilizada na fase exponencial. Nas demais condições, com a cepa 1444 e 1448 na otimização, a concentração de clorofila *a* permaneceu constante. Estes resultados são evidências de que cessou o crescimento e síntese proteica, corroborando com a literatura.

Os resultados de remoção de nutrientes demonstram que todas as cepas estudadas são eficientes para esta finalidade, e que as cepas que mais produziram hidrogênio e utilizadas para a otimização (CC425 e 1448) foram as que, de modo geral, menos removeram nitrogênio e carbono, porém removeram mais fósforo, quando comparadas à todas as cepas, provavelmente por ser elemento essencial para a produção de energia.

Porém, quando os gêneros são comparados, CC425 tem maior potencial para a remoção de nutrientes que 1448, embora esta última

quando utilizada para produzir hidrogênio na fase estacionária, apresentou melhor desempenho que a clorofícea.

Diante disso, vê-se a possibilidade da associação de interesses entre a produção de hidrogênio e o tratamento de águas residuárias, como já estudado com cianobactérias em água enriquecida com glicerol (BANDYOPADHYAY et al., 2010; KAUSHIK et al., 2011; OLGUÍN, 2012), *Anabaena* sp. em meios contaminados com amônio (MARKOV et al., 2015), e com clorofíceas (CHANDRA; MOHAN, 2011).

Além desta perspectiva futura, veem-se também esforços na engenharia genética em desenvolver cepas com mutações genéticas, analisando-se as vantagens e desvantagens, para tornar a hidrogenase menos sensível ao oxigênio (GODAUX et al., 2013; DUBINI; GHIRARDI, 2015; GHIRARDI, 2015), aumento da taxa respiratória para acelerar o processo de anaerobiose (XU et al., 2014) e mutações na hidrogenase de captação das cianobactérias para diminuir o efeito da reciclagem de hidrogênio produzido pela nitrogenase (MARQUES et al., 2011; TIWARI; PANDEY, 2012; KOSOUROV et al., 2014).

Portanto, pesquisas para entender os processos metabólicos e fatores que influenciam a produção de hidrogênio em meio sintético com cepas potenciais, como a atual, subsidiam pesquisas futuras para a otimização de produção de hidrogênio e produtividade a partir da engenharia genética associada com o tratamento de águas residuárias.

7 CONCLUSÕES

Os testes metodológicos das vias de produção de hidrogênio por *Chlamydomonas* spp. e *Anabaena* spp. a partir da biofotólise direta anaeróbia, e esta associada com a biofotólise indireta para cianobactéria, foram mais satisfatórios que a produção por biofotólise direta aeróbia, devido à sensibilidade da hidrogenase ao oxigênio.

O cultivo em duas fases experimentais foi eficiente para obtenção de biomassa e produção de hidrogênio, sob limitação de enxofre para as cepas de *Chlamydomonas* spp., proporcionando ambiente anóxico e produção de hidrogênio por hidrogenase, e limitação por nitrogênio para *Anabaena* spp., permitindo a produção por nitrogenase, e também, possivelmente, por hidrogenase devido ao fotobiorreator ter ficado em ambiente microaeróbio.

O gás argônio no *headspace* dos fotobiorreatores foi determinante para produção de hidrogênio com cianobactéria, sendo o nitrogênio molecular limitante para a formação de heterocistos e nitrogenase.

Chlamydomonas e *Anabaena* são dois gêneros potenciais à produção de hidrogênio, porém a pesquisa demonstrou que esta produção é variável entre espécies, cepas, mesmo estas sendo de espécies iguais, e condições de crescimento, podendo ocorrer limitações devido à sensibilidade da hidrogenase ao oxigênio.

Na segunda etapa da pesquisa, a cepa de melhor desempenho de *Chlamydomonas* spp. foi CC425, e as de *Anabaena* spp. 1444 e 1448 foram semelhantes, e não foram detectadas diferenças na produção de hidrogênio entre as radiações 60 e 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Na terceira etapa, a de otimização, a associação de alterações de fatores físico-químicos, pH, radiação e temperatura, proporcionaram melhor rendimento de biomassa na primeira fase experimental, e consequentemente, melhor produção de hidrogênio por CC425 e 1448.

