UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Utilização do dióxido de carbono proveniente de fermentação alcoólica no cultivo de *Spirulina (Arthrospira) platensis* utilizando simultaneamente nitrato de sódio e sulfato de amônio como fontes de nitrogênio

Lívia Seno Ferreira

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientadores:

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho
Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Tecnologia de Fermentações

Prof. Dr. Attilio Converti
Università degli Studi di Genova
Facoltà di Ingegneria Chimica dei Materiali e di
Processo

São Paulo
2011

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

F383u Ferreira, Livia Seno
Utilização do dióxido de carbono proveniente de fermentação
alcoólica no cultivo de *Spirulina (Arthrospira) platensis*
utilizando simultaneamente nitrato de sódio e sulfato de amônio
como fontes de nitrogênio / Livia Seno Ferreira. -- São
Paulo, 2011.
144p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia
Bioquímico-Farmacêutica.

Orientador: Carvalho, João Carlos Monteiro de
Orientador: Converti, Attilio

1. Bioquímica industrial 2. Biotecnologia 3. Microbiologia
industrial I. T. II. Carvalho, João Carlos Monteiro de, orientador.
III. Converti, Attilio, orientador

660.63 CDD

Lívia Seno Ferreira

Utilização do dióxido de carbono proveniente de fermentação alcoólica no cultivo de *Spirulina (Arthrospira) platensis* utilizando simultaneamente nitrato de sódio e sulfato de amônio como fontes de nitrogênio

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, de de 2012.

Dedico este trabalho aos meus pais, Midori Seno Ferreira (in memorian) e José Ayres Ferreira, que são responsáveis pelo incentivo e preocupação com a minha educação e formação.

E ao meu marido Victor Mendes de Camargo pelo amor, apoio e incentivo em todos estes anos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais queridos, Midori Seno Ferreira (*in memorian*) e José Ayres Ferreira, por tudo o que fizeram por mim, pelo amor, carinho, por serem meus maiores exemplos de vida.

Ao meu marido Victor, por ser o meu amigo, pelo companheirismo, preocupação, paciência, amor que é recíproco.

À minha irmã Letícia, pelo carinho, incentivo, crescimento e aprendizado;

Ao Professor Doutor João Carlos Monteiro de Carvalho pela confiança, estímulo, conselhos, por estar sempre disposto a ajudar e pela valiosa orientação;

Ao Professor Titular Sunao Sato, pela recepção, amizade, incentivo e ensinamentos;

Ao Professor Doutor Attilio Conventi pela recepção, confiança e orientação durante o período que estive na Itália.

À Professora Doutora Patrizia Perego pela recepção, preocupação e disposição em ajudar durante o período que estive na Itália.

Aos professores do curso da pós-graduação em Tecnologia Bioquímico Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP por fazerem parte da minha formação;

Aos Doutores Patrick Jack Spencer e Marcelo Chuei Matsudo pelos comentários, correções e sugestões.

Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Tecnologia Bioquímico - Farmacêutica Miriam, Juarez e Elza, e aos funcionários da Secretaria de pós-graduação, Elaine e Jorge, pela dedicação e por estarem sempre prontos a ajudar;

Aos funcionários da secretaria e técnicos da Faculdade de Engenharia Química da Universidade de Gênova que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pela bolsa de estudos concedida;

À empresa Mid Comunicação Visual e seus colaboradores pela elaboração das figuras dos fotobiorreatores.

Aos amigos do departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Raquel, Marcelo, Cínthia, Valéria, Dani, Ana

Paula, Ana, Lina, Ivan, Marcello Bresaola, Mayla, Camila, Guilherme, Cesar, João seja pelas conversas, apoio, aprendizado, discussões, companheirismo de trabalho, de viagens, risadas ou comemorações.

Aos amigos de Gênova-Itália, do laboratório: Erika, Bahar e Afxim, Eugenia, Mohamed, Alberto, Patrícia, Piffa; da república: Martina, Katia, Michela, Michelangelo, Jaime e Marco, e do coral: Michela e Federica. Todos contribuíram muito para a minha adaptação à cidade, agradeço seja pela amizade, companheirismo, preocupação, incentivo e por terem feito parte desta valiosa experiência de vida;

À família do Victor, que agora é minha também, pela qual tenho muita consideração, pelo apoio e companhia desde que cheguei em São Paulo.

À minha família: avós, tios, primos, agregados. Todos muito queridos, que sempre me deram um exemplo de união, pelos conselhos, amizades, estórias, viagens e muito aprendizado.

À todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

*O sonho alimenta a esperança, a fé a alma e a vontade de ir além faz vencer os
desafios
(Victor Mendes de Camargo)*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	14
RESUMO EM PORTUGUÊS.....	16
RESUMO EM ITALIANO.....	17
RESUMO EM INGLÊS.....	18
INTRODUÇÃO.....	19
OBJETIVOS.....	22
 CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	 23
I.1 Microalgas e cianobactérias: produção de biomassa.....	23
I.2 <i>A. platensis</i> : morfologia e taxonomia.....	25
I.2.1 Composição química.....	27
I.2.2 Condições de cultivo.....	28
I.2.2.1 Fonte de carbono.....	28
I.2.2.2 Fonte de nitrogênio.....	29
I.2.2.3 Luz.....	30
I.2.3 Fotobiorreatores.....	31
I.2.4 Processo de cultivo descontínuo alimentado.....	32
I.2.5 Sistemas de circulação e agitação de células.....	33
I.2.6 Fermentação alcoólica e Biofixação de dióxido de carbono.....	34
I.2.7 Microalgas e cianobactérias: remoção de metais pesados.....	37
 CAPÍTULO II – PARÂMETROS CINÉTICOS E DE CRESCIMENTO DE <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i> CULTIVADA EM FOTOBIORREATOR TUBULAR UTILIZANDO DIFERENTES SISTEMAS DE CIRCULAÇÃO DE CÉLULAS	 41
II.1 Resumo.....	41
II.2 Introdução.....	42
II.3 Materiais e Métodos.....	43
II.4 Resultados e Discussão.....	49

II.5 Conclusões.....	58
CAPÍTULO III – CULTIVO DE <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i> EM FOTOBIOREATOR TUBULAR: USO DE CO₂ DE CUSTO ZERO PROVENIENTE DE FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA	59
III.1 Resumo.....	59
III.2 Introdução.....	60
III.3 Materiais e Métodos.....	62
III.4 Resultados e Discussão.....	71
III.5 Conclusões.....	80
CAPÍTULO IV – ADSORÇÃO DE Ni²⁺, Zn²⁺ E Pb²⁺ EM BIOMASSAS SECAS DE <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i> E <i>Chlorella vulgaris</i>. I. SISTEMAS COM UM ÚNICO METAL	82
IV.1 Resumo.....	82
IV.2 Introdução.....	83
IV.3 Materiais e Métodos.....	85
IV.4 Resultados e Discussão.....	89
IV.4 Conclusões.....	105
CONCLUSÕES FINAIS.....	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108
ANEXO A – Artigo publicado apresentado no capítulo II deste trabalho.....	123
ANEXO B – Artigo no prelo apresentado no capítulo III deste trabalho.....	130
ANEXO C – Artigo publicado apresentado no capítulo IV deste trabalho.....	137

LISTA DE FIGURAS

		Página
Capítulo I	Revisão Bibliográfica	
Figura I.1	Esquema da produção de biomassa de algas	25
Figura I.2	Foto de <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i> (UTEX 1926)	26
Figura I.3	Ciclo de vida da <i>Spirulina</i>	26
Capítulo II	PARÂMETROS CINÉTICOS E DE CRESCIMENTO DE <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i> CULTIVADA EM FOTOBIORREATOR TUBULAR UTILIZANDO DIFERENTES SISTEMAS DE CIRCULAÇÃO DE CÉLULAS	
Figura II.1	Esquema do fotobiorreator e dos três sistemas de circulação de células. (1): Frasco degaseificador; (2): Bomba de ar; (3): Rotâmetro; (4): Lâmpadas fluorescentes de 20W; (5): Tubos de vidro; (6): Mangueira externa de silicone; (7): Motobomba; (8): Sensores de nível; (9): Conexão da bomba de ar; (10): Conexão da válvula solenóide. [A] = Sistema <i>Airlift</i> , [B] = Sistema Motobomba; [C1] = Sistema pressurizado (Frasco de vidro superior); [C2] = Sistema pressurizado (Frasco de vidro inferior).	45
Figura II.2	Valores médios de concentração celular (e barras de desvio padrão) em relação ao tempo para todos os cultivos. A = 60 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$: ensaios 1-2 ($\circ$, Sistema pressurizado), 3-4 ($\blacktriangle$, Sistema <i>airlift</i>), 5-6 ($\square$, Sistema motobomba); B = 120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$: ensaios 7-8 ($\circ$, Sistema pressurizado), 9-10 ($\blacktriangle$, Sistema <i>airlift</i>), 11-12 ($\square$, Sistema motobomba); C = 240 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$: ensaios 13-14 ($\circ$, Sistema pressurizado), 15-16 ($\blacktriangle$, Sistema <i>airlift</i>), 17-18 ($\square$, Sistema motobomba).	52
Capítulo III	CULTIVO DE <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i> EM FOTOBIORREATOR TUBULAR: USO DE CO₂ CUSTO ZERO PROVENIENTE DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	
Figura III.1	Esquema do fotobiorreator. (1): Frasco degaseificador; (2): Motobomba; (3): Lâmpadas fluorescentes de 20W; (4): Tubos de vidro; (5): mangueira externa de silicone.	64
Figura III.2	Concentrações celular (A), de etanol e de açúcares redutores totais (B) em função do tempo com desvio padrão para as nove fermentações alcoólicas realizadas neste trabalho.	73

Figura III.3	Concentração celular máxima (X_m) e pH em função do tempo (dias) para os cultivos realizados com uso de somente NaNO_3 como fonte de nitrogênio, e CO_2 proveniente de fermentação alcoólica (ensaio E: símbolos quadrados e barras cinzas) e CO_2 puro proveniente de cilindro (ensaio C: símbolos quadrados e barras vazios).	75
Figura III.4	Concentrações de nitrato (g L^{-1}) = $\bigcirc$ e amônia (mM) = $\bullet$ em função do tempo (dias), do ensaio 2 realizado com aplicação do protocolo II de alimentação de nitrogênio = 50 % NaNO_3 e 50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.	79
Capítulo IV	ADSORÇÃO DE Ni^{2+}, Zn^{2+} E Pb^{2+} PELAS BIOMASSAS SECAS DE <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i> E <i>Chlorella vulgaris</i>. I. SISTEMAS COM UM ÚNICO METAL	
Figura IV.1	Cinética e isotermas da adsorção de Zn^{2+} em diferentes concentrações iniciais de metal por <i>A. platensis</i> and <i>C. vulgaris</i> , respectivamente: modelo cinético de Ho e McKay (A e B), modelo da isoterma de Langmuir (C e D), e de Freundlich (E e F).	94
Figura IV.2	Capacidade de adsorção no equilíbrio (q_e) em função da concentração inicial de metal (C_0) para os testes realizados com Pb^{2+} ($\blacksquare$ e $\square$), Zn^{2+} ($\bullet$ e $\circ$), e Ni^{2+} ($\blacktriangle$ e $\triangle$), para <i>A. platensis</i> e <i>C. vulgaris</i> , respectivamente. Condições: Temperatura = 20 °C; pH 5,0-5,5; 2 g L^{-1} de biomassa.	97
Figura IV.3	Espectro da biomassa de <i>C. vulgaris</i> tanto antes (a) como após a adsorção de Ni^{2+} (b), Zn^{2+} (c), Pb^{2+} (d), obtido pela análise espectroscópica de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).	101
Figura IV.4	Espectro da biomassa de <i>A. platensis</i> tanto antes (a) como após a adsorção de Ni^{2+} (b), Zn^{2+} (c), Pb^{2+} (d), obtido pela análise espectroscópica de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).	104

LISTA DE TABELAS

		Página
Capítulo II	PARÂMETROS CINÉTICOS E DE CRESCIMENTO DE <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i> CULTIVADA EM FOTOBIORREATOR TUBULAR UTILIZANDO DIFERENTES SISTEMAS DE CIRCULAÇÃO DE CÉLULAS	
Tabela II.1 -	Resultados de cinética, crescimento e composição celular (concentração celular máxima, X_m ; produtividade em células, P_x ; fator de conversão de nitrogênio em células, $Y_{X/N}$; eficiência fotossintética, PE; conteúdo de lipídio, LIP; conteúdo de proteína, PTN) do cultivo de <i>A. platensis</i> em fotobiorreator tubular em função da intensidade luminosa e sistema de circulação de células (sistema <i>airlift</i> , AS; sistema motobomba, MDPS; sistema pressurizado, PS).	49
Tabela II.2 -	Valores médios dos parâmetros cinéticos e de crescimento e de composição celular (concentração celular máxima, X_m ; produtividade em células, P_x ; fator de conversão de nitrogênio em células, $Y_{X/N}$; eficiência fotossintética, PE; conteúdo de lipídio, LIP; conteúdo de proteína, PTN) obtidos por ANOVA para os cultivos de <i>A. platensis</i> em fotobiorreator tubular utilizando três diferentes sistemas de circulação de células (sistema <i>airlift</i> , AS; sistema motobomba, MDPS; sistema pressurizado, PS).	54
Tabela II.3 -	Valores médios dos parâmetros cinéticos e de crescimento e de composição celular (concentração celular máxima, X_m ; produtividade em células, P_x ; fator de conversão de nitrogênio em células, $Y_{X/N}$; eficiência fotossintética, PE; conteúdo de lipídio, LIP; conteúdo de proteína, PTN) obtidos por ANOVA para os cultivos de <i>A. platensis</i> em fotobiorreator tubular utilizando três intensidades luminosas (60, 120 e 240 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$).	55
Capítulo III	CULTIVO DE <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i> EM FOTOBIORREATOR TUBULAR: USO DE CO₂ CUSTO ZERO PROVENIENTE DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	
Tabela III.1 -	Ensaio e resultados de X_m (concentração celular máxima), P_x (produtividade em células), $Y_{X/N}$ (fator de conversão de nitrogênio em células), conteúdos de lipídio (LIP) e proteína (PTN) para o cultivo de <i>Arthrospira platensis</i> em fotobiorreator tubular.	66
Tabela III.2 -	Adição diária de sulfato de amônio e nitrato de sódio simultaneamente de acordo com os seguintes protocolos de alimentação de nitrogênio: protocolo I = 25 % NaNO ₃ e 75 %	68

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; protocolo II = 50 % NaNO_3 e 50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; protocolo III = 75 % NaNO_3 e 25 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, expressos em nitrogênio.

Tabela III.3 -	Influência da adição de CO_2 proveniente de cilindro ou de fermentação alcoólica sobre os valores médios das respostas: X_m (concentração celular máxima), P_x (produtividade em células), $Y_{X/N}$ (fator de conversão de nitrogênio em células), conteúdos de lipídio e proteína, e os respectivos valores de p obtidos dos cultivos de <i>A. platensis</i> .	76
Tabela III.4 -	Influência dos três protocolos de adição de nitrogênio: protocolo I = 25 % NaNO_3 e 75 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; protocolo II = 50 % NaNO_3 e 50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; protocolo III = 75 % NaNO_3 e 25 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sobre os valores médios das respostas: X_m (concentração celular máxima), P_x (produtividade em células), $Y_{X/N}$ (fator de conversão de nitrogênio em células), conteúdos de lipídio e proteína e os respectivos valores de p obtidos dos cultivos de <i>A. platensis</i> .	77
Capítulo IV	ADSORÇÃO DE Ni^{2+}, Zn^{2+} E Pb^{2+} PELAS BIOMASSAS SECAS DE <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i> E <i>Chlorella vulgaris</i>. I. SISTEMAS COM UM ÚNICO METAL	
Tabela IV.1 -	Os parâmetros cinéticos de Ho e McKay obtidos a partir dos ajustes lineares dos dados experimentais da adsorção de Ni^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} pelas biomassas secas de <i>A. platensis</i> e <i>C. vulgaris</i> .	93
Tabela IV.2 -	Capacidade das biomassas secas de <i>A. platensis</i> e <i>C. vulgaris</i> como adsorventes em termos de capacidade de adsorção no equilíbrio (q_e) ou eficiência de remoção do metal (Y_R).	95
Tabela IV.3 -	Parâmetros e constantes de isotermas calculados no equilíbrio pelos modelos de Langmuir e Freundlich para remoção de Ni^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} utilizando biomassas secas de <i>A. platensis</i> e <i>C. vulgaris</i> como adsorventes.	98
Material Suplementar 1 -	Valores de pK_a e pK_b em diferentes concentrações de NaCl , e valores de pI estimados para as biomassas secas de <i>A. platensis</i> e <i>C. vulgaris</i> .	91
Material Suplementar 2 -	Resultados da adsorção de Ni^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} pelas biomassas secas de <i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i> e <i>Chlorella vulgaris</i> em diferentes valores de pH.	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

X_m	Concentração celular máxima (mg L^{-1})
X_i	Concentração celular inicial (mg L^{-1})
X	Concentração celular (mg L^{-1})
P_X	Produtividade em células ($\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)
V	Volume do fotobiorreator (L)
T_c	Tempo de cultivo (dias)
$Y_{X/N}$	Fator de conversão de nitrogênio em células (mg mg^{-1})
N_t	Quantidade de nitrogênio total adicionada (g)
EF	Eficiência fotossintética
r_G	Crescimento celular máximo diário
H_G	Entalpia da biomassa seca
IPAR	Radiação fotossinteticamente ativa (inglês: input of photosynthetically active radiation)
AS	Sistema <i>Airlift</i> (inglês: <i>Airlift System</i>)
MDPS	Sistema motobomba (inglês: <i>Motor Driven Pumping System</i>)
PS	Sistema pressurizado (inglês: <i>Pressurized System</i>)
N_N	Nitrogênio proveniente de nitrato de sódio
N_S	Nitrogênio proveniente de sulfato de amônio
ART	Açúcares redutores totais
pI	ponto isoelétrico
q_e	Capacidade de adsorção no equilíbrio (mmol g^{-1})
C_0	Concentração inicial de metal (mM)
C_e	Concentração de metal no equilíbrio (mM)

v	Volume da solução (L)
m	Massa seca (g)
Y_R	Eficiência de remoção do metal
q_t	Capacidade de adsorção num dado tempo (mmol g^{-1})
k_1	Constante de velocidade de primeira ordem (min^{-1})
t	Tempo de adsorção (minutos)
q_c	Valor teórico da capacidade de adsorção (mmol g^{-1})
k_2	Constante de velocidade de segunda ordem ($\text{g mmol}^{-1} \text{min}^{-1}$)
K_L	Constante de Langmuir (L mmol^{-1})
q_m	Capacidade de adsorção teórica máxima (mmol g^{-1})
K_F	Constante de Freundlich ($\text{mmol}^{1-1/n} \text{L}^{1/n} \text{g}^{-1}$)
n	Intensidade de adsorção (adimensional)
FT-IR	Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (em inglês: <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
CVO	Compostos voláteis orgânicos

RESUMO

FERREIRA, L.S. Utilização do dióxido de carbono proveniente de fermentação alcoólica no cultivo de *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* utilizando simultaneamente nitrato de sódio e sulfato de amônio como fontes de nitrogênio. 2011. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Arthrospira (*Spirulina*) *platensis*, cianobactéria fotoautotrófica, é importante comercialmente devido ao seu valor nutricional (elevado teor de proteínas, lipídios, vitaminas e minerais), além da presença do ácido graxo γ -linolênico e pigmentos, os quais agregam valor a esta biomassa. Este micro-organismo foi cultivado em fotobiorreator tubular, e os seguintes parâmetros foram avaliados: aplicação de diferentes sistemas de circulação de células, intensidades luminosas, adição simultânea de diferentes proporções de sulfato de amônio e nitrato de sódio como fontes de nitrogênio, adição de dióxido de carbono proveniente de fermentação alcoólica e, finalmente, a aplicação desta biomassa para remoção de metais pesados. Para a avaliação do sistema de circulação de células e da intensidade luminosa foram utilizadas as variáveis dependentes: concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_x), fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$), eficiência fotossintética (EF) e teores de proteínas e lipídios da biomassa. Os protocolos de alimentação de nitrogênio e o uso de CO_2 proveniente de cilindro ou de fermentação alcoólica foram avaliados com uso das mesmas variáveis já citadas, exceto EF; e, para remoção de Ni^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} em solução aquosa foram estudados o tempo de adsorção e a influência da concentração inicial de metal em solução; com posterior cálculo da eficiência e capacidade de adsorção, e apresentação de modelos cinéticos e isotermas de equilíbrio. A melhor combinação de resultados em valores médios ($X_m = 4055 \text{ mg L}^{-1}$, $P_x = 406 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $Y_{X/N} = 5,07 \text{ mg mg}^{-1}$, lipídios totais = 8,94%, proteínas totais = 30,3%, EF = 2,04%) foi obtida nos cultivos realizados com intensidade luminosa = $120 \mu \text{ mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. O tipo de sistema de circulação de células utilizado não influenciou estatisticamente quase nenhuma das respostas estudadas e isto indica a possibilidade de substituição do sistema tradicional *airlift* pelos outros testados neste trabalho. A mistura da menor quantidade de nitrato em relação à de amônio (protocolo I) resultou na melhor combinação de resultados das variáveis dependentes analisadas ($X_m = 4,543 \text{ g L}^{-1}$; $P_x = 0,460 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$; $Y_{X/N} = 15,6 \text{ g g}^{-1}$; lipídios totais = 8,39% e proteínas totais = 18,7%). O tipo da fonte de CO_2 não exerceu nenhuma influência estatística no crescimento de *A. platensis*, o que indica a possibilidade do uso do resíduo (CO_2) proveniente de fermentação alcoólica nos cultivos desta cianobactéria. A adsorção dos metais pela biomassa seca de *A. platensis* reduziu à medida que houve aumento da concentração inicial de metal, e a maior eficiência de adsorção foi para o metal Pb^{2+} (78%). *Chlorella* quando comparada à *Arthrospira* foi considerada melhor adsorvente, devido ao maior valor de eficiência de remoção (86,5%). O modelo, cinético de Ho e Mckay e os modelos de equilíbrio de Langmuir e Freundlich se adequaram bem ao processo de adsorção desta célula.

Palavras-chave: *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. Intensidade luminosa. Fotobiorreator tubular. Sistemas de circulação de células. Metais pesados. Processo de Adsorção

RIASSUNTO

FERREIRA, L.S. **Utilizzo di anidride carbonica proveniente dalla fermentazione alcolica nella coltura di *Spirulina (Arthrospira) platensis* utilizzando simultaneamente nitrato di sodio e solfato di ammonio come fonti di azoto in fotobioreattore tubolare.** 2011. Tesi (Dottorato) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Arthrospira (Spirulina) platensis, cianobatterio fotoautotrofico, è importante commercialmente per via del suo valore nutritivo: alto contenuto di proteine, acidi grassi polinsaturi, pigmenti, minerali, vitamine, e aminoacidi, che aggiungono valore a questa biomassa. Questo microrganismo è stato coltivato in fotobioreattore tubolare ed sono stati valutati i seguenti parametri: impiego di diversi sistemi di circolazione della biomassa e livelli di intensità luminosa, aggiunta simultanea di solfato di ammonio e nitrato di sodio come fonti di azoto in diverse proporzioni, aggiunta di anidride carbonica proveniente da fermentazione alcolica e, infine, applicazione di questa biomassa per la rimozione di metalli pesanti. Per la valutazione del sistema di circolazione delle cellule e dell'intensità luminosa sono state usate come variabili dipendenti la concentrazione cellulare massima (X_m), la produttività cellulare (P_x), il fattore di conversione dell'azoto in biomassa ($Y_{X/N}$), l'efficienza fotosintetica (EF) e il contenuto in lipidi e proteine della biomassa. I protocolli utilizzati per la fornitura di azoto e l'utilizzo di CO_2 da bombola o da fermentazione alcolica sono stati valutati utilizzando le stesse variabili già menzionate, tranne EF; mentre, per la rimozione di Ni^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} in soluzione acquosa sono stati studiati gli effetti del tempo di adsorbimento e della concentrazione iniziale di metallo in soluzione sull'efficienza e sulla capacità di adsorbimento, e sono stati presentati i relativi modelli cinetici e isoterme di equilibrio. La migliore combinazione dei valori medi ($X_m = 4055 \text{ mg L}^{-1}$, $P_x = 406 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $Y_{X/N} = 5,07 \text{ mg mg}^{-1}$, lipidi totali = 8,94%, proteine totali = 30,3%, EF = 2,04%) è stata ottenuta per le colture realizzate con l'intensità luminosa di $120 \mu \text{ mol fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Pressoché nessuna delle variabili di risposta studiate è stata influenzata statisticamente dal tipo di sistema di circolazione della biomassa, il che suggerisce la possibilità di sostituire il sistema tradizionale *airlift* con gli altri testati in questo lavoro. La miscela di fonti d'azoto corrispondente alla minor quantità di nitrato rispetto a quella d'ammonio (Protocollo I) ha garantito la miglior combinazione di risultati delle variabili dipendenti analizzate, ossia $X_m = 4,543 \text{ g L}^{-1}$, $P_x = 0,460 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $Y_{X/N} = 15,6 \text{ g g}^{-1}$, lipidi totali = 8,39% e proteine totali = 18,7 %. La crescita di *A. platensis* non è stata influenzata statisticamente dal tipo di fonte di CO_2 , e questo risultato indica la possibilità di impiegare come fonte di carbonio la CO_2 di risulta dalla fermentazione alcolica in colture di questo cianobatterio. Con entrambi i tipi di biomassa secca, un aumento della concentrazione iniziale del metallo ha comportato una diminuzione dell'efficienza dell'adsorbimento, la quale è risultata massima nel caso del Pb^{2+} (78 %). *Chlorella* si è comportata come un bioadsorbente migliore rispetto ad *Arthrospira*, avendo garantito un maggior valore di efficienza di rimozione (86,5 %). Il modello cinetico di Ho e McKay ed i modelli di equilibrio di Langmuir e Freundlich si sono rivelati adeguati a descrivere il processo di adsorbimento dei metalli studiati con entrambi i tipi di biomassa.

Parole chiave: *Arthrospira (Spirulina) platensis*. Intensità luminosa. Fotobioreattore tubolare. Sistema di circolazione della biomassa. Metalli pesanti. Processo di adsorbimento.

ABSTRACT

FERREIRA, L.S. **Use of carbon dioxide from ethanol fermentation in *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* cultivation using, simultaneously, ammonium sulfate and sodium nitrate as nitrogen sources.** 2011. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Arthrospira (*Spirulina*) *platensis*, photoautotrophic cyanobacterium, is commercially important due its high nutritional value (high content of proteins, lipids, vitamins, and minerals), besides of the presence of γ -linolenic fatty acids and pigments, which add value to this biomass. This microorganism was cultivated in tubular photobioreactor and the following parameters were evaluated: application of different cell circulation systems, light intensities, different protocols of simultaneous ammonium sulfate and sodium nitrate feeding, addition of CO₂ from ethanol fermentation and, finally, the application of this biomass to the heavy metal removal. The dependent variables [maximum cell concentration (X_m), cell productivity (P_x), nitrogen-to-cell conversion factor ($Y_{X/N}$), photosynthetic efficiency (EF) and proteins and lipids contents] were used to evaluate the influence of cell circulation systems and the light intensities. The nitrogen feeding protocols and the use of CO₂ from cylinder or ethanol fermentation were evaluated using the same parameters aforementioned, except EF; and to analyze Ni²⁺, Zn²⁺ and Pb²⁺ removal, the adsorption time and the influence of initial metal concentration were evaluated with subsequent calculation of the efficiency and capacity adsorption. The kinetic models and equilibrium isotherms were also presented. The best combination of responses' mean values ($X_m = 4055 \text{ mg L}^{-1}$, $P_x = 406 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $Y_{X/N} = 5.07 \text{ mg mg}^{-1}$, total lipids = 8.94%, total proteins = 30.3%, EF = 2.04%) was obtained at light intensity = $120 \mu \text{ mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. The cell circulation system did not exert statistical significant influence on almost all the responses, which suggests that the traditional airlift system could successfully be substituted by the others tested in this work. The mixture of the lower amount of nitrate in relation to ammonium (protocol I) ($X_m = 4,543 \text{ g L}^{-1}$; $P_x = 0,460 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$; $Y_{X/N} = 15,6 \text{ g g}^{-1}$; total lipids = 8,39% and total proteins = 18,7 %) resulted in the best combination of responses' mean values. The kind of CO₂ source did not exerted any statistical influence on *A. platensis* growth, which suggests the possibility of using the ethanol fermentation residue (CO₂) in the cyanobacterium cultivation. The metal adsorption by *A. platensis* biomass reduced with increasing initial metal concentration and the adsorption efficiency was higher for metal Pb²⁺ (78%). *Chlorella* was considered a better biosorbent when compared to *Arthrospira* because of the higher values of removal efficiency (86.5%). The kinetic (Ho and McKay) and equilibrium (Langmuir and Freundlich) models are well suited to the adsorption process of this cell.

Keywords: *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. Light intensity. Tubular photobioreactor. Cell circulation systems. Heavy metals. Adsorption process.

INTRODUÇÃO

O cultivo de micro-organismos fotossintetizantes é uma das modernas biotecnologias que tem sido desenvolvida para diferentes aplicações comerciais. Estes micro-organismos são mais comumente utilizados como suplemento alimentar para consumo humano e/ou animal devido ao elevado teor de proteínas, vitaminas e polissacarídeos (COHEN, 1997; SPOLAORE *et al.*, 2006). Além disso, por se tratar de seres fotossintéticos, apresentam clorofila que pode ser utilizada em alimentos e cosméticos (SANCHEZ *et al.*, 2003; SPOLAORE *et al.*, 2006); outra interessante aplicação é o uso destes micro-organismos para produção de lipídios que podem ser convertidos em biocombustíveis (CHISTI, 2007).

Os micro-organismos fotossintetizantes fazem parte de uma ampla gama de organismos autótrofos que obtêm energia através da fotossíntese assim como as plantas. Dentre eles estão as cianobactérias, estruturas procariontes e unicelulares que convertem com facilidade a energia solar em energia química (HARUN *et al.*, 2010). Uma grande quantidade de estudos tem sido feita para explorar as técnicas, procedimentos e processos de produção destes micro-organismos a fim de que aumente a produção em larga escala. Uma das técnicas seria a escolha do tipo de fotobiorreator, que pode ser aberto ou fechado. Sabe-se já, que os sistemas abertos, apesar de serem os mais utilizados industrialmente, são menos favoráveis devido à baixa eficiência na conversão de CO₂ devido a maior perda do gás por evaporação; iluminação ineficiente; dificuldade em controlar a contaminação por predadores/competidores e os parâmetros de cultivo: temperatura, CO₂ dissolvido, pH e dos nutrientes para crescimento (TORZILLO, 1997). No entanto, os fotobiorreatores fechados têm elevado custo inicial para construção e algumas dificuldades relacionadas à manutenção de temperatura e circulação de células de cultivos realizados em larga escala; devido a estes motivos é necessário dar continuidade aos estudos utilizando este tipo de fotobiorreator.

Dois importantes nutrientes utilizados no cultivo de micro-organismos fotossintetizantes são: nitrogênio e carbono. O primeiro é tradicionalmente utilizado na forma de sais de nitrato, como nitrato de sódio (SCHLÖSSER, 1982; BISCHOFF e BOLD, 1963) e nitrato de potássio (PAOLETTI; PUSHPARAJ; TOMASELLI, 1975); entretanto, a fim de reduzir os custos de produção existem pesquisas que

comprovam a possibilidade do uso de fontes de nitrogênio amoniacais através da aplicação de sistemas de cultivo *fed-batch* ou contínuo para evitar a toxicidade, e ainda o uso de fotobiorreatores fechados a fim de evitar a volatilidade, ou seja, para um melhor aproveitamento do nutriente (BEZERRA *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2010; MATSUDO *et al.*, 2011). Outra forma de adição desta fonte seria a utilização simultânea de nitrato e amônia que resultam em biomassa com maior qualidade e custo menor que a adição de somente nitrato (RODRIGUES *et al.*, 2010).

O segundo nutriente está presente no meio de cultivo padrão de *A. platensis* (SCHLOSSER, 1982), na forma de sais de carbonato e bicarbonato, os quais são responsáveis pela obtenção de meio de cultivo com pH ideal (9,5) (SÁNCHEZ-LUNA *et al.*, 2007) para o seu crescimento, além de serem fonte de carbono. Pesquisas mostram a grande importância da adição de CO₂ para a manutenção do pH numa faixa ideal em cultivos realizados em fotobiorreator fechado, o qual permite a obtenção de elevadas concentrações celulares, com conseqüente aumento do pH. Os cultivos de *Chlorella vulgaris* são geralmente realizados utilizando meio de cultivo com adição de CO₂, já que esta é uma das formas predominantes em pH ideal (aproximadamente 7,0) para o crescimento desta microalga (FENG; LI; ZHANG, 2011).

O uso de dióxido de carbono em cultivos de micro-organismos fotossintetizantes é de grande interesse por ser uma das alternativas para a mitigação dos gases causadores do efeito estufa. Diversos artigos da literatura relatam o uso de CO₂ proveniente de cilindro (BINAGHI *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2010; SOLETTI *et al.*, 2008), entretanto, o uso daquele liberado por indústrias (MATSUDO *et al.*, 2011) é ainda mais interessante devido a melhor simulação da realidade, além de ter custo zero. No Brasil, as usinas de produção de etanol são grandes emissoras de dióxido de carbono, pois produzem anualmente cerca de 27,5 bilhões de litros de etanol e conseqüentemente cerca de 19,8 bilhões de quilos de CO₂ (ÚNICA – União da Agroindústria Canavieira de São Paulo) e, por este motivo, destinos alternativos devem ser estudados a fim de evitar desastres ambientais.

As microalgas e cianobactérias são utilizadas para diversas aplicações e uma delas é a remoção de metais pesados de soluções aquosas, pois ambas apresentam em suas paredes celulares: polissacarídeos e carboidratos carregados negativamente aos quais se ligam a maioria dos metais.

Enfim, é importante ter o conhecimento de diversas tecnologias de cultivos com a finalidade de aumento da produção e redução de custos, e aplicações sempre envolvendo algum tipo de tecnologia para proteção do meio ambiente.

Este trabalho foi realizado em etapas que são apresentadas em diferentes capítulos. O primeiro capítulo contém uma revisão bibliográfica geral; o segundo capítulo apresenta os cultivos de *Arthrospira platensis* realizados para a avaliação da influência de diferentes sistemas de circulação de células e intensidades luminosas; no terceiro capítulo, após a escolha de um dos sistemas de circulação de células e da melhor intensidade luminosa, a cianobactéria foi exposta à avaliação de diferentes protocolos de alimentação simultânea de sulfato de amônio e nitrato de sódio como fontes de nitrogênio, e a influência da adição de dióxido de carbono proveniente de fermentação alcoólica em cultivos de *A. platensis*, da mesma forma, realizados em fotobiorreator tubular; finalmente, no quarto capítulo, para a complementação do trabalho, é apresentada uma aplicação da biomassa seca de *A. platensis* e *Chlorella vulgaris*, as quais foram utilizadas para verificar a capacidade de adsorção de três diferentes metais pesados.

OBJETIVOS

Verificar a influência de três diferentes sistemas de circulação de células (motobomba, pressurizado e *airlift*) e diferentes intensidades luminosas (60, 120 e 240 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), em cultivos de *A. platensis* realizados em fotobiorreator tubular, em relação às respostas: concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_x), fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{x/N}$), eficiência fotossintética (EF) e teores de lipídios e proteínas.

Avaliar a influência de três diferentes protocolos de adição simultânea de sulfato de amônio e nitrato de sódio [protocolo I: 25 % NaNO_3 e 75 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; protocolo II: 50 % NaNO_3 e 50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; protocolo III: 75 % NaNO_3 e 25 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] e a possibilidade de uso de dióxido de carbono proveniente de fermentação alcoólica, quando comparado ao dióxido de carbono proveniente de cilindro. Para estes dois parâmetros foram avaliadas as seguintes respostas: concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_x), fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{x/N}$) e teores de lipídios e proteínas.

Verificar a capacidade de adsorção dos metais Ni^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} por biomassas secas de *A. platensis* e *C. vulgaris*.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

I.1 *Microalgas e cianobactérias: produção de biomassa*

As microalgas são encontradas por todo o mundo e vivem principalmente, em meios líquidos. Elas se apresentam em diferentes formas de organização celular: unicelular, colonial ou filamentosa. E ainda podem ser classificadas em células eucarióticas (microalgas que possuem membrana nuclear, a qual contém a maior parte do genoma distribuído entre os cromossomos e nucléolo) ou procarióticas (cianobactérias que possuem DNA desorganizado o qual fica livre no citoplasma com as membranas fotossintéticas, pois não possuem membrana nuclear) (TOMASELLI, 2004).

Relatos da presença e consumo da biomassa da cianobactéria procariota *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* foram feitos por volta de 1950 nos lagos naturais: Chade (África) e o antigo Texcoco (México). Já, a *Chlorella* surgiu com o estudo da ficologia aplicada, quando Beijerinck, em 1890, realizou cultivos desta microalga eucariota; a partir disso, até hoje, dentre as microalgas, a *Chlorella* está em primeiro lugar para uso comercial (TOMASELLI, 2004; UGWU; AOYAGI; UCHIYAMA, 2008).

A produção de *Chlorella* em larga escala para fins comerciais teve início com a Nihon Chlorella Inc., a qual utilizou as instalações do Instituto de Pesquisas de Microalgas do Japão. O Instituto forneceu grandes quantidades de massa seca de *Chlorella* para pesquisas nutricionais e médicas do Instituto Nacional de Nutrição de Tóquio e para os laboratórios de várias Universidades japonesas e hospitais. As tecnologias de cultivo para produção de biomassa seca com boa digestibilidade ajudaram no estabelecimento da indústria de *Chlorella*, a qual representava um novo alimento no Japão em 1964; além de muitas outras indústrias em Taiwan, Malásia e Indonésia. A *Chlorella* tem sido comercializada nos últimos 35 anos e aumentou de 200 toneladas/ano em 1975 para 2.000 toneladas/ano nos anos 90 (BOROWITZKA, 1999).