Na otimização da produção de hidrogênio de *C. reinhardtii* (CC425) a adição de 50 μM de enxofre associada à radiação 200 $\mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$,

não foi eficiente, pois não ocorreu melhoramento no ponto compensatório de oxigênio. A melhor produção de hidrogênio ocorreu sob privação de enxofre e com igual radiação, sendo esta superior à produção da segunda etapa, comprovando o efeito positivo da temperatura mais elevada associada ao pH mais baixo. Além disso, melhores resultados foram obtidos com a transferência da biomassa para a segunda fase experimental com a cultura na fase exponencial de crescimento.

De acordo com a otimização da produção de hidrogênio de *Anabaena* sp. (1448) verificou-se o efeito da adição de glicose, aumentando a eficiência de produção de hidrogênio quando em maior concentração, comparando-se as concentrações de 1,05 e 2,1 g.L⁻¹. Além disso, a associação de temperatura e pH mais elevados e radiação mais baixa, em relação à segunda etapa, contribuíram com a otimização.

Não foi possível confirmar efeito positivo na produção de hidrogênio da adição de cloreto de amônio (0,5 mM) e diferença entre as fases de crescimento das culturas transferidas para os fotobiorreatores. Porém, uma associação da produção deste gás com tratamento de águas residuárias com esta cepa pode ter resultados mais eficazes com a utilização da cultura na fase estacionária, por remover maior percentual de nutrientes.

A produção de metabólitos secundários, como o etanol, por todas as cepas dos dois gêneros, com maiores produções pela clorofícea, confirma a ocorrência de fermentação nos fotobiorreatores.

Todas as cepas demonstraram potencial de remoção de nitrogênio, fósforo e carbono durante as duas fases de cultivo, sendo que as duas melhores produtoras de hidrogênio apresentaram melhor desempenho para remoção de fósforo. Estes dados indicam que, além de produzirem hidrogênio, podem ser utilizadas para tratamento de águas residuárias.

Diante de todos os resultados comprovou-se que as cepas de *Anabaena* spp. 1444 e 1448 foram significativamente melhores produtoras de hidrogênio comparadas à todas as cepas de *Chlamydomonas* spp., e eficiência metodológica dessas cepas de cianobactéria em cultivo em duas

fases, com limitação de nitrogênio na primeira e privação na segunda, com argônio no *headspace*, e adição de glicose.

Portanto, diante das informações geradas, espera-se que possam auxiliar no aperfeiçoamento de futuras pesquisas, principalmente com cianobactérias, que apresentaram melhor desempenho. Além disso, que agregue conhecimento ao desenvolvimento de tecnologias da engenharia genética e associação com o tratamento de águas residuárias, para o aperfeiçoamento da produção de biohidrogênio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADORNO M.A.T; HIRAWASA J.S; VARESCHE M.B.A. Development and Validation of Two Methods to Quantify Volatile Acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (Automatic and Manual) and Liquid-Liquid Extraction (LLE). *American Journal of Analytical Chemistry*, v.5, p. 406-414, 2014.

ALLAHVERDIYEVA, Y. et al. Screening for biohydrogen production by cyanobacteria isolated from the Baltic Sea and Finnish lakes. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 1117-1127, 2010.

ANDERSEN, R. A. *Algal Culturing Techniques*. San Diego – USA: Elsevier Academic Press, 2005. 589 p.

ANDERSEN, R.A.; KAWACHI, M. Traditional microalgae isolation techniques. In: ANDERSEN, R. A. *Algal Culturing Techniques*. San Diego – USA: Elsevier Academic Press, 2005. p. 83–100.

ANDRADE, A.C.R.M. A produção de hidrogênio por *Chlamydomonas reinhardtii*. As algas verdes como fonte de energia. *Complementos de Ecologia*. Pós-graduação em ecologia aplicada, 2005.

ANTAL, T.K.; KRENDELEVA, T.E.; TYYSTJÄRVI, E. Multiple regulatory mechanisms in the chloroplast of green algae: relation to hydrogen production. *Photosynthesis Research*, review, 2015.

ANTAL, T.K.; LINDBLAD, P. Production of H₂ by sulphur-deprived cells of the unicellular cyanobacteria *Gloeocapsa alpicola* and *Synechocystis* sp. PCC 6803 during dark incubation with methane or at various extracellular pH. *Journal of Applied Microbiology*, v. 98, p. 114-120, 2005.

APHA – American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22 ed. Washington, DC: *American Public Health Association*, 2005.

BALLESTER, DG, JURADO-OLLER, JL, FERNANDEZ, E. Relevance of nutrient media composition for hydrogen production in *Chlamydomonas*. *Photosynthesis Research*, review, 2015.