A empresa Dainippon Ink & Chemicals Inc. (DIC) foi a pioneira na produção comercial de *Arthrospira platensis* em tanques por volta de 1978 em Bangkok, Tailândia. A famosa Earthrise Farms, primeira fazenda de *Spirulina* dos Estados Unidos, foi fundada em 1981, está localizada em Calipatria, na Califórnia e é a maior planta produtora de *Spirulina* no mundo, com uma área total dos tanques de 75.000 m² (BELAY, 1997). E, de acordo com Borowitzka (1999), a produção anual e mundial desta cianobactéria aumentou de aproximadamente 300 toneladas/ano em 1980 para aproximadamente 2.500 toneladas/ano em 1998.

A biotecnologia de produção de microalgas e cianobactérias é a mesma da agricultura, pois em ambos os casos ocorre o uso da maquinaria fotossintética para a produção de biomassa que é utilizada como fonte de alimento humano e animal, e de compostos de alto valor agregado. Entretanto, os micro-organismos fotossintéticos apresentam vantagens quando comparados às plantações: alta eficiência na captura de energia luminosa para a produção de compostos orgânicos através da fotossíntese; ausência de vasos de transporte e órgãos de reprodução, o que torna possível a recuperação completa da biomassa; possibilidade de indução do acúmulo de compostos de alto valor agregado, como proteínas, lipídios, carboidratos e pigmentos; maior velocidade de reprodução e desenvolvimento quando comparado às plantações; e, finalmente, não necessitam de solo para serem cultivados, o que seria vantajoso para países com solos pobres em nutrientes (VONSHAK, 1997a).

O processo de produção de microalgas e cianobactérias envolve o conhecimento da biologia, metabolismo do micro-organismo, parâmetros de operação, e a engenharia do processo que está relacionada com o desenvolvimento de fotobiorreatores, recuperação de células e processos de produção (Figura I.1).

Figura I.1. Esquema da produção de biomassa de algas. (VONSHAK, 1997a). Adaptado pelo autor do presente trabalho.

Os relatos de aumento da produção mundial de microalgas e cianobactérias demonstram a grande importância destes micro-organismos fotossintetizantes, os quais foram e estão sendo cultivados, com uso de cada vez mais novas tecnologias, visando a redução de custos e elevada produção em pequeno espaço físico.

I.2 *A. platensis* – Morfologia e taxonomia

De acordo com a classificação do Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, *A. platensis* pertence à classe Cyanophyceae e ordem Oscillatoriales. É uma cianobactéria filamentosa e multicelular, suas células cilíndricas formam os tricomas helicoidais e seus filamentos apresentam mobilidade por deslizamento (Figura I.2) (CIFERRI, 1983). Esta mobilidade pode ser comprovada pelas hormogônias (forma da *A. platensis* em uma das fases de crescimento, Figura I.3) de cianobactérias que ao serem adicionadas no centro de placas de Agar, migram para a região periférica desta após dois ou três dias (RIPPKA *et al.*, 1979). Os tricomas da *A. platensis* apresentam formato de hélice aberta, comprimento de alguns milímetros dependendo da cepa, e largura na faixa de 5 - 12 µm, embora já existam descritas na natureza formas de tamanho menor (3 µm) (CASTENHOLZ,

1989). O citoplasma de espécies de cepas maiores de *Arthrospira* apresenta vacúolos de gases, grânulos e septos bem visíveis.

Figura I.2. Foto de *Arthrospira platensis* (Aumento: 100 x).

O ciclo de vida da *Arthrospira* envolve a quebra dos tricomas em pedaços que são resultado da lise celular de células especializadas (necrídeos) em intervalos de 4-6 células. Na fase seguinte, uma forma curta e desenrolada é denominada hormogônia e, finalmente, as células de cada hormogônia sofrem divisão celular para a formação de um tricoma espiral (Figura I.3).

Figura I.3. Ciclo de vida da *Spirulina*. (CIFERRI, 1983)

As cianobactérias podem apresentar uma variedade enorme de formas e tamanhos, entretanto 3 formas gerais são mais observadas: esférica, bastão e espiral. *A. platensis* apresenta-se na forma de espiral, entretanto pode ser alterada,

assim como qualquer outra cianobactéria, dependendo das condições ambientais e adaptações eventuais necessárias à sobrevivência, por exemplo, devido à falta de nutrientes, como carbono, fósforo, nitrogênio e ferro, além da qualidade e cor da luz fornecida (SINGH E MONTGOMERY, 2011). Wang e Zhao (2005) realizaram testes com *Spirulina (Arthrospira) platensis* para tentar descobrir a causa da mudança morfológica desta cianobactéria de espiral (forma original) para a forma linear e obtiveram resultados como, possibilidade de reversão morfológica do tricoma através do uso de irradiação ultravioleta. Eles descobriram que a linearização da célula é uma variação de nível genético que pode ser induzido por fatores ambientais. Além disso, a forma linear, quando comparada com a helicoidal, parece ser mais adaptável a situações de estresse, como a deficiência na nutrição (JEEJI BAI, 1985) ou alta intensidade luminosa (WANG *et al.*, 1997).

1.2.1 Composição química

Como em qualquer planta superior, a composição química de micro-organismos fotossintetizantes varia grandemente dependendo dos fatores ambientais aos quais os organismos são submetidos. Variações extremas na composição já foram observadas em resposta a parâmetros tais como, temperatura, luz, valor de pH do meio de cultivo, nutrientes minerais e fornecimento de CO₂ (BECKER, 1994). Portanto, para a obtenção de biomassa com uma composição desejada, a proporção de nutrientes utilizados deve ser modificada variando as condições do cultivo.

O elevado teor de proteínas em diversas espécies de microalgas e cianobactérias foi um dos motivos para considerar estes micro-organismos como fontes alternativas de proteína (BECKER, 1994). *A. platensis* é conhecida por apresentar cerca de 50-70 % de proteínas da sua biomassa seca e conter todos os aminoácidos essenciais para o ser humano (DILLON; PHUN; DUBACQ, 1995). Dentre as proteínas que apresentam maior potencial econômico estão as biliproteínas: c-ficocianina e aloficocianina, pigmentos que podem ser utilizados em indústrias alimentícias e de cosméticos (COHEN, 1997).

Outro pigmento de grande importância desta espécie é a clorofila *a*, a qual aumenta conforme ocorre a diminuição da intensidade luminosa fornecidas às células. Danesi *et al.* (2004) comprovaram este comportamento ao realizar ensaios com *A. platensis* em tanques abertos dos quais obtiveram concentrações de clorofila maiores à medida que a intensidade luminosa foi reduzida de 5klux para 2klux, ou seja, 60-24 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Os lipídios e ácidos graxos são constituintes de todas as células vegetais, como componentes de membrana, reserva de produtos, metabólitos e fontes de energia (BECKER, 1994). *A. platensis*, assim como outras cianobactérias, são geralmente consideradas pobres em lipídios, pois apresentam em seu interior cerca de 6-13 % deste composto orgânico. E dentre os ácidos graxos presentes nesta cianobactéria, o ácido graxo gama linolênico é o considerado mais importante e em maiores quantidades dentro da célula (COHEN, 1997).

1.2.2 Condições de cultivo

1.2.2.1 Fonte de Carbono

O cultivo de *A. platensis* é feito em meios com elevadas concentrações dos sais carbonato e bicarbonato, os quais em proporções adequadas resultam no pH ótimo para o crescimento desta cianobactéria. De acordo com Binagui *et al.* (2003) e as curvas de equilíbrio do sistema químico $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$, o bicarbonato é a forma dominante em água com pH 9,6 e quase ausente em pH 11,3. Isto explica o fato de o pH ótimo de crescimento de *A. platensis* ser por volta de 9,5 e de quase não haver crescimento quando o pH é muito elevado.

A assimilação do carbono é feita, principalmente, pelo transporte ativo de bicarbonato, o qual, dentro da célula, sofre ação da enzima anidrase carbônica e é transformado em dióxido de carbono, o qual é incorporado no ciclo de Calvin (KAPLAN e REINHOLD, 1999). Durante a fixação do dióxido de carbono, na fotossíntese, ocorre um acúmulo de OH^- na solução, o que leva ao aumento do pH. O dióxido de carbono pode ser disperso diretamente no meio de cultivo a fim de reduzir o pH do meio, sendo este o melhor e mais conveniente método para controle do pH, além de ser fonte de carbono (GROBBELAAR, 2004).

O uso de CO₂ como fonte de carbono é uma alternativa que muitos pesquisadores têm utilizado para o cultivo de microalgas e cianobactérias. *S. platensis* foi cultivada em tanques abertos por Binaghi *et al.* (2003), os quais compararam a aplicação do processo descontínuo (uso da mistura dos sais carbonato e bicarbonato como fontes de carbono) e do processo descontínuo alimentado (uso de CO₂ como única fonte de carbono). Os resultados de produtividade em células e crescimento específico foram maiores quando o dióxido de carbono foi utilizado como a única fonte de carbono.

De Moraes e Costa (2007) cultivaram *Spirulina* sp. em fotobiorreator tubular e determinaram a resistência dela à limitação e excesso de dióxido de carbono. Com zero % de dióxido de carbono o pH do cultivo chegou a aproximadamente 11,5 e o cultivo terminou em cinco dias, enquanto que com 12 % de dióxido de carbono o pH chegou a 7,0 em 20 dias. Os melhores resultados de crescimento foram obtidos com a adição de 6 % (v/v) de dióxido de carbono, quando o pH manteve-se elevado (mais próximo do ideal) e controlado na maior parte do tempo de cultivo.

1.2.2.2 Fonte de Nitrogênio

O nitrogênio é o segundo nutriente mais importante depois do carbono, e pode variar de 1% a mais de 10% em micro-organismos fotossintetizantes, dependendo da quantidade fornecida deste nutriente (GROBBELAAR, 2004). Esta afirmação está de acordo com Cornet *et al.* (1992) os quais apresentam a fórmula mínima da biomassa seca de *S. platensis* como CH_{1,650} O_{0,531} N_{0,170} S_{0,007} P_{0,006}, ou seja, conteúdo de nitrogênio igual a 7%.

Este nutriente é tradicionalmente fornecido para *A. platensis* na forma de sais de nitrato, de sódio (SCHLÖSSER, 1982; ZARROUK, 1966) ou de potássio (PAOLETTI; PUSHPARAJ; TOMASELLI, 1975) os quais compõem os meios de cultivo padrões. A assimilação do nitrato ocorre pelo seu transporte ativo para dentro da célula, e para que possa ser metabolizado deve ser reduzido, com gasto de energia, a nitrito pela ação da enzima nitrato redutase, e em seguida a amônia pela ação da enzima nitrito redutase (HATTORI e MYERS, 1966).

Apesar dos nitratos serem tradicionalmente utilizados, o que pode ser comprovado pelos bons resultados de crescimento celular de cultivos realizados com *A. platensis* (DANESI *et al.*, 2004; MASOJÍDEK *et al.*, 2003; SOLETTTO *et al.*, 2008), muitos pesquisadores os substituem por fontes amoniacais, como uréia, cloreto de amônio e sulfato de amônio (BEZERRA *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2010; MATSUDO, *et al.*, 2009). Rodrigues *et al.* (2010) compararam ainda o uso de somente uma fonte ou duas fontes de nitrogênio simultaneamente (amônia+nitrato) em cultivos de *A. platensis* em tanques abertos, e como resultados obtiveram biomassa de melhor qualidade e redução de custos quando duas fontes de nitrogênio foram adicionadas simultaneamente. Esta substituição tem sido feita, principalmente devido aos custos, e também... também pelo metabolismo, pois de acordo com Ohmori M., Ohmori K., Strotmann (1977), quando nitrato e amônia estão presentes no mesmo meio de cultivo existe uma preferência do micro-organismo pela amônia e isto está possivelmente relacionado com o fato da célula não gastar energia para a sua assimilação.

1.2.2.3 Luz

A luz é sem dúvida o parâmetro que mais afeta o cultivo de micro-organismos fotossintetizantes, e estes serão mais ou menos expostos à luz dependendo da eficiência da mistura dentro do fotobiorreator (item 1.2.5 – Sistemas de circulação e agitação de células). Ela pode ser fornecida para os cultivos naturalmente através do uso de energia solar, ou artificialmente através do uso de lâmpadas. A vantagem da energia natural é o custo baixo quando comparado ao uso de lâmpadas, as quais, entretanto, apresentam a vantagem de maior controle de intensidade e melhor distribuição em diferentes pontos do fotobiorreator.

O cultivo de células em tanques abertos leva a um efeito de sombreamento, devido a profundidade destes, o que caracteriza limitação do crescimento pela falta de luz. Este efeito pode ser minimizado pela melhor mistura do meio de cultivo, entretanto é quase inevitável, pois à medida que as células se multiplicam o efeito de sombreamento aumenta e esta falta de luz resulta em baixa taxa de crescimento celular (VONSHAK, 1997a). Um fenômeno oposto a este é a foto-inibição, ou seja, inibição da fotossíntese pelo excesso de luz, o qual pode causar danos reversíveis.

A partir disso, sabe-se que a exposição prolongada das células à luz pode resultar em destruição dos pigmentos fotossintéticos com conseqüente morte celular, e este último fenômeno é denominado foto-oxidação (ALVES; MAGALHÃES; BARJA, 2002). O crescimento de *Spirulina* pode ser saturado dependendo da intensidade luminosa e espécie utilizada, pois, de acordo com Vonshak (1997b) o crescimento de *S. platensis* se torna saturado quando a intensidade luminosa atinge valores na faixa de 150-200 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, entretanto, no cultivo de *S. maxima* estes valores estão na faixa de 300-360 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Deve-se considerar ainda que o efeito da luz sobre o crescimento celular pode ser potencializado pela baixa adição de dióxido de carbono no cultivo, baixas ou altas temperaturas. Torzillo e Vonshak (1994) observaram que a fotoinibição de um cultivo de *S. platensis* foi muito maior quando, simultaneamente, utilizaram temperaturas acima ou abaixo da ótima (condição de estresse) para o crescimento desta cianobactéria.

1.2.3 Fotobiorreatores

Fotobiorreatores são reatores dentro dos quais crescem micro-organismos fotossintetizantes. A produção comercial destes micro-organismos é limitada a poucas espécies e é feita em tanques abertos, os quais representam a forma do meio natural de crescimento das microalgas e cianobactérias e possuem as vantagens de facilidade e menor custo para a construção e operação, e maior durabilidade quando comparados aos fotobiorreatores fechados (TREDICI, 2004). Estes últimos têm sido estudados desde muito tempo e quase não são utilizados comercialmente; entretanto, os pesquisadores persistem devido às suas grandes vantagens: obtenção de elevadas concentrações de biomassas, baixos níveis de contaminação, alta eficiência na conversão do dióxido de carbono devido à baixa perda do gás, maior superfície exposta à luz e possibilidade de cultivo em pequenas áreas quando comparado aos abertos (TORZILLO, 1997).

Dentre os fotobiorreatores fechados muitos pesquisadores mostram a possibilidade do uso de diferentes configurações, como, placas planas (TREDICI e ZITELLI, 1998), tubulares (SOLETTO *et al.*, 2008) ou coluna de bolhas (ONCEL e

SUKAN, 2008), cada tipo com sua vantagem de manipulação, construção, possibilidades de aplicação de diferentes métodos de circulação de células e iluminação.

1.2.4 Processo de cultivo descontínuo alimentado

Primeiramente, sabe-se que no processo descontínuo a adição de substrato ocorre somente uma vez no início do cultivo e este tipo de processo foi sempre mais utilizado devido à facilidade de operação. A aplicação de processo descontínuo alimentado, no qual o substrato é adicionado em determinados intervalos de tempo durante todo processo, ocorreu devido à necessidade de solucionar problemas como: inibição pelo substrato, adição de nutrientes que se tornam tóxicos quando em elevadas concentrações e adequação de condições operacionais em processos fermentativos em geral.

Carvalho *et al.* (2004) cultivaram *A. platensis* em tanques abertos e utilizaram cloreto de amônio como fonte de nitrogênio. Este nutriente em solução alcalina forma amônia, a qual pode ser tóxica em altas concentrações; por este motivo os pesquisadores utilizaram o processo descontínuo alimentado com adição exponencialmente crescente do nutriente, e obtiveram resultados comparáveis aos cultivos, da literatura, realizados com nitrato como fonte de nitrogênio e mesmo tipo de fotobiorreator. Uma das grandes vantagens da aplicação do processo descontínuo alimentado é a redução de custo ao substituir nitratos pelas fontes amoniacas. Estas últimas já foram comprovadas como possíveis alternativas aos nitratos em diversas pesquisas com *A. platensis*, como Soletto *et al.* (2005) que compararam o uso dos processos descontínuo e descontínuo alimentado utilizando uréia ou sulfato de amônio como fontes de nitrogênio, Bezerra *et al.* (2008) que utilizaram cloreto de amônio em cultivos em tanques abertos e Matsudo *et al.* (2011) que utilizaram uréia nos cultivos de *A. platensis* em fotobiorreator tubular.

Como já dito acima, Carvalho *et al.* (2004) empregaram a adição exponencialmente crescente. Entretanto, existem outras possíveis formas de adição como apresentado por Ferreira *et al.* (2010), que utilizaram sulfato de amônio em cultivos realizados em fotobiorreator tubular, e basearam as diferentes formas de adição num crescimento celular prévio com uso de nitrato; desta forma, puderam

prever o consumo de nitrogênio e adicionar a exata quantidade necessária de amônia para crescimento ótimo. É importante salientar ainda que Ferreira *et al.* (2010) realizaram 8 adições diárias, em vez de somente uma como é feito geralmente, o que foi de extrema importância para que em determinados dias a elevada concentração pré-determinada de sulfato de amônio adicionada não intoxicasse as células.

1.2.5 Sistemas de circulação e agitação de células

Se as condições ambientais forem favoráveis e o fornecimento de nutrientes for suficiente, a agitação do meio de cultivo torna-se um dos requisitos mais importantes para elevada produção de biomassa algal. Grande parte das técnicas utilizadas para mistura é ineficiente, pois a turbulência do líquido nestes casos é aleatória, o que significa que nem todas as células receberiam luz de uma forma homogênea. A agitação está relacionada com a homogeneização da microalga no meio de cultivo, de forma que as células recebam luz suficiente como fonte de energia e nutrientes para garantir o crescimento autotrófico, melhor utilização do dióxido de carbono e prevenção de estratificação térmica dentro do fotobiorreator (BECKER, 1994).

A velocidade da mistura, ou seja, a vazão do meio de cultivo, necessária para garantir um crescimento celular ótimo depende da taxa de sedimentação específica para cada célula. Sabe-se que uma vazão de 10 cm s^{-1} é geralmente suficiente para evitar a deposição de células, entretanto, uma velocidade média de 20 cm s^{-1} é utilizada devido a inevitável variação de velocidade, principalmente em tanques horizontais. Na prática a velocidade na faixa de $10 - 30 \text{ cm s}^{-1}$ é utilizada para operar a maioria dos tanques de cultivo abertos, os quais, ainda assim, apresentam o problema de sedimentação de células como um dos maiores a ser resolvido. Deve-se considerar que o uso de velocidade maior que a necessária pode aumentar o custo geral de produção (BECKER, 1994).

Em fotobiorreatores fechados é possível utilizar velocidade de fluxo bem menor devido à facilidade de controle para homogeneização. Na verdade, sabe-se que o uso de elevadas velocidades de fluxo causam o efeito de cisalhamento das

células. De acordo com Torzillo (1997), as culturas podem ser circuladas dentro do fotobiorreator com velocidade máxima de $0,3 \text{ m s}^{-1}$ sem que haja danos graves às células, e que velocidade igual a $0,8 \text{ m s}^{-1}$ foi capaz de reduzir a produtividade em até 16 %.

Equipamentos ou modos utilizados para a circulação de células também influenciam o cultivo, pois bombas como as centrífugas ou as bombas de ar (*airlift*) podem resultar em graves danos às células algais. Existem modos de circulação de células já estudados que podem servir como idéias para testes com diferentes tipos celulares e condições:

- pás rotativas que funcionam com o uso de um motor elétrico. É muito utilizado em projetos de pesquisas para cultivo de algas em fotobiorreatores abertos (BEZERRA, *et al.*, 2008; MATSUDO *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2010);

- combinação de bombas e fluxo por gravidade, em fotobiorreatores abertos ou fechados;

- sistema *airlift* (SIEGEL e ROBINSON, 1992);

- manualmente, quando não é necessária a mistura contínua.

Enfim, várias técnicas podem ser utilizadas para criar a turbulência necessária no cultivo de células. A escolha dependerá de cada situação, como, localização da planta, tipo e configuração de fotobiorreator, disponibilidade de energia, considerações econômicas e até a espécie de microalga ou cianobactéria utilizada.

1.2.6 Fermentação alcoólica e Biofixação de Dióxido de Carbono

No Brasil, o etanol combustível começou a ser utilizado por volta de 1900, entretanto somente nos anos 70 sua produção em larga escala foi incentivada, com a criação do projeto Pró-Álcool. O uso de combustíveis renováveis a fim de substituir os combustíveis a base de petróleo para transporte em geral é uma alternativa que

foi utilizada para minimizar as emissões de gases causadores de efeito estufa. O etanol é um combustível renovável produzido através da fermentação de grãos como, milho e trigo, mas também de açúcares da beterraba e da cana de açúcar. Esta última é predominantemente utilizada para a produção de etanol no Brasil, o qual é responsável por um dos programas de energia renovável de maior destaque no mundo (XU; ISOM; HANNA, 2010).

O incentivo à produção de etanol foi um fomento à produção de cana, a qual teve, no país, uma área maior destinada ao seu cultivo. O resultado disso, atualmente é que o Brasil é responsável por 25 % da produção mundial de cana de açúcar sendo utilizada, principalmente, para a produção de açúcar e etanol. É importante salientar que além da produção do etanol, a cana pode ser um importante gerador de energia para o país, já que o Brasil conta com 434 usinas sucroalcooleiras, todas elas autosuficientes em energia graças à produção de vapor por meio da queima de bagaço de cana em caldeiras. Apesar disso, somente 20 % das usinas (88 unidades) comercializam os seus excedentes de energia elétrica, sendo 54 centrais de cogeração exportando energia elétrica para a rede dentro do estado de São Paulo (61% do total) e 34 centrais em outros 11 estados brasileiros (JANK, 2009).

A produção do etanol no Brasil, por outro lado, representa 55 % da produção mundial. Esta produção é feita pelo processo fermentativo utilizando caldo de cana, melaço ou a mistura dos dois, purificados ou não, na presença da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (MACEDO e CORTEZ, 2005). O processo de cultivo mais empregado para a produção de etanol no Brasil é o descontínuo alimentado com reciclo de células, pois permite reduzir os efeitos de inibição por substrato ou produto e minimizar os custos relacionados ao preparo de inóculo. Além disso, a aplicação de modos de alimentação linear ou alimentação exponencialmente decrescente, por exemplo, pode aumentar a produtividade de etanol (CARVALHO *et al.*, 1990).

A fermentação alcoólica pode ser afetada por diversos fatores físicos, químicos e microbiológicos. Dentre os fatores físicos está a temperatura, que deve ser mantida na faixa de 26 a 35 °C, ideal para o crescimento de micro-organismos mesófilos como as leveduras. O pH, fator químico importante, deve ser mantido na faixa de 4,0-5,0; e, a contaminação bacteriana, fator microbiológico, deve ser

controlada com uso de antibióticos, caso contrário pode haver aumento descontrolado de bactérias, devido por exemplo às elevadas temperaturas de fermentação (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Durante a fermentação, a glicose é decomposta em etanol e CO₂, seguindo a reação química:

Como é possível observar na equação acima, a quantidade de CO₂ produzida é praticamente a mesma de etanol (em termos de massa são produzidos 0,96 gramas de CO₂ para cada grama de etanol). Sabendo-se que, a produção de etanol no Brasil tem aumentado muito (em 1990/1991, a produção de etanol era de aproximadamente 11 bilhões de litros e, em 2008/2009, aumentou para aproximadamente 27 bilhões de litros) (UNICA, 2011), pode-se concluir que a emissão de dióxido de carbono para o meio ambiente é elevada e necessita de soluções para sua redução.

O protocolo de Kyoto, tratado internacional realizado em 1997 pelas Nações Unidas, com o objetivo de reduzir os gases causadores de efeito estufa em 5,2 % (baseado nas emissões de 1990) foi ratificado por 170 países (WANG *et al.*, 2008). Este protocolo representa apenas um passo, pois muito ainda tem que ser feito. É preciso definir como a redução dos níveis de emissão de dióxido de carbono pode ser atingida de forma eficiente e com baixo custo. Além disso, deve-se lembrar que a solução encontrada pode estar acompanhada de benefícios adicionais, como redução da emissão de outros poluentes além do dióxido de carbono, ou a obtenção de novos produtos.

A fim de encontrar uma alternativa que una interesses ambientais e econômicos, muitos pesquisadores têm estudado a capacidade de fixação de CO₂ pelas microalgas e cianobactérias. Sydney *et al.* (2010), verificaram a fixação de dióxido de carbono, através do uso de ar enriquecido com 5% deste gás, nos cultivos de 4 diferentes micro-organismos em fermentador de 11 L (BioFlo Fermentor, New Brunswick Sci.), e a *Spirulina platensis* apresentou a segunda maior

taxa de fixação de CO₂. A aplicação de somente CO₂, proveniente de cilindro, como fonte de carbono em cultivos de *A. platensis* em fotobiorreator helicoidal foi indicada por Soletto *et al.* (2008), que ao testarem diferentes taxas de alimentação deste gás concluíram que é possível obter elevadas concentrações celulares (maiores que 10 g L⁻¹).

Estes micro-organismos podem utilizar o dióxido de carbono proveniente da atmosfera, de cilindros ou de gases efluentes de indústrias (por exemplo, gases de queima ou de combustão). A atmosfera contém apenas 0,03-0,06 % de CO₂, e por este motivo o aproveitamento pela célula seria muito baixo. Por outro lado, os gases efluentes de indústrias como o gás de combustão contêm até 15 % de CO₂, o que seria uma rica fonte para cultivo de microalgas (WANG *et al.*, 2008). Maeda *et al.* (1995), apesar de ainda não terem conseguido ótimos resultados, já haviam se preocupado com os gases de combustão liberados por termelétricas movidas à carvão e selecionaram a *Chlorella* sp. como a mais resistente das microalgas avaliadas por eles para testar o uso dos gases. E, mais recentemente, Matsudo *et al.* (2011) obtiveram sucesso ao utilizarem o dióxido de carbono proveniente de fermentação alcoólica em cultivos de *A. platensis* com uso de uréia como fonte de nitrogênio e processo de cultivo contínuo.

1.2.7 Microalgas e cianobactérias: remoção de metais pesados

Do ponto de vista biológico, os metais podem ser classificados de acordo com o impacto ambiental ou toxicidade. Elementos metálicos de densidades maiores que 5 g cm⁻³ são denominados pesados e se estes elementos exercem efeitos tóxicos em organismos vivos são denominados metais pesados tóxicos. Alguns destes metais, tais como, cobre, níquel e zinco, são, em baixas concentrações, essenciais para a vida porque eles têm importantes funções em processos metabólicos (KAPLAN, 2004). Entretanto, elevados níveis destes íons metálicos são tóxicos para a maioria dos organismos procarióticos e eucarióticos. Outros metais pesados, como, cádmio, chumbo e mercúrio, não são essenciais e são conhecidos por causarem graves danos em seres vivos até mesmo em baixas concentrações (KAPLAN, 2004).

Um dos principais problemas da sociedade é a poluição ambiental e dentre os principais poluentes estão os metais pesados, não biodegradáveis, e que podem ser acumulados em organismos vivos e estão aumentando no meio ambiente devido às atividades industriais e práticas intensas na agricultura. Portanto, a sua toxicidade está relacionada a problemas ambientais e de saúde, o que requer constante procura por tecnologias eficientes e de baixo custo para a descontaminação de locais contaminados.

Atualmente, os compostos de níquel são importantes para a indústria, porque são utilizados em muitos processos como galvanoplastia, equipamentos eletrônicos e baterias de cádmio-níquel. O níquel geralmente aparece em níveis muito baixos no meio ambiente, e apesar disso, o elevado consumo de produtos contendo este metal resulta, inevitavelmente, em poluição ambiental. As principais vias de entrada de níquel em humanos são inalação, ingestão e absorção pela pele (ATSDR, 2005). A absorção por inalação é a principal via para toxicidade induzida pelo níquel e pode causar vários danos à saúde, como, inflamação pulmonar, fibrose, asma, bronquite e danos à camada de células epiteliais, entretanto pode por outras vias causar toxicidade aos sistemas, neurológico, reprodutor, imunológico e sanguíneo (DAS; DHUNDASI, 2008; FORTI *et al.*, 2011).

O Zn^{2+} é o principal metal exigido para todas as formas de vida e é bioquimicamente importante para muitas funções celulares e bioquímicas, pois age como cofator e constituinte de muitas enzimas antioxidantes. Entretanto pode causar danos à saúde, como concluíram Johnson *et al.* (2011) que ao suplementarem ratos com cloreto de zinco observaram que esta estava associada a efeitos tóxicos no sistema reprodutivo e função hepática.

O chumbo é muito encontrado em baterias devido, por exemplo, às suas características específicas de condutividade e resistência à corrosão. Como já dito anteriormente, este metal é altamente tóxico, quando comparado com o zinco e pode causar sérios danos à saúde, principalmente no sistema nervoso, rins e sistema reprodutivo em adultos, mas principalmente em crianças (GAVRILESCU, 2004).

Nas últimas décadas, a detoxificação do meio ambiente utilizando processos biológicos tem sido de grande interesse, e a adsorção é uma das alternativas. A adsorção é um processo passivo que pode ser feito por material morto de origem biológica, o qual adsorve o poluente em sua superfície. É importante ressaltar que,

diferentemente da adsorção, a absorção é um processo ativo no qual material vivo de origem biológica absorve o poluente. Dentre os materiais biológicos possíveis de serem utilizados como adsorventes estão: bactérias, fungos, matéria de origem vegetal ou animal (CHOJNACKA, 2010), os quais têm a capacidade de adsorver íons de metais pesados devido aos grupos funcionais presentes nas suas paredes celulares, como carboxilas, hidroxilas e grupos amina, por exemplo (SAWALHA *et al.*, 2007).

A remoção de metais pesados por micro-organismos fotossintetizantes não é recente. A remoção destes metais de soluções aquosas através do processo de bioadsorção é conhecida, atualmente, como uma tecnologia eficiente, pois além disso é um método econômico para tratamento de águas residuais que resulta em efluente reutilizável de alta qualidade além de possibilitar a separação do metal + alga com a consequente obtenção de biomassa valiosa, a qual poderia ser utilizada para diferentes fins (produção de biogás e fertilizantes, por exemplo) (BECKER, 1994).

A escolha do adsorvente é muito importante e após este passo, outros fatores que influenciam o processo da adsorção devem ser analisados: pH, temperatura, concentração do adsorvente (célula) e do metal a ser adsorvido (CHOJNACKA, 2010). Geralmente, o aumento do pH causa desprotonação dos sítios ativos das biomassas expostas pelas superfícies celulares, e a diminuição do pH causa competição entre os prótons e os íons dos metais carregados positivamente, devido a estes motivos é interessante que se saiba o ponto isoelétrico da biomassa a ser utilizada.

Para melhor análise do processo de adsorção, modelos de isotermas (Langmuir e Freundlich) e de cinética (Lagergren e, Ho e McKay) são aplicados aos dados experimentais (LIU e LIU, 2008).

Finalmente, análises espectrométricas podem ser realizadas para uma caracterização da biomassa, a fim de verificar as alterações que ocorrem na biomassa após a adsorção dos íons dos metais quando comparadas às biomassas sem qualquer metal adsorvido. Sheng *et al.* (2004), por exemplo, avaliaram a adsorção de diversos íons de metais pelas biomassas secas de algas marinhas, e através da análise espectroscópica de infravermelho, concluíram que os grupos

carboxila, éter e amina estão diretamente relacionados com o processo de adsorção dos íons metálicos às superfícies das biomassas.

CAPÍTULO II

PARÂMETROS CINÉTICOS E DE CRESCIMENTO DE *Arthrospira (Spirulina) platensis* CULTIVADA EM FOTOBIORREATOR TUBULAR SOB DIFERENTES SISTEMAS DE CIRCULAÇÃO DE CÉLULAS

Este trabalho foi publicado na revista "Biotechnology and Bioengineering", com fator de impacto igual a 3,7. Anexo A.

II.1 RESUMO

Arthrospira platensis foi cultivada em fotobiorreator tubular com o objetivo de avaliar o crescimento e a produção de biomassa utilizando diferentes intensidades luminosas (60, 120 e 240 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e diferentes sistemas para a circulação de células, especificamente, sistemas *airlift*, motobomba e pressurizado. Com o uso da análise de variância, estas duas variáveis dependentes foram avaliadas em relação aos parâmetros: concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_x), fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$), eficiência fotossintética (EF) e composição da biomassa (lipídios e proteínas totais). A análise estatística mostrou que a melhor combinação de resultados em médias ($X_m = 4055 \text{ mg L}^{-1}$, $P_x = 406 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $Y_{X/N} = 5,07 \text{ mg mg}^{-1}$, lipídios totais = 8,94 %, proteínas totais = 30,3 %, EF = 2,04 %) foi obtida através da aplicação de intensidade luminosa igual a 120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, portanto, esta intensidade luminosa foi considerada a mais adequada para cultivo deste micro-organismo nesta configuração de fotobiorreator. O sistema *airlift* não exerceu nenhuma influência estatística positiva em relação às respostas estudadas, o que sugere a possibilidade de substituição do tradicional sistema de circulação de células pelos outros testados neste trabalho.

II.2 INTRODUÇÃO

Arthrospira (Spirulina) platensis é uma cianobactéria filamentosa que tem sido estudada e produzida por grandes indústrias de países como, China, Índia e Estados Unidos, porque apresenta vários compostos intracelulares de interesse comercial, como, alto teor de proteínas, ácidos graxos (por exemplo, γ -linolênico) e pigmentos (clorofila *a* e ficocianina) (PULZ E GROSS, 2004).

Esta cianobactéria também tem sido cultivada em escala laboratorial em que são utilizados meios de cultura alcalinos com elevados níveis de carbonato e bicarbonato, os quais são utilizados como fonte de carbono, e que em determinadas proporções resultam no valor de pH desejado (aproximadamente 9,5). Conforme as células se multiplicam, a concentração de bicarbonato diminui e leva, conseqüentemente, ao aumento do valor de pH, o qual tem sido, com sucesso, controlado através do fornecimento de CO₂ (BINAGHI *et al.*, 2003; DE MORAIS AND COSTA, 2007; SOLETTI *et al.*, 2008).

A intensidade luminosa deve ser fornecida adequadamente aos cultivos, pois sabe-se que o excesso de luz resulta em foto-inibição, ou seja, redução na taxa da fotossíntese quando as células excedem o nível de saturação de luz. Este fenômeno ocorre geralmente devido ao uso de elevadas intensidades luminosas, mas pode ocorrer também com o uso de intensidades um pouco menores quando, por exemplo, é aplicada uma condição de estresse ao mesmo tempo, como temperaturas mais baixas que a ótima para o crescimento do micro-organismo (VONSHAK, 1997b). Por outro lado, baixos valores de intensidade luminosa geralmente resultam em cultivos limitados por luz, e conseqüentemente, em baixos valores de concentração celular (BEZERRA *et al.*, 2008). É interessante notar que quanto menor a intensidade luminosa maior a eficiência fotossintética (EF), ou seja, micro-organismos fotossintéticos convertem a energia luminosa com elevada eficiência (WIJFFELS, 2007).

A luz é melhor aproveitada pelas células em fotobioreatores tubulares quando comparados aos abertos. Os primeiros, geralmente constituídos de finos tubos transparentes (FERREIRA *et al.*, 2010), tem de fato, uma elevada taxa área/volume, enquanto que os últimos, devido sua relativa elevada profundidade, a luz tem que passar por espessura maior para alcançar as células (BEZERRA *et al.*, 2008;

RODRIGUES *et al.*, 2010). Apesar de os tanques abertos serem muito utilizados para a produção comercial de *A. platensis*, os fotobiorreatores tubulares têm sido muito estudados não somente devido à elevada produtividade celular, mas também à outras vantagens como, baixos níveis de contaminação e melhor solubilização do CO₂ no meio de cultivo (CONVERTI *et al.*, 2006; SOLETTI *et al.*, 2008).

O sucesso do crescimento de micro-organismos fotossintéticos em reatores tubulares também depende da espessura dos tubos, mistura da cultura e do sistema de circulação de células (MOLINA *et al.*, 2001). Em particular, a performance dos sistemas de circulação de células pode ser avaliada baseando-se na capacidade de solubilização de ar no meio de cultivo, na eficiência da mistura (ONCEL E SUKAN, 2008), no estresse mecânico causado às células e na concentração de oxigênio (SIERRA *et al.*, 2008). Alguns sistemas têm sido estudados, como por exemplo, o uso de uma bomba peristáltica para o cultivo de *Chlorella* sp. em fotobiorreator tubular (PIRT *et al.*, 1983) e um sistema de coluna de bolhas para o cultivo de *A. platensis* em fotobiorreator fechado (ONCEL E SUKAN, 2008). O sistema de circulação de células mais utilizado é o denominado *airlift*, cujo sucesso está principalmente relacionado à sua habilidade em evitar estresse mecânico, especialmente no caso de cianobactérias filamentosas (CONVERTI *et al.*, 2006).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da intensidade luminosa (60, 120 e 240 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e do sistema de circulação de células (*airlift*, motobomba e pressurizado) no crescimento de *A. platensis* em fotobiorreator tubular, utilizando como respostas: concentração celular máxima, produtividade em células, fator de conversão de nitrogênio em células, eficiência fotossintética e composição da biomassa (conteúdo de lipídios e proteínas).