BANDYOPADHYAY, A.; STÖCKEL, J.; MIN, H.; SHERMAN, L.A.; PAKRASI, H.B. High rates of photobiological H₂ production by a cyanobacterium under aerobic conditions. *Nature communications*, p.1-7, 2010.

BARBOSA, A.T.P. *Produção de biohidrogênio pela cianobactéria Anabaena sp. PCC 7120 e mutantes: efeito do ciclo de luz(dia/noite) e da intensidade luminosa*. 77 f. Dissertação (Mestrado em Energia e Bioenergia). Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 2009.

BENEMANN, J.R. Hydrogen biotechnology: progress and prospects. *Nature Biotechnology*, v. 14, p. 1101-1103, 1996.

BENEMANN, J.R. Feasibility analysis of photobiological hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 22, p. 979-988, 1997.

BENEMANN, J.R. Hydrogen production by microalgae. *Journal of Applied Phycology*, v. 12, p. 291-300, 2000.

BERCHTOLD, M.; BACHOFEN, R. Hydrogen formation by cyanobacteria cultures selected for nitrogen fixation. *Archives of Microbiology*, n. 123, p. 227-232, 1979.

BICUDO, C.E.M.; MENEZES, M. 2006. *Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil: chave para identificação e descrições*. 2ª ed. Ed. Rima, 2006. 489p.

BERBEROGLU H; JAY J; PILON L. Effect of nutrient media on photobiological hydrogen production by *Anabaena variabilis* ATCC 29413. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 1172-1184, 2008.

BLOCK, D.L; MELODY, I. Efficiency and cost goals for photoenhanced hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 17, p. 853-861, 1992.

BOTHE, H.; SCHMITZ, O.; YATES, M.G.; NEWTON, W.E. Nitrogen fixation and hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 74, n. 4, p. 529-551, 2010.

CAMPBELL, M.K.; FARRELL, S.O. Fotossíntese. In _____. *Bioquímica.v.3 – Bioquímica metabólica*. 5ª ed. Ed. Thomson, 2008. p. 717-741.

CHANDRA, R., MOHAN, S.V. Microalgal community and their growth conditions influence biohydrogen production during integration of dark-fermentation and photo-fermentation processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 12211-12219, 2011.

CHEN M.; LI J.; ZHANG L.; CHANG S.; LIU C.; WAG J.; LI S. Auto-flotation of heterocyst enables the efficient production of renewable energy in cyanobacteria. *Scientific Reports*, v. 4, p. 1–9, 2014.

CATALANOTTI C.; YANG W.; POSEWITZ M.C.; GROSSMAN A.R. Fermentation metabolism and its evolution in algae. *Frontiers in Plant Science*, v.4:150, p. 1-17, 2013.

DAS, D.; VEZIROGLU, T.N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 26, p. 13-28, 2001.

DAS, D.; VEZIROGLU, T.N. Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 33, p. 6046-6057, 2008.

DASGUPTA, C.N. et al. Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 10218-10238, 2010.

DEMIRBAS, A. Use of Algae as biofuel sources. *Energy Conversion and Management*. v. 51, p. 2738 – 2749, 2010.

DUBINI, A.; GHIRARDI, M.L. Engineering photosynthetic organisms for the production os hydrogen. *Photosynthesis Research*, v. 123, p. 241–253, 2015.

DUTTA, D.; DE, D.; CHAUDHURI, S.; BHATTACHARYA, S.K. Hydrogen production by cyanobacteria. *Microbial Cell Factories*, v.4, n.36, p.1-11, 2005.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

EADY, R.R. Structure-function relationships of alternative nitrogenases. *Chemical Reviews*, n. 96, p. 3013-3030, 1996.

FERNANDES, B.S. *Produção de hidrogênio em reator anaeróbio de leito fixo*. 115 f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

FERREIRA, A.F.; MARQUES, A.C.; BATISTA, A.P.; MARQUES, P.A.S.S.; GOUVEIA, L.; SILVA, C.M. Biological hydrogen production by *Anabaena* sp. – yield, energy and CO₂ analysis including fermentative biomass recovery. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 179-190, 2012.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY; G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. p. 497-509, 1956.

FORESTIER, M.; KING, P.; ZHANG, L.; POSEWITZ, M.; SCHWARZER, S.; HAPPE, T.; GHIRARDI, M.L.; SEIBERT, M. Expression of two [Fe]-hydrogenases in *Chlamydomonas reinhardtii* under anaerobic conditions. *European Journal of Biochemistry*, v. 270, p. 2750–2758, 2003.