II. 3 MATERIAIS E MÉTODOS

II.3.1 Cultivo de *Arthrospira platensis*

II.3.1.1 Micro-organismo, meio de cultivo e preparo de inóculo

Arthrospira platensis UTEX 1926 foi cultivada em meio de cultivo padrão (SCHLÖSSER, 1982), o qual contém nitrato de sódio como fonte de nitrogênio. Este meio de cultivo foi utilizado para manutenção do micro-organismo e preparo de inóculo para todos os ensaios. O inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer de 500 mL, os quais foram agitados em *shaker* rotativo a 100 min^{-1} , temperatura de 30°C e intensidade luminosa de $72 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Após 6-8 dias de cultivo (PELIZER *et al.*, 2003), a cultura foi filtrada, lavada com solução fisiológica e ressuspensa em meio de cultivo livre de nitrato. Este foi o inóculo para todos os ensaios, os quais iniciaram com concentração celular de 400 mg L^{-1} (SOLETTI *et al.*, 2008).

II.3.1.2 Fotobiorreator e condições de cultivo

O fotobiorreator tubular (Figura II.1) utilizado neste trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia de Fermentações do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Universidade de São Paulo. Este é composto de uma estrutura de metal circundada por 40 tubos de vidro com inclinação de 2 % ($1,15^\circ$), os quais apresentam diâmetro interno de 0,01 m (CARLOZZI E PINZANI, 2005), 0,0015 m de espessura e 0,5 m de comprimento. A luz foi fornecida por 6 lâmpadas fluorescentes de 20W localizadas na parte interna da estrutura e responsável por iluminar 57 % do volume total do cultivo. Um frasco de vidro cilíndrico, localizado na parte superior do fotobiorreator, conteve parte da cultura e funcionou como frasco degaseificador. A velocidade de fluxo da cultura foi mantida em $0,2 \text{ m s}^{-1}$.

O pH do meio de cultivo foi mantido em $9,5 \pm 0,5$ (SÁNCHEZ-LUNA *et al.*, 2007) através da adição diária de CO_2 proveniente de cilindro (CONVERTI *et al.*, 2006), enquanto que a temperatura foi mantida em $29^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ (SÁNCHEZ-LUNA *et al.*, 2007) em uma sala termostaticada. As intensidades luminosas de 60, 120 e $240 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Tabela II.1) (FERREIRA *et al.*, 2010), foram ajustadas no início de cada experimento utilizando um aparelho medidor de intensidade luminosa modelo LI-250A (LI-COR, Lincoln, NE, USA) em nove diferentes pontos do fotobiorreator a fim de obter a intensidade luminosa desejada.

O nitrato de sódio foi utilizado como fonte de nitrogênio em todos os ensaios em concentração de $2,5 \text{ g L}^{-1}$ (SCHLÖSSER, 1982). A fim de evitar qualquer deficiência de nitrogênio este sal foi adicionado de forma que a concentração de nitrato não fosse reduzida além de 1 g L^{-1} (FAINTUCH, 1989).

Figura II.1. Esquema do fotobiorreator e dos três sistemas de circulação de células. (1): Frasco degaseificador; (2): Bomba de ar; (3): Rotâmetro; (4): Lâmpadas fluorescentes de 20W; (5): Tubos de vidro; (6): Mangueira externa de silicone; (7): Motobomba; (8): Sensores de nível; (9): Conexão da bomba de ar; (10): Conexão da válvula solenóide. [A] = Sistema *Airlift*; [B] = Sistema Motobomba; [C1] = Sistema pressurizado (Frasco de vidro superior); [C2] = Sistema pressurizado (Frasco de vidro inferior).

II.3.1.3 Sistemas de circulação de células

Três sistemas de circulação de células foram testados: *airlift*, motobomba e pressurizado (Tabela II.1, Figura II.1). O sistema *airlift* funcionou com o uso de uma bomba de ar, modelo S-6000 (Seven Star Electronics, Hsin Tien, Taiwan), conectada na base do fotobiorreator, fazendo com que as células circulassem no sentido horário, de forma que subiram pela mangueira externa de silicone e desceram pelos tubos de vidro. No sistema motobomba, diferentemente do *airlift*, não ocorreu incorporação de ar, porque uma moto bomba modelo AE-01-180 (Alife, Nantou, Taiwan), foi submersa na cultura dentro do frasco de vidro superior e fez a cultura circular, desta vez, no sentido anti-horário, oposto ao primeiro sistema.

Para o desenvolvimento do sistema pressurizado, um frasco cilíndrico adicional foi adicionado na parte inferior do fotobiorreator. Este frasco foi conectado a uma válvula solenóide, e uma bomba de ar ligados ao fotobiorreator através do último tubo (dos 40 existentes) na parte inferior. No frasco superior, desta vez, foram colocados dois sensores de nível com distância entre si de 6 cm um do outro; quando o volume da cultura atingiu o sensor de nível inferior, a válvula solenóide (localizada no frasco de vidro cilíndrico inferior) manteve-se fechada, desta forma, a bomba de ar que estava continuamente ligada permitiu a pressurização do sistema. A pressão fez o líquido subir pela mangueira externa de silicone e encher o frasco de vidro superior até que o sensor de nível superior fosse atingido. Neste momento a válvula solenóide foi acionada novamente mantendo-se aberta e causando a saída de ar do sistema, o que permitiu a descida da cultura pelos tubos de vidro, somente pela força da gravidade.

II.3.2 Métodos analíticos

A concentração celular foi determinada por densidade ótica, com medidas realizadas a 560nm (LEDUY E THERIEN, 1977), utilizando uma curva de calibração e um espectrofotômetro modelo 700 Plus (Femto, São Paulo, Brazil). Em meio isento de células a concentração de nitrato foi quantificada de acordo com a metodologia descrita por Vogel (1992). O pH foi medido utilizando um potenciômetro, modelo 710-A (Orion, Beverly, MA, USA) e, finalmente, após o

término de todos os ensaios, o conteúdo de proteínas totais foi determinado na biomassa seca pela metodologia de Kjeldhal, e o conteúdo de lipídios totais por extração com solução de clorofórmio-metanol 2:1 (v/v) (OLGUÍN *et al.*, 2001).

II.3.3 Cálculos

O fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$Y_{X/N} = \frac{(X_m - X_i)V}{N_t} \quad (1)$$

onde X_m e X_i são a concentração celular máxima e inicial (mg L^{-1}), V é o volume do fotobiorreator (L) e N_t é a quantidade total de nitrogênio adicionada (mg).

A produtividade em células (P_x), expressa em $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, foi calculada como a razão entre a quantidade total de células produzidas pelo volume ($X_m - X_i$) e o tempo de cultivo (T_c) (d), de acordo com a equação:

$$P_x = \frac{(X_m - X_i)}{T_c} \quad (2)$$

A eficiência fotossintética (EF), expressa em porcentagem, foi calculada da seguinte forma:

$$EF = \frac{r_G \times H_G}{IPAR} \times 100 \quad (3)$$

onde r_G é o crescimento de biomassa máximo diário ($\text{g}_{\text{DW}} \text{ d}^{-1}$), H_G é a entalpia da biomassa seca ($21,01 \text{ kJ g}_{\text{DW}}^{-1}$), e IPAR é a quantidade de radiação fotossinteticamente ativa, expressa em kJ d^{-1} , utilizando o fator de conversão de $18,78 \text{ kJ s d}^{-1}$ (SOLETTO *et al.*, 2008) assim como a intensidade luminosa utilizada em cada ensaio.

II.3.4 *Análise estatística*

A comparação dos resultados foi feita pela análise de variância two-way (ANOVA), realizada pelo programa MINITAB 16, e a significância estatística foi avaliada pela estimativa do nível descritivo (p), sendo os resultados considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$ (confidence level $> 95\%$).

II.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela II.1 – Resultados de cinética, crescimento e composição celular (concentração celular máxima, X_m ; produtividade em células, P_x ; fator de conversão de nitrogênio em células, $Y_{X/N}$; eficiência fotossintética, EF; conteúdo de lipídio, LIP; conteúdo de proteína, PTN) do cultivo de *A. platensis* em fotobiorreator tubular em função da intensidade luminosa e sistema de circulação de células (sistema *airlift*, AS; sistema motobomba, MDPS; sistema pressurizado, PS).

Ensaio	Intensidade luminosa ($\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)	Sistema de circulação de células	X_m (mg L^{-1})	P_x ($\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)	$Y_{X/N}$ (mg mg^{-1})	EF (%)	LIP (%)	PTN (%)
1	60	PS	2907	279	4,46	2,69	9,09	32,5
2	60	PS	2728	259	3,71	2,59	8,93	31,1
3	60	AS	2548	239	3,98	2,37	9,31	33,8
4	60	AS	2285	209	3,48	2,07	9,05	31,6
5	60	MDPS	2291	270	3,32	2,76	8,26	32,3
6	60	MDPS	2089	241	3,09	2,99	10,1	33,7
7	120	PS	3733	370	5,09	1,86	9,61	31,6
8	120	PS	3760	373	4,81	1,87	8,87	28,2
9	120	AS	4247	427	5,60	2,11	9,27	28,5
10	120	AS	4185	421	5,09	2,16	7,89	32,1
11	120	MDPS	4052	406	4,83	1,98	8,60	29,3
12	120	MDPS	4353	439	5,01	2,27	9,37	32,0
13	240	PS	3722	369	4,75	0,90	9,54	23,8
14	240	PS	3433	337	4,54	0,82	9,35	21,6
15	240	AS	3785	376	5,04	0,93	7,86	21,0
16	240	AS	4092	410	5,10	1,03	8,18	21,0
17	240	MDPS	4098	411	4,98	1,03	8,85	20,9
18	240	MDPS	3886	387	5,54	0,97	8,83	21,7

II.4.1 Efeito do sistema de circulação de células

A circulação da cultura é um importante parâmetro para garantir a realização de cultivos com elevadas concentrações celulares e produtividades em células, porque auxilia na mistura e, conseqüentemente, resulta em melhor disponibilidade de luz e nutrientes para as células. Devido a isto, a primeira variável estudada neste trabalho foi a influência do sistema de circulação de células sobre parâmetros cinéticos e de crescimento da cultura. Com o intuito de atender este objetivo, três diferentes sistemas foram testados, especificamente, *airlift* (AS), motobomba (MDPS) e pressurizado (PS).

Para avaliar efetivamente esta influência, a velocidade de fluxo da cultura dentro do fotobiorreator, neste trabalho, foi a mesma em todos os cultivos, a fim de que o efeito de cisalhamento fosse o mesmo. De acordo com Torzillo (1997), o estresse celular depende da velocidade com que as células fluem no líquido, e quanto maior a velocidade, maior o dano às células. Este comportamento foi verificado experimentalmente e Torzillo (1997) observou que uma velocidade de fluxo de cultura de aproximadamente $0,3 \text{ m s}^{-1}$ não foi capaz de causar danos às células de *A. platensis*, mas o aumento desta velocidade para $0,8 \text{ m s}^{-1}$ resultou numa redução de 16 % da concentração celular. Além disso, Converti *et al.* (2006), ao cultivarem a mesma cianobactéria em fotobiorreator com uma configuração similar ao do presente trabalho, concluíram que velocidades de fluxo menores que $0,21 \text{ m s}^{-1}$ são adequadas para prevenir um excesso de cisalhamento dos tricomas de *A. platensis*. Desta forma, a velocidade de fluxo de $0,20 \text{ m s}^{-1}$, utilizada nos ensaios do presente trabalho, é adequada, já que, também evitou depósito celular no interior dos tubos de vidro do fotobiorreator.

Os valores médios das respostas estudadas foram satisfatórios ($X_m = 3,381\text{-}3524 \text{ mg L}^{-1}$; $P_x = 331\text{-}359 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$; $Y_{X/N} = 4,46\text{-}4,72 \text{ mg mg}^{-1}$; $EF = 1,78\text{-}2,00 \%$, conteúdo de lipídios = $8,59\text{-}9,23 \%$ e conteúdo de proteínas = $28,0\text{-}28,3 \%$), pois são comparáveis aos resultados de cultivos de *A. platensis* realizados em fotobiorreatores fechados e uso de processos descontínuo e semi-contínuo (TRAVIESO *et al.* 2001; TREDICI E ZITELLI, 1998; WATANABE E HALL, 1996). Na Figura II.2, as curvas de crescimento celular de todos os ensaios são apresentadas para mostrar que mesmo com a aplicação de diferentes sistemas de circulação de células, o comportamento destas durante os cultivos é muito similar. Embora as

curvas dos ensaios 7-8 (duplicatas) e 13-14 (Figuras II.2B e II.2C), realizados utilizando o sistema pressurizado, aparentaram ser mais baixas que as outras, as concentrações celulares determinadas ao longo destes cultivos estavam dentro do desvio padrão e foram consideradas estatisticamente iguais quando comparadas às dos outros dois sistemas, portanto estas diferenças das concentrações celulares podem ser desconsideradas.

Figura II.2. Valores m\u00e9dios de concentra\u00e7\u00e3o celular (e barras de desvio padr\u00e3o) em rela\u00e7\u00e3o ao tempo para todos os cultivos. A = 60 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$: ensaios 1-2 ($\circ$, Sistema pressurizado), 3-4 ($\blacktriangle$, Sistema *airlift*), 5-6 ($\square$, Sistema motobomba); B = 120 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$: ensaios 7-8 ($\circ$, Sistema pressurizado), 9-10 ($\blacktriangle$, Sistema *airlift*), 11-12 ($\square$, Sistema motobomba); C = 240 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$: ensaios 13-14 ($\circ$, Sistema pressurizado), 15-16 ($\blacktriangle$, Sistema *airlift*), 17-18 ($\square$, Sistema motobomba).

Estes resultados são melhores, por exemplo, que aqueles obtidos por Masojídek *et al.* (2003) para *A. platensis* (X_m de aproximadamente 2,200 g L⁻¹) em fotobiorreator tubular com controle de temperatura, luz solar e velocidade de fluxo de 0,2 m s⁻¹ garantida por uma bomba de circulação peristáltica.

O AS é, atualmente o sistema de circulação de célula mais comumente aplicado às cianobactérias e microalgas em fotobiorreatores tubulares fechados (MOLINA *et al.*, 2001; ONCEL E SUKAN, 2008; YUAN *et al.*, 2011). Embora este sistema pareça ser o mais adequado para o cultivo de *A. platensis*, um dos principais objetivos deste trabalho foi identificar alternativas possíveis de sistemas de circulação com custos comparáveis e capazes de conferir vantagens adicionais. A análise estatística mostrou que praticamente quase todas as respostas não foram significativamente influenciadas pelo tipo de sistema de circulação células utilizado, exceto pela EF, cujo valor de p foi 0,018 (Tabela II.2). O valor de eficiência fotossintética foi estatisticamente maior quando o MDPS foi utilizado para os cultivos de *A. platensis* e este resultado sugere que neste sistema as células podem capturar energia luminosa um pouco melhor que nos outros, talvez devido a uma melhor homogeneização. Estes resultados mostram em geral que, apesar da exceção, o sistema AS pode ser substituído, com sucesso, pelos sistemas PS e MDPS. Esta conclusão é de especial interesse, porque o MDPS, por exemplo, quando comparado ao AS, é igualmente fácil de construir e apresenta baixa perda de água por evaporação. Além disso, como já visto previamente na seção de materiais e métodos, o MDPS assegura melhor solubilização do CO₂, por permitir maior tempo de contato das células com o gás, prevenindo a perda de CO₂ tipicamente observada no sistema AS (SOBCZUK *et al.*, 2000).

Tabela II.2 – Valores médios dos parâmetros cinéticos e de crescimento e de composição celular (concentração celular máxima, X_m ; produtividade em células, P_x ; fator de conversão de nitrogênio em células, $Y_{X/N}$; eficiência fotossintética, EF; conteúdo de lipídio, LIP; conteúdo de proteína, PTN) obtidos por ANOVA para os cultivos de *A. platensis* em fotobiorreator tubular utilizando três diferentes sistemas de circulação de células (sistema *airlift*, AS; sistema motobomba, MDPS; sistema pressurizado, PS).^{a,b}

Sistema de circulação de células	X_m (mg L ⁻¹)	P_x (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	$Y_{X/N}$ (mg mg ⁻¹)	EF (%)	LIP (%)	PTN (%)
AS	3524 ^A	347 ^A	4,72 ^A	1,78 ^A	8,59 ^A	28,0 ^A
MDPS	3462 ^A	359 ^A	4,46 ^A	2,00 ^B	9,00 ^A	28,3 ^A
PS	3381 ^A	331 ^A	4,56 ^A	1,79 ^A	9,23 ^A	28,1 ^A
valor de p^c	0,342	0,076	0,373	0,018	0,237	0,943

^a Valores médios são as médias dos resultados dos ensaios realizados com uso de três diferentes intensidades luminosas.

^b Diferentes letras maiúsculas foram utilizadas para as médias estatisticamente diferentes, para cada resposta analisada, de acordo com ANOVA.

^c Valores de p (nível descritivo) foram obtidos pela análise de variância two-way (ANOVA), sendo os resultados considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$ (nível de confiança > 95 %).

II.4.2 Efeito da intensidade luminosa

A Tabela II.1 mostra as condições e resultados de todos os ensaios realizados em duplicata, enquanto que a Figura II.2 ilustra os comportamentos das curvas de crescimento em diferentes intensidades luminosas. A média dos valores de X_m , obtidos independentemente do tipo de sistema de circulação de células utilizado, foram 2475, 4055 e 3836 mg L⁻¹ quando foram utilizadas as intensidades luminosas de 60, 120 e 240 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente (Tabela II.3). Os ensaios realizados com intensidade luminosa de 60 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura II.2A) apresentaram valores de X_m menores que aqueles obtidos com as intensidades luminosas de 120 e 240 $\mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figuras II.2B e II.2C), os quais foram confirmados pela análise estatística (Tabela II.3). O aumento de X_m conforme houve

o aumento da intensidade luminosa, neste trabalho de 60 para 120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, foi tamb\em observado por Bezerra *et al.* (2008) e Danesi *et al.* (2004), que cultivaram *A. platensis* em tanques abertos, assim como por Soletto *et al.* (2008), que cultivaram a mesma cianobact\eria em um fotobiorreator tubular helicoidal. Este resultado \e consistente com o fato de que *A. platensis* \e um micro-organismo fotossintetizante que absorve a luz de forma eficiente e, atrav\es da fotoss\intese, transforma a energia luminosa em energia qu\imica na forma de ATP para o crescimento celular (MOHANTY; SRIVASTAVA; KRISHNA, 1997). Desta forma, em condi\c\es de limita\c\o de luz, como ocorreu nesta faixa de intensidade luminosa, quanto maior a intensidade luminosa fornecida ao cultivo maior a concentra\c\o celular final.

Tabela II.3 - Valores m\edios dos par\ametros cin\eticos e de crescimento e de composi\c\o celular (concentra\c\o celular m\axima, X_m ; produtividade em c\elulas, P_x ; fator de convers\o de nitrog\enio em c\elulas, $Y_{X/N}$; efici\ncia fotossint\etica, EF; conte\do de lip\dio, LIP; conte\do de prote\ina, PTN) obtidos por ANOVA para os cultivos de *A. platensis* em fotobiorreator tubular utilizando tr\es intensidades luminosas (60, 120 e 240 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$).^{a,b}

Intensidade luminosa	X_m (mg L ⁻¹)	P_x (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	$Y_{X/N}$ (mg mg ⁻¹)	EF (%)	LIP (%)	PTN (%)
60	2475 ^A	250 ^A	3,67 ^A	2,58 ^A	9,12 ^A	32,5 ^A
120	4055 ^B	406 ^B	5,07 ^B	2,04 ^B	8,94 ^A	30,3 ^A
240	3836 ^B	382 ^B	4,99 ^B	0,95 ^C	8,77 ^A	21,7 ^B
valor de p^c	0,000	0,000	0,000	0,000	0,616	0,000

^a Valores m\edios s\o as m\edias dos resultados dos ensaios realizados com uso dos tr\es diferentes sistemas de circula\c\o de c\elulas.

^b Diferentes letras mai\sculas foram utilizadas para as m\edias estatisticamente diferentes, para cada resposta analisada, de acordo com ANOVA.

^c Valores de p (n\ivel descritivo) foram obtidos pela an\lise de vari\ncia two-way (ANOVA), sendo os resultados considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$ (n\ivel de confian\ca > 95 %).

Por outro lado, um posterior incremento na intensidade luminosa para 240 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ resultou em valores m\'edios de X_m (3836 mg L^{-1}) estatisticamente coincidentes com aqueles dos ensaios realizados \`a 120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (4055 mg L^{-1}) (Tabela II.3, Figura II.2), o que sugere que na maior intensidade luminosa, o cultivo de *A. platensis* foi realizado em condi\c7\~ao de fotosatura\c7\~ao, ou seja, de excesso de luz. De acordo com Vonshak (1997b), cada micro-organismo fotossint\'etico tem, de fato, seu pr\'oprio valor limite de intensidade luminosa para absorver a radia\c7\~ao eletromagn\'etica, e que o crescimento de sua cepa de *A. platensis* se tornou saturado com intensidades luminosas maiores que 150-200 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; enquanto, Ferreira *et al.* (2010) obtiveram, com outra cepa, cultivos com elevada produtividade ao utilizarem a intensidade luminosa de 240 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, o que indica a possibilidade de at\'e mesmo esta intensidade luminosa ser adequada para o crescimento de *A. platensis*.

Considerando que a maioria dos ensaios duraram praticamente o mesmo tempo (8-9 dias), a produtividade em c\'elulas (P_x) exibiu quase o mesmo comportamento que X_m , pois seus valores m\'edios obtidos nos ensaios realizados com as intensidades luminosas de 120 e 240 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (406 e 382 $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, respectivamente) foram consideradas estatisticamente iguais (Tabela II.3) e significativamente maiores que os valores obtidos para os ensaios realizados com a intensidade luminosa de 60 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (250 $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Estes resultados sugerem que um esfor\c7\~o maior deveria ser feito para descobrir o valor do limite capaz de causar a fotosatura\c7\~ao para a cepa utilizada neste trabalho, utilizando a faixa de intensidade luminosa acima. Para citar outros exemplos, o maior valor de P_x (439 $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$), obtido neste trabalho (ensaio 12, realizado com 120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) foi ligeiramente menor que o valor obtido em fotobiorreator tubular exposto \`a luz solar (500 $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) (MASOJ\'IDEK *et al.*, 2003), e muito maior que aqueles obtidos em ensaios realizados em tanques abertos (69,9-73,1 $\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) (DANESI *et al.*, 2002; S\'ANCHEZ-LUNA *et al.*, 2007). Tal compara\c7\~ao tamb\'em mostra o potencial dos fotobiorreatores tubulares para aplica\c7\~ao industrial (TORZILLO, 1997).

Sabendo-se que a fonte de nitrog\^enio utilizada foi a mesma em todos os ensaios (NaNO_3) e que foi fornecida quando necess\'ario, de forma que sua concentra\c7\~ao no meio de cultivo n\~ao atingisse valores inferiores a 1 g L^{-1} , os valores de $Y_{X/N}$ deveriam ser os mesmos; entretanto, os maiores valores m\'edios de

$Y_{X/N}$ (5,07 e 4,99 mg mg⁻¹) (Tabela II.3) foram obtidos nos ensaios realizados com as intensidades luminosas de 120 e 240 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente. Estes resultados sugerem que a maior absorção de nitrogênio pelas células cultivadas, provavelmente relacionada com a necessidade de sintetizar maior quantidade de pigmentos fotossintéticos.

De acordo com Wijffels (2007), a eficiência fotossintética (EF) é definida como a porcentagem de energia no espectro de luz visível que é convertida em biomassa; conseqüentemente, em baixas intensidades luminosas as microalgas e cianobactérias deveriam converter a luz com maior eficiência. Portanto, os cultivos realizados neste trabalho com intensidades luminosas de 60, 120 e 240 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ resultaram em valores médios de EF de 2,58; 2,04 e 0,95 %, respectivamente ($p = 0,000$) (Tabela II.3). Os valores de EF para os ensaios realizados com 60 e 120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foram considerados satisfatórios, porque os valores de EF são geralmente maiores que 1 %, enquanto que, como esperado, uma grande quantidade de luz foi perdida em condições de fotossaturação (intensidade luminosa = 240 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Quanto ao efeito da intensidade luminosa na composição da biomassa, embora a iluminância, dentre outros fatores ambientais, seja relatada por causar grande impacto no conteúdo em lipídios dentro da célula (COHEN, 1997), este não sofreu nenhuma influência estatística das três diferentes intensidades luminosas utilizadas neste trabalho ($p = 0,616$) (Tabela II.3). A média do conteúdo em lipídios de todos os ensaios (9 %) estava dentro da faixa 6-13 % relatada como a padrão para *A. platensis* (COHEN, 1997). Por outro lado, o conteúdo em proteínas foi estatisticamente dependente da luz ($p = 0,000$), pois o valor médio obtido nos ensaios realizados com a maior intensidade luminosa testada (21,7 %) foi estatisticamente menor que aqueles obtidos à 60 e 120 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (32,5 e 30,3 %, respectivamente) (Tabela II.3). A variação na composição da biomassa conforme a intensidade luminosa foi também observada por Bezerra *et al.* (2008) para cultivos de *A. platensis* em minitânques ao utilizarem intensidade luminosa de 60-168 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$; entretanto, estes autores notaram que o aumento neste parâmetro causou uma progressiva diminuição no conteúdo em proteínas que atingiu um valor médio de 36 % ao utilizarem intensidade luminosa de 156 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ comparável a este trabalho.

Em conclusão, sabendo-se que os ensaios realizados com intensidade luminosa de $60 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ exibiram valores de X_m e P_x insatisfatoriamente baixos, enquanto que o uso de $240 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ não resultou em nenhuma melhora no crescimento celular quando comparado a intensidade luminosa de $120 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, esta última intensidade luminosa assegurou melhores condições de irradiância para o crescimento de *A. platensis* na configuração de fotobiorreator proposta, apesar da EF ligeiramente menor. A biomassa obtida nestas condições resultou em valores médios: conteúdo em lipídio de 8,94 % e conteúdo em proteína de 30,3 %.

II.5 CONCLUSÕES

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de três sistemas de circulação de células (sistema *airlift*, AS; sistema motobomba, MDPS; e sistema pressurizado, PS) e três diferentes intensidades luminosas (60 , 120 e $240 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) sobre as respostas: concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_x), fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$), eficiência fotossintética (EF) e composição da biomassa (conteúdo em proteína e lipídio).

Os sistemas de circulação de células não exerceram influência estatística no crescimento de *A. platensis* para quase todas as respostas estudadas neste trabalho, por este motivo podemos sugerir a possibilidade de uso dos sistemas PS e MDPS em vez do tradicional AS para cultivos laboratoriais desta cianobactéria em fotobiorreator tubular. Por outro lado, os mesmos parâmetros de respostas foram influenciados pela intensidade luminosa, e a melhor combinação de resultados foi obtida quando a intensidade luminosa de $120 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ foi utilizada ($X_m = 4055 \text{ mg L}^{-1}$, $P_x = 406 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $Y_{X/N} = 5,07 \text{ mg mg}^{-1}$, lipídios totais = 8,94 %, proteínas totais = 30,3 %, EF = 2,04 %).

CAPÍTULO III

CULTIVO DE *Arthrospira (Spirulina) platensis* EM FOTOBIOREATOR TUBULAR: USO DE CO₂ CUSTO ZERO PROVENIENTE DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Este trabalho foi publicado na revista Applied Energy com fator de impacto igual a 3,888. Anexo B.

III.1 RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de *A. platensis* em fotobiorreator tubular utilizando CO₂ proveniente de fermentação alcoólica. Os resultados destes cultivos foram comparados àqueles obtidos dos ensaios com uso de CO₂ de cilindro, todos com aplicação de diferentes protocolos de adição simultânea de nitrato de sódio e sulfato de amônio. Concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_x), fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{x/N}$), e composição de biomassa (lipídios e proteínas totais) foram selecionados como respostas e avaliados por análise de variância. A fonte de CO₂ não exerceu influência estatística significativa sobre estas respostas, o que indica a possibilidade de uso do gás resíduo da fermentação alcoólica como fonte de carbono assim como para controle do pH do meio de cultivo, deste modo contribuindo para a redução do efeito estufa. Os resultados, de forma geral, demonstraram que a melhor combinação de resultados em valores médios ($X_m = 4,543 \text{ g L}^{-1}$; $P_x = 0,460 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$; $Y_{x/N} = 15,6 \text{ g g}^{-1}$; lipídios totais = 8,39 %; proteínas totais = 18,7 %) foram obtidos dos ensaios com uso da mistura de 25 % NaNO₃ e 75 % (NH₄)₂SO₄, ambos expressos como nitrogênio.

III.2 INTRODUÇÃO

Do ponto de vista biotecnológico, *Arthrospira (Spirulina) platensis* é uma das mais importantes cianobacérias porque é capaz de produzir dentro de suas células elevadas concentrações de pigmentos (clorofila *a* e ficocianina), ácidos graxos (γ -linolênico) e proteínas (COHEN, 1997; PULZ e GROSS, 2004). O cultivo deste micro-organismo fotossintetizante depende grandemente da disponibilidade de luz e nutrientes, pH, densidade celular, temperatura e eventual contaminação causada por outros micro-organismos.

Um dos elementos fundamentais para o cultivo de *A. platensis* é o nitrogênio, o qual é fornecido utilizando nitratos de potássio (PAOLETTI; PUSHPARAJ; TOMASELLI, 1975) ou de sódio (SCHLÖSSER, 1982) como fontes padrões de nitrogênio. Apesar do uso das fontes tradicionais, os sais de uréia e amônio têm sido utilizados com sucesso como fontes alternativas, e foram escolhidos especialmente devido ao baixo custo (RODRIGUES *et al.*, 2010). Além disso, esta cianobactéria prefere absorver o nitrogênio na forma de amônia (BOUSSIBA, 1989) quando ambos, nitrato e amônio, estão presentes no meio de cultivo, isto porque os nitratos requerem uma redução enzimática para nitrito e então para amônia com gasto de energia (MARKOU e GEORGAKAKIS, 2011). Quando adicionados em meios alcalinos, os sais amoniacais se transformam em amônia, a qual é volátil e tóxica em elevadas concentrações (CARVALHO *et al.*, 2004). Por estas razões, a fim de reduzir a perda de amônia por evaporação, seria adequado cultivar *A. platensis* em fotobiorreatores fechados (CARLOZZI e PINZANI, 2005; SOLETTTO *et al.*, 2008) e para a prevenção da toxicidade seria adequado utilizar o processo descontínuo alimentado, no qual pequenas quantidades desta fonte de nitrogênio são adicionadas diariamente aos cultivos (FERREIRA *et al.*, 2010). A adição de somente um tipo de fonte de nitrogênio tem sido relatada por muitos autores (CARLOZZI e PINZANI, 2005; CARVALHO *et al.*, 2004; SOLETTTO *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2010); entretanto, Rodrigues *et al.* (2010) aplicou recentemente o uso da combinação de duas fontes de nitrogênio, nitrato e amônio, para cultivo de *A. platensis* em tanques abertos, e este trabalho teve bons resultados em termos de concentração celular e qualidade da biomassa quando comparadas aos cultivos realizados com uso de somente uma fonte de nitrogênio.

Um outro importante componente do meio de cultivo é a fonte de carbono, a qual é utilizada, geralmente, na forma de carbonato e bicarbonato em mistura. Elevados níveis destes sais em proporções adequadas pode resultar, ao mesmo tempo, em valor de pH ótimo (aproximadamente 9,5), assim como grande disponibilidade de fonte de carbono para os cultivos de *A. platensis*. Durante o cultivo, as células consomem, preferencialmente, o bicarbonato e liberam carbonato para o meio de cultivo (BINAGHI *et al.*, 2003); este desequilíbrio de bicarbonato/carbonato leva ao progressivo aumento de pH, o qual é evitado, com sucesso, pelo constante fornecimento de CO₂, suficiente para manter este parâmetro dentro da faixa ideal de crescimento do micro-organismo (BINAGHI *et al.*, 2003; FERREIRA *et al.*, 2010; MATSUDO *et al.*, 2011; SOLETTTO *et al.*, 2008). Em escala laboratorial, o controle do pH é, geralmente, feito com uso de CO₂ puro proveniente de cilindros, enquanto que em larga-escala, os gases efluentes industriais poderiam ser utilizados. Sabe-se que muitas indústrias eliminam estes gases efluentes para a atmosfera e são uns dos responsáveis pelo efeito estufa (RAMANATHAN e FENG, 2009).

As plantas de fermentação para produção de etanol são grandes fontes de CO₂ e o número destas plantas está aumentando no mundo inteiro, pois o etanol é renovável e considerado combustível menos poluente quando comparado aos combustíveis fósseis (OLIVEIRA e VASCONCELOS, 2006). De acordo com a *União da Agroindústria Canavieira de São Paulo* (UNICA) (UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO, 2011), a produção de etanol no Brasil foi de aproximadamente 11,5 bilhões de litros em 1990/1991 e 27,5 bilhões de litros em 2008/2009. Lenvando em consideração que a produção de etanol e CO₂ é quase a mesma em termos de massa (0,96 g CO₂/g etanol), o aumento na produção de etanol resulta em uma piora na emissão de CO₂. A fixação deste gás tem sido proposta como um método para remoção, o que contribuiria para a redução do efeito estufa (MAEDA *et al.*, 1995). Uma das aplicações poderia ser a produção de micro-organismos fotossintetizantes (MATSUDO *et al.*, 2011), os quais são capazes de capturar a luz e fixar CO₂ de forma mais eficiente que as plantas, e podem crescer utilizando pequenas áreas de cultivo quando comparado às plantas (JANSSEN *et al.*, 2002). Particularmente, o estado de São Paulo é o maior produtor de etanol no Brasil e sua produção alcançou, em 2008/2009, aproximadamente 17

bilhões de litros (UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO, 2011), o que corresponde a aproximadamente 13 bilhões de quilos de CO₂. Esta grande quantidade de CO₂ poderia ser proveitosamente utilizada para produzir 7 bilhões de quilos de biomassa, a qual pode ser utilizada para obtenção de energia através da combustão (CHEN; MA; LIU, 2011), gaseificação (VENKITASAMY *et al.*, 2011) ou processos envolvendo fermentação anaeróbica para a produção de gases energéticos, como bio-hidrogênio e bio-metano (CHENG *et al.*, 2011).

Neste trabalho foi investigada a possibilidade do uso de CO₂ proveniente de fermentação alcoólica e da mistura de duas diferentes fontes de nitrogênio, NaNO₃ e (NH₄)₂SO₄, para o cultivo de *Arthrospira (Spirulina) platensis* em fotobiorreator tubular. Para isto, sais de nitrato e amônio foram adicionados de forma descontínua alimentada em três diferentes proporções, e o pH dos cultivos foram controlados com a adição do CO₂ resíduo da fermentação alcoólica ou CO₂ puro proveniente de cilindro. Estes resultados foram avaliados em termos da concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_x), fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{x/N}$) e composição da biomassa (conteúdo em proteínas e lipídios).

III.3 MATERIAIS E MÉTODOS

III.3.1 Cultivo de *Arthrospira platensis*

III.3.1.1 *Microorganismo, meio de cultivo e preparo de inóculo*

A cepa de *Arthrospira platensis* UTEX 1926 foi obtida da Coleção de Culturas da Universidade do Texas. O meio de cultivo padrão (SCHLÖSSER, 1982) contendo nitrato de sódio como fonte de nitrogênio foi utilizado para manutenção da cultura e preparo do inóculo, enquanto que os ensaios realizados para verificar o efeito do uso simultâneo de nitrato de sódio e sulfato de amônio foram feitos com meio de cultivo padrão, mas com diferentes proporções de NaNO₃/(NH₄)₂SO₄.

O inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer de 500 mL e colocados em *shaker* rotativo a 100 min⁻¹, 29 ± 1°C, e intensidade luminosa de 72 μmol fótons m⁻² s⁻¹. Após 6-8 dias de cultivo (PELIZER *et al.*, 2003), a cultura foi filtrada, lavada com

solução fisiológica para remover o sal nitrato, e ressuspensa em meio de cultivo livre de nitrogênio. A concentração celular inicial foi estabelecida em 400 mg L⁻¹ (SOLETTO *et al.*, 2008).

III.3.1.2 Fotobiorreator, condições de cultivo e ensaios

O fotobiorreator tubular (Figura III.1) utilizado neste trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Tecnologia de Fermentações do Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica da Universidade de São Paulo. O reator é constituído de uma estrutura de metal circundada por 40 tubos de vidro com inclinação de 2 % (1,15°), cada um com 0,01 m de diâmetro interno (CARLOZZI e PINZANI, 2005); 0,0015 m de espessura; e, 0,5 m de comprimento. A luz foi fornecida por 6 lâmpadas fluorescentes de 20 W localizadas na parte interna do fotobiorreator, que iluminou 57 % do volume total de trabalho. Um frasco cilíndrico de vidro contendo parte da cultura foi colocado na parte superior do reator e funcionou como frasco degaseificador. A velocidade de fluxo da cultura foi mantida em 0,2 m s⁻¹.

Figura III.1. Esquema do fotobiorreator. (1): Frasco degaseificador; (2): Motobomba; (3): Lâmpadas fluorescentes de 20W; (4): Tubos de vidro; (5): Mangueira externa de silicone.