FOUCHARD, S. et al. Autotrophic and Mixotrophic hydrogen photoproduction in sulfur-deprived *Chlamydomonas* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 10, p. 6199-6205, 2005.

GAFFRON, H.; RUBIN, J. Fermentative and photochemical production of hydrogen by algae. *The Journal of General Physiology*, v.26, p.219-240, 1992.

GHIRARDI, M.L. Implementation of photobiological H₂ production: the O₂ sensitivity of hydrogenases. *Photosynthesis Research*, v. 125, p. 383–393, 2015.

GHIRARDI, M.L.; AMOS, W. Renewable hydrogen from green algae. *Bio Cycle Energy*. v. 45, n. 5, p. 59-62, 2004.

GHIRARDI, M.L.; ZHANG, L.; LEE, J.W. Microalgae: a green source of renewable H₂, *TIBTECH*, v. 18, p. 506-511, 2000.

GORHAM, P.R.; McLACHLAN, J.; HAMMER, U.T. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *Verhandlungen des Internationalen Verein Limnologie*, v.15, p. 796-804, 1964.

GORMAN, D. S.; LEVINE, R. P. *Proceedings of the National Academy Sciences*. USA, v.54, p. 1665-1669, 1965.

GODAUX, D. et al. A novel screening method for hydrogenase-deficient mutants in *Chlamydomonas reinhardtii* based on in vivo chlorophyll fluorescence and photosystem II quantum yield. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 38, p. 1826-1836, 2013.

GRIFFITHS, M.J.; GARCIN, C.; VAN HILLE, R.P.; HARRISON, S.T.L. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods*, v. 85, p. 119-123, 2011.

GUTTHANN, F.; EGERT, M.; MARQUES, A.; APPEL, J. Inhibition of respiration and nitrate assimilation enhances photohydrogen evolution under low oxygen concentrations in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1767, p.161-169, 2007.

HALLENBECK, P.C.; BENEMANN, J.R. Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 27, p. 1185-1193, 2002.

HEMSCHMEIER, A.; HAPPE, T. Alternative photosynthetic electron transport pathways during anaerobiosis in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1807, p. 919–926, 2011.

HOSHAW, R.W.; ROSOWSKI, J.R. Isolation and purification – Methods for microscopic algae. In: STEIN, J.R. *Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements*. Cambridge: Cambridge University, 1973. p. 53-67.

HOUCHINS, J.P. The physiology and biochemistry of hydrogen metabolism in cyanobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 768, p. 227-255, 1984.

JEFFRIES, T.W.; TIMOURIAN, H.; WARD, R.L. Hydrogen production by *Anabaena cylindrica*: effects of varying ammonium and ferric ions, pH, and light. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 35, n. 4, p. 704-710, 1978.

JO, J.H.; LEE, D.S.; PARK, J.M. Modeling and optimization of photosynthetic hydrogen gas production by green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in sulfur-deprived circumstance. *Biotechnology Progress*, v.22, p.431-437, 2006.

JORQUERA, O.; SALES, E.A.; GHIRARDI, M.; KIPERSTOK, A.; EMBIRUÇU, M. Modelagem matemática das rotas metabólicas de produção de hidrogênio por microalgas. In: *Brasil H₂ fuel cell Expo/Seminar*, 2007, Recife, p. 1-7..

JURADO-OLLER, J.L.; DUBINI, A.; GALVÁN, A.; FERNÁNDEZ, E.; BALLESTER, D.G. Low oxygen levels contribute to improve photohydrogen production in mixotrophic non-stressed *Chlamydomonas* cultures. *Biotechnology for Biofuels*, v. 8, p. 1-14, 2015.

KAUSHIK, A.; ANJANA, K. Biohydrogen production by *Lyngbya perelegans*: influence of physic-chemical environment. *Biomass and bioenergy*. v. 35, p. 1041-1045, 2011.

KIM, J.P.; KANG, C.D.; PARK, T.H.; KIM, M.S.; SIM, S.J. Enhanced hydrogen production by controlling light intensity in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.31, p.1585-1590, 2006.

KOSOUROV, S.; PATRUSHEVA, E.; GHIRARDI, M.L.; SEIBERT, M.; TSYGANKOV, A. A comparison of hydrogen photoproduction by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under different growth conditions. *Journal of Biotechnology*, v.128, p. 776-787, 2007.

KOSOUROV, S.; SEIBERT, M.; GHIRARDI, M.L. Effects of extracellular pH on the metabolic pathways in sulfur-deprived, H₂- producing *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. *Plant and Cell physiology*., v.44, n.2, p.146-155, 2003.

KOSOUROV, S.; TSYGANKOV, A.; SEIBERT, M.; GHIRARDI, M.L. Sustained hydrogen photoproduction by *Chlamydomonas reinhardtii*: effects of culture parameters. *Biotechnology and Bioengineering*, v.78, n.7, p. 731-740, 2002.

KOSOUROV, S. et al. Hydrogen photoproduction by immobilized N₂ fixing cyanobacteria: understanding the role of the uptake hydrogenase in the long term process. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 80, n. 18, p. 5807-5817, 2014.

LAMBERT, G.R.; DADAY, A.; SMITH, G.D. Hydrogen evolution from immobilized cultures of the cyanobacterium *Anabaena cylindrica* B629. *Febs Letters*, v.101, n. 1, p. 125-128, 1979.

LAURINAVICHENE, T.V.; FEDOROV, A.; GHIRARDI, M.; SEIBERT, M.; TSYGANKOV, A. Demonstration of sustained hydrogen photoproduction by immobilized, sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells, *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 31, n.5, p. 659-667, 2006.

LINDBLAD, P.; CHRISTENSSON, K.; LINDBERG, P.; FEDOROV, A.; PINTO, F.; TSYGANKOV, A. Photoproduction of H₂ by wildtype *Anabaena* PCC7120 and a hydrogen uptake deficient mutant: from laboratory experiments to outdoor culture. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 27, p. 1271-1281, 2002.

LINDBLEG, P.; SCHÜTZ, K.; HAPPE, T.; LINDBLAD, P. A hydrogen-producing, hydrogenase-free mutant strain of *Nostoc punctiforme* ATCC 29133. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 27, p. 1291-1296, 2002.

LIU, J.; BUKATIN, V.E.; TSYGANKOV, A.A. Light energy conversion into H₂ by *Anabaena variabilis* mutant PK84 dense cultures exposed to nitrogen limitations. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 31, p. 1591-1596, 2006.

LIU, T.; LI, X.; ZHOU, Z. Improvement of hydrogen yield by hupR gene knock-out and nifA gene overexpression in *Rhodobacter sphaeroides* 6016. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 35, p. 9603–9610, 2010.

LOURENÇO et al. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. *European Journal of Phycology*, v. 39, p. 17-32, 2007.

MACINTYRE, H. L.; CULLEN, F. F. Using cultures to investigate the physiological ecology of microalgae. In *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press, USA, 2004. p. 287 – 326.

MARKOV, S.A.; EIVAZOVA, E.R.; GREENWOOD, J. Photostimulation of H₂ production in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* upon photoinhibition of its O₂ – evolving system. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.31, p. 1314-1317, 2006.

MARKOV, S.A.; PROTASOV, E.S.; BYBIN, V.A.; EIVAZOVA, E.R.; STOM, D.I. Using immobilized cyanobacteria and culture medium contaminated with ammonium for H₂ production in a hollow-fiber photobioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.40, p. 4752-4757, 2015.

MARQUES, A.E.; BARBOSA, A.T.; JOTTA, J.; COELHO, M.C.; TAMAGNINI, P.; GOUVEIA, L. Biohydrogen production by *Anabaena* sp. PCC 7120 wild-type and mutants under different conditions: light, nickel, propane, carbon dioxide and nitrogen. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, p. 4426-4434, 2011.

MASUKAWA, H.; NAKAMURA, K.; MOCHIMARU, M.; SAKURAI, H. *Photobiological hydrogen production and nitrogenase activity in some heterocystous cyanobacteria*. p.63-66, 2001.

MELIS, A. Photosynthetic H₂ metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* (unicellular green algae). *Planta*, v. 226, p. 1075-1086, 2007.

MELIS, A.; HAPPE, T. Hydrogen production. Green Algae as a source of energy. *Plant Physiology*. v. 127, p. 740-748, 2001.

MELIS, A.; ZHANG, L.; FORESTIER, M.; GHIRARDI, M.L.; SEIBERT, M. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, v. 122, p. 127-135, 2000.

MCKINLAY, J.B.; HARWOOD, C.S. Photobiological production of hydrogen gas as a biofuel. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 21, p. 244-251, 2010.

MCNEELY, K.; KUMARASWAMY, K.; GUERRA, T.; BENNETTE, N.; ANANYEV, G.; DISMUKES, G.C. Metabolic switching of central carbon metabolism in response to nitrate: application to autofermentative hydrogen production in cyanobacteria. *Journal of Biotechnology*, v. 182, p. 83-91, 2014.