O pH do cultivo foi mantido em $9,5 \pm 0,5$ (SÁNCHEZ-LUNA *et al.*, 2007) pela adição diária de CO_2 proveniente de fermentação alcoólica ou puro de cilindro, enquanto que a temperatura foi mantida em $29\text{ }^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ (SÁNCHEZ-LUNA *et al.*, 2007) em uma sala termostatzada. A intensidade luminosa foi mantida em $120\text{ }\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ (FERREIRA *et al.*, 2011) e medida por um aparelho modelo LI-250A (LI-COR, Lincoln, NE, USA), no início de cada ensaio e em nove pontos diferentes do fotobiorreator a fim de garantir a intensidade luminosa desejada. O volume de trabalho foi 3,5 L e o sistema de circulação de células utilizado neste trabalho foi o sistema Motobomba (FERREIRA *et al.*, 2011).

As condições experimentais de todos os ensaios realizados neste trabalho estão listadas na Tabela III.1 juntamente com os resultados. Os ensaios C1 e C2,

realizados com adição de CO_2 proveniente de cilindro (C), e os ensaios E1 e E2, aos quais CO_2 proveniente de fermentação alcoólica foi fornecido, são ensaios padrão e, portanto, foram realizados com a adição de somente nitrato como fonte de nitrogênio. Os ensaios de 1-6 e suas respectivas repetições foram realizados com adição de misturas de diferentes proporções de nitrato de sódio e sulfato de amônio.

Tabela III.1 – Ensaio e resultados de X_m (concentração celular máxima), P_x (produtividade em células), $Y_{x/N}$ (fator de conversão de nitrogênio em células), conteúdos de lipídio (LIP) e proteína (PTN) para o cultivo de *Arthrospira platensis* em fotobiorreator tubular.

Ensaio ^a	Fonte de CO ₂	Protocolos de adição de nitrogênio ^b	X_m (g L ⁻¹)	P_x (g L ⁻¹ d ⁻¹)	$Y_{x/N}$ (g g ⁻¹)	LIP (%)	PTN (%)
1	Fermentação alcoólica	I	4,392	0,444	15,0	8,90	22,2
1 _r	Fermentação alcoólica	I	4,479	0,453	15,3	8,99	17,2
2	Fermentação alcoólica	II	3,911	0,390	13,2	9,39	27,0
2 _r	Fermentação alcoólica	II	4,118	0,413	14,0	8,05	25,3
3	Fermentação alcoólica	III	3,861	0,385	13,0	9,33	28,9
3 _r	Fermentação alcoólica	III	3,785	0,376	12,7	9,80	30,3
4	Cilindro	I	4,724	0,480	16,2	7,34	17,1
4 _r	Cilindro	I	4,576	0,464	15,7	8,31	18,1
5	Cilindro	II	4,130	0,414	14,0	9,07	25,2
5 _r	Cilindro	II	4,265	0,429	14,5	8,36	28,4
6	Cilindro	III	3,720	0,369	12,5	8,56	30,5
6 _r	Cilindro	III	3,939	0,393	13,3	10,4	29,0
E	Fermentação alcoólica	Somente nitrato	4,041	0,405	5,35	9,79	28,2
E _r	Fermentação alcoólica	Somente nitrato	3,680	0,364	4,61	9,27	27,4
C	Cilindro	Somente nitrato	4,038	0,404	4,73	8,60	29,3
C _r	Cilindro	Somente nitrato	3,804	0,378	4,42	9,37	32,0

^a r = repetição

^b Mistura de nitrogênio de: protocolo I = 25% NaNO₃ e 75% (NH₄)₂SO₄; protocolo II = 50% NaNO₃ e 50% (NH₄)₂SO₄; protocolo III = 75% NaNO₃ e 25% (NH₄)₂SO₄, expressos em nitrogênio.

III.3.1.3 Protocolos de alimentação de nitrogênio

Um ensaio padrão foi inicialmente realizado com o uso da intensidade luminosa escolhida ($120 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e adio de nitrato de sdo quando foi necessário, a fim de que a concentração de nitrato no meio de cultivo não atingisse valores inferiores a 1 g L^{-1} (FAINTUCH, 1989). A curva de crescimento obtida deste ensaio foi utilizada para calcular a quantidade de nitrogênio que deveria ser adicionada diariamente, na forma de sais de nitrato e amônio em misturas, a fim de sustentar o crescimento celular esperado. Este cálculo foi baseado na suposição de que *A. platensis* contm em sua biomassa seca 7 % de nitrogênio (FERREIRA *et al.*, 2010).

De acordo com os três protocolos selecionados, toda a fonte de nitrogênio necessária para o crescimento celular foi adicionada nas seguintes proporções, expressas em porcentagem de nitrogênio: (I) 25 % NaNO_3 e 75 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (II) 50 % NaNO_3 e 50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; (III) 75 % NaNO_3 e 25 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Tabela III.2). O nitrato de sdo foi todo adicionado no início dos cultivos, enquanto que o sulfato de amônio foi alimentado a cada 12 horas a partir do primeiro da até o oitavo da de cultivo.

Tabela III.2 – Adição diária de sulfato de amônio e nitrato de sódio simultaneamente de acordo com os seguintes protocolos de alimentação de nitrogênio: protocolo I = 25% NaNO_3 e 75% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; protocolo II = 50% NaNO_3 e 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; protocolo III = 75% NaNO_3 e 25% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, expressos em nitrogênio.¹

T^2 (dias)	X^3 (g L ⁻¹)	N_{ad}^4 (mM)	Protocolo I (ensaio 1 e 4) (mM)		Protocolo II (ensaio 2 e 5) (mM)		Protocolo III (ensaio 3 e 6) (mM)	
			N_N^5	N_S^5	N_N^5	N_S^5	N_N^5	N_S^5
0	0,400	0,72	4,75	0,54	9,51	0,36	14,3	0,18
1	0,544	1,81	-	1,36	-	0,91	-	0,45
2	0,907	2,66	-	2,00	-	1,33	-	0,67
3	1,439	2,82	-	2,12	-	1,41	-	0,71
4	2,003	2,48	-	1,86	-	1,24	-	0,62
5	2,500	2,71	-	2,04	-	1,36	-	0,68
6	3,042	2,29	-	1,72	-	1,15	-	0,57
7	3,501	1,93	-	1,45	-	0,97	-	0,48
8	3,887	1,58	-	1,18	-	0,79	-	0,39
9	4,202	-	-	-	-	-	-	-
10	4,116	-	-	-	-	-	-	-

¹ O nitrogênio de NaNO_3 foi todo adicionado no primeiro dia do cultivo (dia zero) e aquele de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi adicionado cada dia em diferentes concentrações, do primeiro ao oitavo dia de cultivo, de acordo com o cultivo padrão realizado com uso de somente nitrato como fonte de nitrogênio.

² T_c = tempo de cultivo.

³ X = concentração celular.

⁴ N_N = nitrogênio proveniente de nitrato de sódio; N_S = nitrogênio proveniente de sulfato de amônio.

III.3.1.4 Métodos analíticos

A concentração de biomassa foi determinada por medidas de densidade ótica com uso de comprimento de onda de 560 nm (LEDUY e THERIEN, 1977), utilizando uma curva de calibração e espectrofotômetro, modelo 700 Plus (Femto, São Paulo, Brazil). Amostras de meio de cultivo livres de células foram utilizadas para a realização das seguintes análises: concentração de nitrato de acordo com Vogel (1992), concentração de amônia total de acordo com o método fenol hipoclorito (SOLORZANO, 1969), e carbonato total de acordo com Pierce e Haenish (1948). O pH foi medido utilizando um potenciômetro, modelo 710-A (Orion, Beverly, MA, USA).

Finalmente, no final dos cultivos, as células foram recolhidas por centrifugação, lavadas três vezes com água destilada para remover os sais e foram secas a 55°C por 12 h. As amostras trituradas foram utilizadas para análises de conteúdo de proteínas totais de acordo com o método de Kjeldhal, e conteúdo de lipídios totais pela extração com solução de clorofórmio-metanol 2:1 (v/v) (OLGUÍN *et al.*, 2001).

III.3.1.5 Cálculos

A produtividade em células (P_x), expressa em $\text{g L}^{-1} \text{d}^{-1}$, foi calculada pela razão entre a quantidade total de células produzidas por unidade de volume ($X_m - X_i$) e o tempo de cultivo (T_c), de acordo com a equação:

$$P_x = \frac{(X_m - X_i)}{T_c} \quad (1)$$

O fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$) foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$Y_{X/N} = \frac{(X_m - X_i)V}{N_t} \quad (2)$$

onde X_m e X_i são as concentrações máxima e inicial (g L^{-1}), V (L) é o volume do fotobiorreator e N_t é a quantidade total de nitrogênio adicionada.

III.3.2 Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

III.3.2.1 *Micro-organismo, preparo de inóculo de cultivos*

O inóculo para a fermentação alcoólica foi preparado utilizando 1,1 Kg de levedura comercial prensada (*Saccharomyces cerevisiae*) homogeneizada em 6 L de água destilada, e o mosto foi preparado pela diluição de melaço em água destilada até atingir a concentração de aproximadamente 220 g L^{-1} de açúcares redutores totais (ART). 500 U L^{-1} de penicilina (AQUARONE, 1960) e $0,5 \text{ g L}^{-1}$ de uréia foram adicionados ao mosto para evitar contaminação e como fonte de nitrogênio, respectivamente. O pH foi ajustado para 4,5-5,0 utilizando ácido sulfúrico ou hidróxido de sódio quando necessário (CARVALHO *et al.*, 1990).

III.3.2.2 *Fotobiorreator e condições da fermentação alcoólica*

Os ensaios da fermentação foram realizados em um fermentador *New Brunswick* à temperatura de $32 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$. A velocidade das pás foi de 200 min^{-1} , não houve fornecimento de ar, e o pH não foi controlado (CARVALHO *et al.*, 1990). Após a adição do inóculo, a velocidade e temperatura foram ajustadas, e o mosto foi constantemente adicionado dentro do fotobiorreator na velocidade de $2,8 \text{ L h}^{-1}$ durante as primeiras 5 horas, quando o volume total atingiu 20 L. Após o término da alimentação, as fermentações foram mantidas por mais 4 horas quando a concentração de etanol se manteve constante. As amostras foram retiradas nos tempos: 1, 3, 5, 7, 8 e 9 horas. Foram feitas nove fermentações alcoólicas para fornecer a quantidade necessária de dióxido de carbono para os cultivos de *A. platensis*.

III.3.2.3 Métodos analíticos

A concentração de biomassa foi determinada por massa seca, pela filtração de 5 mL de amostra de mosto com uso de membrana de 1,2 μm Millipore®, lavagem com 50 mL de água destilada e secagem por aproximadamente 100°C durante 3 h, e pesagem até peso constante. Amostras de 12 mL foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 min, e o sobrenadante foi utilizado para analisar açúcares e etanol, pelos métodos de Somogyi (1952) e dicromato (JOSLYN, 1970), respectivamente.

III.3.3 Análise estatística

A comparação dos resultados foi feita pela análise de variância (ANOVA - programa MINITAB 16), especificamente one-way ANOVA para os resultados de fermentação alcoólica e two-way para os resultados dos cultivos de *A. platensis*. A significância estatística foi avaliada pela estimativa do nível descritivo (p), sendo os resultados considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$ (nível de confiança de 95 %).

III.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

III.4.1 Efeito da alimentação de nitrogênio

A média de resultados para as fermentações alcoólicas descontínuas alimentadas realizadas para fornecer CO_2 para o cultivo de *A. platensis* estão apresentadas na Figura III.2. Durante o tempo de alimentação (primeiras 5 horas), a concentração de açúcares redutores totais (ART) aumentaram até aproximadamente 35 g L^{-1} . A partir da quinta hora, foi observada uma concentração de ART residual de 5 g L^{-1} , o que é comum em fermentações em que se utiliza melaço de cana de açúcar como fonte de carbono (CARVALHO *et al.*, 1990) e, provavelmente, este valor corresponde a substâncias que não são açúcares, mas que são determinadas como açúcares redutores pelo método de Somogyi. A concentração celular reduziu de 56,2 para 30,9 g L^{-1} como uma consequência da diluição do meio de cultivo adicionado, enquanto que a concentração de etanol

aumentou até $68,8 \text{ g L}^{-1}$ na sétima hora do ensaio, somente após o término da adição de meio de cultivo. É importante notar que os resultados de todas as nove fermentações alcoólicas foram considerados estatisticamente iguais ($p = 0,998-1,000$) quando analisados por one-way ANOVA.

O valor de produção média de etanol mais elevado obtido neste trabalho ($68,8 \text{ g L}^{-1}$) foi maior que aquele obtido por Converti *et al.* (2003) ($58,6 \text{ g L}^{-1}$), os quais também cultivaram levedura comercial e processo descontínuo alimentado para produção de etanol, entretanto adicionaram melaço clarificado como substrato e utilizaram volume de trabalho de 10 L, com tempo de enchimento de 7 horas. Levando em consideração que o etanol e o CO_2 são produzidos em quantidades equimolares, o elevado valor da produção de etanol indica uma, igualmente, elevada liberação de CO_2 , a qual foi capaz de manter o crescimento descontínuo alimentado de *A. platensis* no fotobiorreator.

Figura III.2. Concentrações celular (A), de etanol e de açúcares redutores totais (B) em função do tempo com desvio padrão para as nove fermentações alcoólicas realizadas neste trabalho.

O CO₂, tanto o puro proveniente de cilindro ou aquele resíduo da fermentação alcoólica, foram borbulhados dentro dos tubos do fotobiorreator como fonte de carbono e para controlar o pH para um valor ótimo (9,5). Como já foi ressaltado por

Binaghi *et al.* (2003), o bicarbonato é a forma prevalente do sistema $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{=}$ a pH 9,6, enquanto que em pH 11,3 este está praticamente ausente. Sendo assim, o pH ótimo para o crescimento de *A. platensis* é por volta de 9,5, porque este micro-organismo consome preferencialmente bicarbonato, 2 moles do qual, uma vez transportado para o interior celular, são convertidos em $\text{CO}_3^{=}$ and CO_2 , sendo o último utilizado na fotossíntese e o primeiro liberado para o meio de cultivo.

A Figura III.3 ilustra, como exemplos, a variação diária de pH e o crescimento celular das duplicatas dos ensaios realizados com uso de somente nitrato como fonte de nitrogênio, e utilizando ambos, CO_2 puro proveniente de cilindro (C) ou CO_2 resíduo de fermentação alcoólica (E). Esta figura mostra claramente que à medida que houve aumento do pH a concentração celular também aumentou, e que este aumento foi maior quando as células estavam em crescimento exponencial, o que demonstra o rápido crescimento celular desta fase. A concentração de carbonato total (aproximadamente $9,0 \text{ g L}^{-1}$) manteve-se quase constante durante todos os ensaios, sugerindo que a adição de CO_2 foi capaz de repor a fonte de carbono consumida, evitando, ao mesmo tempo, qualquer acúmulo no meio de cultivo. Exemplificando, o ensaio 1 (Tabela III.1), cujo valor de P_x foi $0,444 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ e considerando que o peso seco da célula é constituído de aproximadamente 50 % de carbono (CORNET *et al.*, 1992), é possível estimar a necessidade de dióxido de carbono de $2,849 \text{ g d}^{-1}$ para os 3,5 L de cultura. Levando em consideração que as células atingem a concentração celular máxima dentro de 9 dias, a quantidade total de CO_2 necessária para o crescimento foi de 26 g, o que representa aproximadamente 84 % do dióxido de carbono total presente no meio de cultivo inicial (30,8 g), tanto na forma de carbonato como de bicarbonato. Estudo prévios demonstraram que, se o pH não for controlado, as células param de crescer (MATSUDO *et al.*, 2011), o que justifica a importância da adição de CO_2 diariamente neste trabalho. É importante mencionar que a correção do pH com CO_2 é melhor que com ácidos inorgânicos, porque previne a redução de carbono ao longo dos cultivos e resultar em escassez de carbono (SÁNCHEZ-LUNA *et al.*, 2007). Além disso, o carbonato e bicarbonato presentes no meio de cultivo no início dos ensaios não são totalmente consumidos pelos micro-organismos até o fim do cultivo; entretanto, se o meio de cultivo fosse re-utilizado não haveria necessidade de

adicionar fonte de carbono na forma de sais, o que resultaria em redução de custos do processo.

Figura III.3. Concentração celular máxima (X_m) e pH em função do tempo (dias) para os cultivos realizados co uso de somente NaNO_3 como fonte de nitrogênio, e CO_2 proveniente de fermentação alcoólica (ensaio E: símbolos quadrados e barras cinzas) e CO_2 puro proveniente de cilindro (ensaio C: símbolos quadrados e barras vazios).

De acordo com Cachot, Müller, Pons (1991), o dióxido de carbono proveniente de fermentação alcoólica pode carregar relativamente baixos níveis de compostos voláteis orgânicos (CVO), como propanol, isobutanol, acetaldeído e ácido acético. Matsudo *et al.* (2011) que trabalharam com a mesma cianobactéria em processo contínuo, detectaram, por análise de cromatografia gasosa, CO_2 como o principal composto volátil liberado pela fermentação alcoólica utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, juntamente com pequenas quantidades de etanol e traços de acetaldeído. Deste modo, no presente trabalho, é possível que a cianobactéria tenha assimilado etanol como fonte de carbono, mas, como sugere a análise estatística, se isto realmente ocorreu, foi em quantidade tão pequena que não foi suficiente para aumentar significativamente a concentração celular máxima quando comparada aos ensaios realizados com adição de CO_2 proveniente de cilindro

(Tabela III.3). Isto sugere que o CO₂ resíduo de fermentação alcoólica pode ser utilizado em cultivo de micro-organismos fotossintetizantes, o que contribuiria para a redução do efeito estufa.

Tabela III.3 – Influência da adição de CO₂ proveniente de cilindro ou de fermentação alcoólica sobre os valores médios das respostas: X_m (concentração celular máxima), P_x (produtividade em células), $Y_{X/N}$ (fator de conversão de nitrogênio em células), conteúdos de lipídio e proteína, e os respectivos valores de p obtidos dos cultivos de *A. platensis*.^b

CO ₂	X_m (g L ⁻¹)	P_x (g L ⁻¹ d ⁻¹)	$Y_{X/N}$ (g g ⁻¹)	Lipídio (%)	Proteína (%)
Fermentação alcoólica	4,033 ^A	0,404 ^A	11,6 ^A	9,19 ^A	25,8 ^A
cilindro	4,150 ^A	0,416 ^A	11,9 ^A	8,75 ^A	26,2 ^A
p^a	0,144	0,154	0,212	0,242	0,676

^a De acordo com, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$ (nível de confiança de 95 %).

^b Letras maiúsculas diferentes foram usadas para médias significativamente diferentes, para cada resposta analisada, de acordo com ANOVA.