McTAVISH, H.; SAYAVEDRA-SOTO, L.A.; ARP, D.J. Substitution of *Azotobacter vinelandii* hydrogenase small subunit cysteines by serines can create insensitivity to inhibition by O₂ and preferentially damages H₂ oxidation over H₂ evolution. *Journal of Bacteriology*, v. 177, p. 3960–3964., 1995.

MEUSER J.E.; ANANYEV, G.; WITTIG, L.E.; KOSOUROV, S.; GHIRARDI, M.L.; SEIBERT, M.; DISMUKES, G.C.; POSEWITZ, M.C. Phenotypic diversity of hydrogen production in chlorophycean algae reflects distinct anaerobic metabolisms. *Journal of Biotechnology* 142, p.21-130, 2009.

MEUSER, J.E.; D'ADAMO, S.; JINKERSON, R.E.; MUS, F.; YANG, W.; GHIRARDI, M.L.; SEIBERT, M.; GROSSMAN, A.R.; POSEWITZ, M.C. Genetic disruption of both *Chlamydomonas reinhardtii* [FeFe]-hydrogenases:

insight into the role of HYDA2 in H₂ production. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 417, p. 704–709, 2012.

NEDERLANDSE NORM. *Norm 6520*: water spectrophotometric determination of chlorophyll a content. Delft: NEN. 1981.

NEILSON, A.; RIPPKA, R.; KUNISAWA, R. Heterocyst formation and nitrogenase synthesis in *Anabaena* sp. *Archives of Microbiology*, v. 76, p. 139-150, 1971.

NUSCH, E.A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment. *Arch. Hydrobiology. Bech. Stuttgart*, v.14, p. 14-36, 1980.

OLGUÍN, E.J. Dual purpose microalgae–bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery. *Biotechnology Advances*, v. 30, p.1031–1046, 2012.

ONCEL, S.; VARDAR-SUKAN, F. Photo-bioproduction of hydrogen by *Chlamydomonas reinhardtii* using a semi-continuous process regime. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.34, p. 7592-7602, 2009.

PEIXOTO, G. *Sistema fermentativo de duas fases para a produção de hidrogênio e metano a partir de esgoto sanitário combinado com águas residuárias industriais*. 214 f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos. 2011.

PHILIPPS, G.; HAPPE, T.; HEMSCH MEIER, A. Nitrogen deprivation results in photosynthetic hydrogen production in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta*, v. 235, p. 729-745, 2012.

PINTO, T.M.S. *Engenharia metabólica de Chlamydomonas reinhardtii e otimização ambiental da produção de hidrogênio*. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional). Instituto Superior de Agronomia – Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 2011.

POSEWITZ, M.C.; KING, P.W.; SMOLINKSI, S.L.; SMITH, R.D.; GINLEY, A.R.; GHIRARDI, M.L.; SEIBERT, M. Identification of genes required for hydrogenase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemical Society Transactions*, v. 33, p. 102–104, 2005.

RAI, A.K.; ABRAHAM, G. Relationship of combined nitrogen sources to salt tolerance in freshwater cyanobacterium *Anabena doliolum*. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 78, p. 501–506, 1995.

RAZEGHIFARD, R. Algal biofuels. *Photosynthesis Research*. v. 117, p. 207 – 219, 2013.

RIGANO, V.M.; VONA, V.; ESPOSITO, S.; CARILLO, P.; CARFAGNA, S.; RIGANO, C. The physiological significance of light and dark NH_4^+ metabolism in *Chlorella sorokiniana*. *Phytochemistry*, v. 47, n. 2, p. 177-181, 1998.

RIPPKA, R. Isolation and purification of Cyanobacteria. In: L. Pacher & A.N. Glazer (eds.). *Cyanobacteria Methods in Enzymology*. Blackwell, v. 167, p. 3-27, 1979

RIVIERS, B. Divisão Cyanophyta. *Biologia e Filogenia das Algas*. Artmed Editora S. A., Porto Alegre, RS, 2008. p. 21–33.

ROSENBAUM, M.; SCHRÖDER, U. Photomicrobial solar and fuel cells. *Electroanalysis*, v.22, n.7-8, p.844-855, 2010.

RÜHLE, T.; HEMSCHMEIER, A.; MELIS, A.; HAPPE, T. A novel screening protocol for the isolation of hydrogen producing *Chlamydomonas reinhardtii* strains. *BMC Plant Biology*, v. 8, p.1-13, 2008.

SLADE, R.; BAUEN, A. Micro-algae cultivation for biofuels: Cost, energy balance, environmental impacts and future prospects. *Biomass and Bioenergy*. v. 53, p. 29 – 38, 2013.

SALEEM, M. et al. Hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii* in a two-stage process with and without illumination at alkaline pH. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.37, p. 4930-4934, 2012.

SANT'ANNA, C.L.; AZEVEDO, M.T.P.; AGUJARO, L.F. CARVALHO, M.C.; CARVALHO, L.R.; SOUZA, R.C.R. *Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras*. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, 2006. 53 p.

SANTOS, P.V. *Seleção de cepas oleaginosas da microalga Chlorella spp. e otimização do seu cultivo em meio sintético e vinhaça visando à produção sustentável de biodiesel*. 139 f. Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento). Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos. 2013.

SCHÜTZ, K. et al. Cyanobacterial H_2 production – a comparative analysis. *Pflanze*, v. 218, p. 350-359, 2004.

SCOMA, A.; BERTIN, L.; PINTUCCI, C.; RADDI, S.; FAVA, F. Inhibition of photosystem 2 in starch-enriched *Chlamydomonas reinhardtii* cells prevents the efficient induction of H_2 production in sulfur-depleted cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 37, p. 10604-10610, 2012.

SMITH, G.D.; EWART, G.D.; TUCKER, W. Hydrogen production by cyanobacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 17, n. 9, p. 695-698, 1992.

STEBEGG, R. *Heterotrophic growth of the cyanobacterium Anabaena (Nostoc) sp. strain PCC7120 and its dependence on a functional cox1 locus encoding cytochrome c oxidase*. 130 f. Dissertação (Mestrado em Genética - Microbiologia). Universität Wien, Wien. 2011.

STEIN, J.R. *Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements*. Cambridge: Cambridge University, 1973. 472 p.

STEVENSON, R. J. An introduction to algal ecology in freshwater benthic habitats. In *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems*. Elsevier, USA. p. 3 – 30, 1996.

STEWART, W.D.P.; PEARSON, H.W. Effects of aerobic and anaerobic conditions on growth and metabolism of blue-green algae. *Proceedings the Royal Society of London*, v. 175, p.293-311, 1970.

SVESHNIKOV, D.A.; SVESHNIKOVA, N.V.; RAO, K.K.; HALL, D.O. Hydrogen metabolism of mutant forms of *Anabaena variabilis* in continuous cultures and under nutritional stress. *FEMS Microbiology Letters*, v. 147, p. 297-301, 1997.

TAMAGNINI, P.; COSTA, J.L.; ALMEIDA, L.; OLIVEIRA, M.J.; SALEMA, R.; LINDBLAD, P. Diversity os cyanobacterial hydrogenases, a molecular approach. *Current Microbiology*, n. 40, p. 356-361, 2000.

TAMAGNINI, P.; LEITÃO, E.; OLIVEIRA, P. Biohidrogênio: produção de H₂ utilizando cianobactérias. *Boletim de Biotecnologia: Energias renováveis e limpas de origem biológica*, n. 75, p. 3-6, 2003.

TAMAGNINI, P.; AXELSSON, R.; LINDBERG, P.; OXELFELT, F.; WÜNSCHERS, R.; LINDBLAD, P. Hydrogenases and hydrogen metabolismo of cyanobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, n. 66, n.1, p. 1-20, 2002.

TAMBURIC, B.; ZEMICHAEL, F.W.; MAITLAND, G.C.; HELLGARDT, K. Parameters affecting the growth and hydrogen production of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 36, p. 7872-7876, 2011.

TIMMINS M., et al. The metabolome of *Chlamydomonas reinhardtii* following induction of anaerobic H₂ production by sulfur depletion. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 284, p. 23415–23425, 2009.

TIWARI, A.; PANDEY, A. Cyanobacterial hydrogen production – A step towards clean environment. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.37, p.139-150, 2012.

TOLSTYGINA, I.V.; ANTAL, T.K.; KOSOUROV, S.N.; KRENDELEVA, T.E.; RUBIN, A.B.; TSYGANKOV, A.A. Hydrogen production by photoautotrophic sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* pre-grown and incubated under high light. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 102, n. 4, p. 1055-1061, 2009.

TROSHINA, O.Y.; SEREBRYAKOVA, L.T.; LINDBLAD, P. Induction of H₂-uptake and nitrogenase activities in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413: Effects of hydrogen and organic substrate. *Current Microbiology*, v. 33, p. 11-15, 1996.

TSYGANKOV, A.A.; KOSOUROV, S.N.; TOLSTYGINA, I.V.; GHIRARDI, M.L.; SEIBERT, M. Hydrogen production by sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* under photoautotrophic conditions. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.31, p.1574-1584, 2006.

TSYGANKOV, A.A.; SEREBRYAKOVA, L.T.; SVESHNIKOV, D.A.; RAO, K.K.; GOGOTOV, I.N.; HALL, D.O. Hydrogen photoproduction by three different nitrogenases in whole cells of *Anabaena variabilis* and the dependence on pH. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 22, n. 9, p. 859-867, 1997.

VIEIRA, A.A.H. Purification of phytoplankton cultures with dakin's solution. *Revista de Microbiologia*, v. 14, n. 3, p. 202-203, 1983.

VIGNAIS, P.M.; BILLOUD, B. Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chemical Reviews*, v. 107, p. 4206–4272, 2007.

VYAS, D.; KUMAR, H.D. Nitrogen fixation and hydrogen uptake in four cyanobacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.20, n. 2, p.163-168, 1995.

WEARE, N.M.; BENEMANN, J.R. Nitrogenase activity and photosynthesis by *Plectonema boryanum* 594. *Journal of Bacteriology*, v. 119, p. 158-168, 1974.

WEBER, J. et al. Biotechnological hydrogen production by photosynthesis. *Engineering in Life Sciences*, v. 14, p. 592-606, 2014.

WEISSMAN, J.C.; BENEMANN, J.R. Hydrogen production by nitrogen-starved cultures of *Anabaena cylindrica*. *Applied and Environmental microbiology*, v. 33, n. 1, p. 123-131, 1977.

WETZEL, R.G. *Limnologia*. Lisboa: Editora Fundação Calouste Gulbenkian, 1993. 919 p.

XU, L.; WANG, Q.; WU, S.; LI, D. Improvement of hydrogen yield of lba-transgenic *Chlamydomonas reinhardtii* caused by increasing respiration and impairing photosynthesis. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.39, p.13347-13352, 2014.

YANG, W.; CATALANOTTI, C.; WITTKOPP, T.M.; POSEWITZ, M.C.; GROSSMAN, A.R. Algae after dark: mechanisms to cope with anoxic/hypoxic conditions. *The Plant Journal*, v. 82, n. 3, p. 481–503, 2015.

YANG, W.; GUARNIERI, M.T.; SMOLINSKI, S.; GHIRARDI, M.; PIENKOS, P.T. De novo transcriptomic analysis of hydrogen production in the green alga *Chlamydomonas moewusii* through RNA-Seq. *Biotechnology for Biofuels*, v. 6, p. 118, 2013.

YEAGER, C.M.; MILLIKEN, C.E.; BAGWELL, C.E.; STAPLES, L.; BERSETH, P.A.; SESSIONS, H.T. Evaluation of experimental conditions that influence hydrogen production among heterocystous cyanobacteria. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.36, p. 7487-7499, 2011.

ZHANG, L.; HAPPE, T.; MELIS, A. Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H₂-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). *Planta*, v. 214, p. 552–561, 2002.

ZWIETERING, M. H.; JONGENBURGER, I.; ROMBOUTS, F. M.; VAN'T RIET, K. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 56, p. 1875-1881, 1990.

ANEXOS

Anexo 1 – Curva de calibração de hidrogênio

Micromols	Área cromatográfica
0,005060871	1769,16
0,010121741	5429,3
0,020243483	11530,27
0,030365224	17499,73333
0,040486965	22370,82333
0,050608706	30880,75667
0,060730448	36051,04667
0,08097393	46347,31333
0,101217413	60343,82
0,10107	58341,4
0,30322	231015,13
1,87436	983332,7
3,74872	1680995
5,05364	2243740,35
6,06437	2730294,88

Anexo 2 – Curva de calibração de gás carbônico e nitrogênio

a) Micromols e áreas cromatográficas

Número de micromols	Área cromatográfica N ₂	Área cromatográfica CO ₂
3,754355703	237523,00	265264,54
4,692944628	294443,98	327371,42
5,631533554	310701,88	347632,02
6,57012248	352484,40	392656,44
7,508711405	376888,82	423397,80

b) Equações das retas de calibração

Nitrogênio: $y = 35.880,68x + 112.345,18$ ($R^2 = 0,97$)

Gás Carbônico: $y = 40.651,61x + 122.333,52$ ($R^2 = 0,98$)