III.4.2 Efeito da alimentação de nitrogênio

O nitrogênio é o segundo elemento mais importante na composição da biomassa e, para o cultivo comercial desta cianobactéria, os sais de nitrato são a forma geralmente utilizada. Esta escolha é devido ao fácil manuseio e habilidade em garantir elevadas concentrações celulares máximas; entretanto, estas fontes de nitrogênio são, em geral, de alto custo quando comparadas às fontes amoniacais. Estas últimas, em solução, liberam íons amônio que, em condições alcalinas, transformam-se em amônia; portanto, eles são tóxicos em elevadas concentrações (CARVALHO *et al.*, 2004) e, por esta razão, é recomendado que seja fornecida aos cultivos somente a quantidade necessária para o crescimento celular, utilizando o tão conhecido processo descontínuo alimentado (FERREIRA *et al.*, 2010) em vez de uma única adição no início do cultivo, como ocorre nos processos descontínuos. Neste trabalho, a adição simultânea de duas fontes de nitrogênio foi sugerido por

Rodrigues *et al.* (2010) por obterem resultados promissores em fotobiorreatores abertos e utilizando um outro tipo de protocolo de alimentação de nitrogênio.

O efeito dos protocolos de alimentação de nitrogênio foi analisado em termos da concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_x), fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$), e conteúdos de lipídio e proteína (Tabela III.1), que foram as respostas selecionadas. Como é possível observar na Tabela III.4, o conteúdo em lipídio foi a única resposta que não foi estatisticamente influenciada pelos protocolos de adição de nitrogênio.

Tabela III.4 – Influência dos três protocolos de adição de nitrogênio: protocolo I = 25% NaNO_3 e 75% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; protocolo II = 50% NaNO_3 e 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; protocolo III = 75% NaNO_3 e 25% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sobre os valores médios das respostas: X_m (concentração celular máxima), P_x (produtividade em células), $Y_{X/N}$ (fator de conversão de nitrogênio em células), conteúdos de lipídio e proteína e os respectivos valores de p obtidos dos cultivos de *A. platensis*.^b

Protocolo de alimentação de nitrogênio	X_m (g L ⁻¹)	P_x (g L ⁻¹ d ⁻¹)	$Y_{X/N}$ (g g ⁻¹)	Lipídio (%)	Proteína (%)
I	4,543 ^A	0,460 ^A	15,6 ^A	8,39 ^A	18,7 ^A
II	4,106 ^B	0,412 ^B	13,9 ^B	8,72 ^A	26,5 ^B
III	3,826 ^B	0,381 ^B	12,9 ^C	9,52 ^A	29,7 ^B
Somente nitrato	3,891 ^B	0,388 ^B	4,78 ^D	9,26 ^A	29,2 ^B
p^a	0,000	0,000	0,000	0,166	0,000

^a De acordo com, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$ (nível de confiança de 95 %).

^b Letras maiúsculas diferentes foram usadas para médias significativamente diferentes, para cada resposta analisada, de acordo com ANOVA.

O crescimento celular foi estatisticamente maior quando o protocolo I [25 % NaNO_3 e 75 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] foi aplicado, e isto pode ser explicado pelo fato de que micro-organismos fotossintetizantes consomem energia para reduzir nitrato à nitrito e então à amônia, pelo uso das enzimas nitrato e nitrito redutases (HATTORI e MYERS, 1966), respectivamente, antes de absorver esta fonte de nitrogênio na forma de amônia. Portanto, os elevados valores de X_m podem ser relacionados a maior quantidade de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ do protocolo I. Está claro o motivo destes micro-

organismos preferirem sais de amônio como fonte de nitrogênio, quando disponível em níveis não tóxicos (BOUSSIBA, 1989). Como esperado, uma proporção de pequena ou igual quantidade de amônio e grande quantidade de nitrato, dos protocolos de alimentação II e III, e presença de somente nitrato dos ensaios padrão, resultaram em valores de X_m estatisticamente menores que o valores obtidos quando foi aplicado o protocolo I (Tabela III.4).

De acordo com Ohmori; Ohmori; Strotmann (1977), que cultivaram *Anabaena cylindrica*, quando a amônia está disponível no meio de cultivo, esta cianobactéria quase não utiliza nitrato como fonte de nitrogênio até que praticamente toda a amônia seja consumida. Entretanto, neste trabalho, o perfil de consumo de nitrogênio não acompanhou exatamente este comportamento, pois as concentrações de nitrato e amônia reduziram ao mesmo tempo durante o cultivo. A partir desta comparação, é possível dizer que talvez algum mecanismo de indução esteja envolvido na assimilação destas fontes de nitrogênio pelo micro-organismo citado acima. A Figura III.4 mostra um exemplo de consumo de nitrato e amônia (ensaio 2), no qual a amônia foi quase totalmente consumida durante o cultivo, enquanto que o nitrato foi consumido lentamente até o fim do cultivo. Este consumo simultâneo pode ter ocorrido devido às condições dos protocolos de adição de nitrogênio, ou seja, a quantidade de nitrogênio adicionada durante o processo descontínuo alimentado foi exatamente aquela necessária para o crescimento celular ótimo. Portanto, embora ambas as fontes de nitrogênio foram simultaneamente consumidas, a absorção do amônio foi numa velocidade maior, como pode ser visto na Figura III.4.

Figura III.4. Concentrações de nitrato (g L^{-1}) = $\circ$ e amônia (mM) = $\bullet$ em função do tempo (dias) do ensaio 2, realizado com aplicação do protocolo II de alimentação de nitrogênio = 50 % NaNO_3 e 50 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Em relação à produtividade em células, sabendo-se que os ensaios realizados com ambas as fontes de nitrogênio seguiram uma adição pré-determinada, o tempo de cultivo foi o mesmo para todos os ensaios, o que resultou em um comportamento dos valores de P_x semelhante ao comportamento dos valores de X_m . Sendo assim, o valor médio mais baixo de P_x ($0,381 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) foi obtido com o uso do protocolo de alimentação III, seguido pelos protocolos II ($0,412 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) e I ($0,460 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$). Este último valor foi maior que o obtido por Rodrigues *et al.* (2010) para a mesma cepa em tanque aberto, e este resultado confirma a melhor performance do fotobiorreator tubular fechado.

Pelo mesmo motivo, ou seja, uma adição pré-determinada baseada na necessidade do micro-organismo, quanto maior a concentração celular (protocolo I) maior $Y_{X/N}$ (Tabela III.4), o que confirma a preferência da cianobactéria por sais de amônio como fonte de nitrogênio (BOUSSIBA, 1989). Os valores de $Y_{X/N}$ deste trabalho são satisfatórios e similares aos obtidos por Ferreira *et al.* (2010), os quais utilizaram um protocolo de alimentação de nitrogênio diferente e o mesmo micro-organismo. Estes resultados, de forma geral, sugerem que o uso de protocolos

adequados para o fornecimento de nitrogênio resulta em elevados valores de $Y_{X/N}$, e consequentemente, em redução de custos.

Os valores médios de conteúdo em lipídio das células cultivadas neste trabalho (Tabela III.4) estão de acordo com a faixa (6-13%) encontrada na literatura para esta cianobactéria (COHEN, 1997); e, o tipo de protocolo de alimentação de nitrogênio não exerceu nenhum efeito estatisticamente significativo ($p = 0,166$) sobre tal resposta. Já, para o conteúdo em proteínas foi diferente, pois os ensaios realizados com aplicação do protocolo I resultaram em células com conteúdo de proteínas estatisticamente menores (18,7 %) que aqueles obtidos através do uso dos protocolos II e III (26,5 e 29,7%, respectivamente) (Tabela III.4). Tal estímulo da síntese de proteína pelo nitrato já foi observada por Ferreira *et al.* (2010) que utilizaram o mesmo sistema descontínuo alimentado, mas com protocolo de alimentação de nitrogênio diferente.

É preciso notar que a limitação por fósforo pode ser excluída se consideradas as condições adotadas neste trabalho. De fato, a razão dos nutrientes N/P adicionados durante o cultivo (2,99) foi menor que a razão destes nutrientes presentes na biomassa seca de *A. platensis*, o que pode ser estimado a partir da composição elementar relatada por Cornet *et al.* (1992) para este micro-organismo ($CH_{1.650} O_{0.531} N_{0.170} S_{0.007} P_{0.006}$).

Finalmente, estes resultados sugerem, sob estas condições de estresse bioenergético, ou seja, excesso de nitrato e escassez de amônia, o micro-organismo prefere acumular o nitrogênio na forma de proteínas em vez de utilizar para o próprio crescimento.

III.5 CONCLUSÕES

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de três diferentes proporções dos sais nitrato e amônio como fontes de nitrogênio, e duas fontes diferentes de CO_2 (puro proveniente de cilindro ou o resíduo da fermentação alcoólica) sobre a concentração celular máxima (X_m), produtividade em células (P_x), fator de conversão de nitrogênio em células ($Y_{X/N}$), e composição da biomassa (conteúdo de proteínas e lipídios).

O tipo da fonte de CO₂ não exerceu nenhuma influência estatística no crescimento de *A. platensis*, o que indica a possibilidade do uso de CO₂ proveniente de fermentação alcoólica como uma alternativa, pois, além disso, apresenta grande disponibilidade e custo zero como fonte de carbono para os cultivos de cianobactérias. Por outro lado, as respostas selecionadas foram estatisticamente influenciadas pelos protocolos de alimentação de nitrogênio. A melhor combinação de resultados foi obtida com o uso da mistura com a menor quantidade de nitrato em relação à de amônio (protocolo I) ($X_m = 4,543 \text{ g L}^{-1}$; $P_x = 0,460 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$; $Y_{X/N} = 15,6 \text{ g g}^{-1}$; lipídios totais = 8,39%), provavelmente devido à menor demanda bioenergética ao utilizar estas condições. O conteúdo de proteínas mais elevado (26,5 e 29,7%) foi obtido com uso dos outros dois protocolos de alimentação de nitrogênio estudados (protocolos II e III), o que mostrou a preferência do micro-organismo para o acúmulo de nitrogênio na forma de proteína em vez da própria multiplicação.

CAPÍTULO IV

ADSORÇÃO DE Ni^{2+} , Zn^{2+} E Pb^{2+} PELAS BIOMASSAS SECAS DE *Arthrospira (Spirulina) platensis* E *Chlorella vulgaris*. I. SISTEMAS COM UM ÚNICO METAL

Este trabalho foi publicado na revista Chemical Engineering Journal com fator de impacto igual a 3,07. Anexo C.

IV.1 RESUMO

A adsorção de Ni^{2+} , Zn^{2+} ou Pb^{2+} pelas biomassas secas de *Arthrospira (Spirulina) platensis* e *Chlorella vulgaris* foram estudadas em função do tempo de contato e concentração inicial de metal. O ponto isoelétrico calculado para estes bioissorventes (pH = 4,0 e 3,4, respectivamente) e testes de pH adicionais sugeriram o uso de pH na faixa de 5,0-5,5 para os ensaios. As isotermas de equilíbrio foram avaliadas em termos da capacidade de adsorção máxima e afinidade de adsorção. Os modelos cinéticos de primeira e segunda ordem foram utilizados para interpretar os resultados experimentais, e o último modelo foi aquele que melhor descreveu o sistema de adsorção. Ambos os modelos de Freundlich e Langmuir descreveram bem as isotermas de adsorção, o que sugere um mecanismo intermediário de adsorção: mono e multicamada. Comparada com *A. platensis* ($q_e = 0,354$; 0,495 e 0,508 mmol g⁻¹ para Ni^{2+} , Pb^{2+} e Zn^{2+} , respectivamente), *C. vulgaris* se comportou como melhor bioissorvente devido a maior capacidade de adsorção até atingir o equilíbrio ($q_e = 0,495$; 0,634 e 0,664 mmol g⁻¹, respectivamente). A eficiência de remoção do metal diminuiu com o aumento da concentração inicial de metal, o que indica um processo de adsorção passivo, envolvendo os sítios ativos da superfície das biomassas. A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier evidenciou que a remoção dos íons ocorreu principalmente pela interação entre o metal e grupos carboxilatos presentes nas paredes celulares de ambos os micro-organismos.

IV.2 INTRODUÇÃO

A poluição do ar, água e solo com metal pesado é um problema global gerado por indústrias de mineração e refinarias, plantas industriais de processamento de metais e resíduos de incineração. Em particular, níquel, zinco e chumbo constituem fontes poluentes, como exposição à gases de combustão ou a ingestão de compostos destes metais que resultam em sérias disfunções do organismo e podem, permanentemente, afetar animais e seres humanos. O chumbo é altamente hepatotóxico (MUDIPALLI, 2007), o níquel é um agente carcinogênico bem conhecido (SIVULKA, 2005), e o excesso de zinco pode comprometer o crescimento e reprodução (DURUIBE; OGWUEGBU; EGWURUGWU, 2007). Portanto, a presença dos íons destes metais em águas residuais, até mesmo em baixas concentrações, é um perigo para o ecossistema aquático e aumenta os riscos para os seres humanos.

Os métodos mais comumente utilizados para a remoção de metais pesados de águas residuais são troca-iônica, osmose reversa e precipitação química (DABROWSKI *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2008). Embora mais atenção tem sido recentemente dada à adsorção de metais em carbono ativado (ZAINI; AMANO; MACHIDA, 2010), métodos alternativos mais baratos tem sido procurados, e o uso de biomassa natural como adsorvente é economicamente atrativo para este propósito (HAMISSA *et al.*, 2010). A habilidade de remover metais dos micro-organismos, como bactérias, leveduras, fungos, cianobactérias e microalgas, tem sido grandemente investigada (CHOJNACKA, 2010). O mecanismo pelo qual ocorre a ligação dos íons à uma biomassa não é ainda completamente compreendido; entretanto, parece ocorrer por uma adsorção passiva à grupos químicos presentes na superfície do biossorvente, e isto pode variar significativamente dependendo do tipo de material (LODI *et al.*, 2010). Os principais mecanismos responsáveis pela adsorção de íons metálicos são: interação eletrostática à superfície da célula, complexação do íon, e troca iônica. Em particular, os grupos amino e carboxila da superfície celular do adsorvente têm sido relatados por serem eficientes na remoção de íons (BAI e ABRAHAM, 2002; TOBIN e ROUX, 1998).

Arthrospira (Spirulina) platensis e *Chlorella vulgaris* são produzidas para vários usos comerciais e podem ser consideradas biossorventes potenciais para a

remoção de metais pesados. As biomassas secas destes dois micro-organismos têm se mostrado excelentes para remoção de, por exemplo, cromo (FINOCCHIO *et al.*, 2010; GOKHALE; JYOTI; LELE, 2008), cobre (VANNELA e VERMA, 2006) e cádmio (LEE *et al.*, 2009; LODI *et al.*, 2010; ŞEKER *et al.*, 2008). Além disso, trabalhos prévios foram realizados com sucesso ao utilizar biomassas de *A. platensis* ou *C. vulgaris* como bioissorventes de níquel, zinco e chumbo. Como exemplos, Şeker *et al.* (2008) obtiveram 0,62 mmol Ni g⁻¹ e 0,48 mmol Pb g⁻¹ utilizando *A. platensis* como bioissorvente em diferentes temperaturas, enquanto que Aksu (2002) ao utilizarem 10 g L⁻¹ de biomassa de *C. vulgaris*, esta foi capaz de remover entre 0,82 até 1,03 mmol Ni g⁻¹. Apesar de haver uma extensa pesquisa nesta área, um estudo comparativo relacionado ao potencial das biomassas dos dois micro-organismos selecionados para este estudo ainda falta. Até o momento somente uma tentativa foi feita para a comparação destas biomassas como bioissorventes (GOKHALE; JYOTI; LELE, 2008). Desta forma, a principal novidade deste trabalho é o uso de *A. platensis* e *C. vulgaris* como típicas representantes de procarióticos e eucarióticos, com o objetivo de atribuir possíveis diferenças no comportamento de bioissorção para estas células com diferentes tipos de organização.

Para elucidar possíveis mecanismos para a adsorção de metal, a espectroscopia FT-IR tem sido aplicada com sucesso para o estudo de grupos funcionais envolvidos no fenômeno de adsorção e suas interações com os íons (MURPHY; HUGHES; McLOUGHLIN, 2008; ROMERO-GONZÁLEZ; WILLIAMS; GARDINER, 2001; SAWALHA *et al.*, 2007). O estudo da posição e intensidade das principais bandas de infra-vermelho, e suas modificações após a adsorção, fornece informação útil sobre os grupos químicos envolvidos na ligação com os metais (MURPHY; HUGHES; McLOUGHLIN, 2008; PAGNANELLI *et al.*, 2000; SAWALHA *et al.*, 2007). Os grupos químicos envolvidos tem sido carboxila, hidroxila, amino e éter, a maioria dos quais age como trocadores de íons através da liberação de luz dos íons de metais como, Ca²⁺, Na⁺ and Mg²⁺. Os trabalhos recentes mostram que a junção do uso de técnicas espectroscópicas como, espectroscopia eletrônica de raios-X (XPS) e espectroscopia de absorção de raios-X (EXAFS e XANES) têm fornecido maiores informações sobre os principais grupos químicos envolvidos no processo de adsorção. Embora estas técnicas permitam obter informação sobre a

geometria dos metais absorvido por plantas assim como sobre a biorredução, como no caso da adsorção do Cr(VI) e redução das biomassas (GARDEA-TORRESDEY *et al.*, 2005; SHENG *et al.*, 2004; VÁZQUEZ *et al.*, 2009; VIEIRA *et al.*, 2011), o uso de somente espectroscopia foi considerado ser suficiente para os estudos de adsorção com apenas um metal em solução.

O presente trabalho tem o objetivo de avaliar a capacidade de adsorção das biomassas secas de *A. platensis* e *C. vulgaris* na remoção de Ni^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} em soluções aquosas na presença de apenas um metal em concentrações crescentes (0,5-3,0 mM). O estudo de cinética de adsorção foi feito com a aplicação dos modelos de Lagergren (1898) e, Ho e McKay (1999). Os modelos de isotermas de Langmuir (1918) ou Freundlich (1906) foram também utilizados para avaliar os dados do processo de adsorção ao equilíbrio. Além disso, a fim de estudar os grupos funcionais envolvidos na adsorção dos metais, das biomassas ligadas ou não aos metais, foi utilizada a técnica de espectroscopia pela transformada de Fourier.

IV.3 MATERIAIS E MÉTODOS

IV.3.1 Cultivo de microalgas

Arthrospira platensis UTEX1926 (Coleção de cultura da Universidade do Texas, EUA) e *Chlorella vulgaris* CCAP211 (Coleção de cultura de Algas e Protozoa, Argyll, UK) cresceram em fotobiorreator tubular, por processo descontínuo a $82 \pm 5 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ com controle de pH através da adição diária de CO_2 puro. *A. platensis* foi cultivada em meio de cultivo Schl\u00f6sser (1982) a $30 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\text{pH } 9.5 \pm 0.5$, enquanto que *C. vulgaris* cresceu em meio de cultivo Basal de Bold (BISCHOFF e BOLD, 1963) a $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ e $\text{pH } 7,0 \pm 0,5$. Uma vez atingida a fase estacion\u00e1ria de crescimento, ap\u00f3s aproximadamente 10 dias de cultivo para *A. platensis*, e 20 dias para *C. vulgaris*, as c\u00e9lulas foram centrifugadas (centr\u00edfuga ALC 4226, Mil\u00e3o, It\u00e1lia) por 15 minutos a 3500 rpm.

As células recolhidas de *A. platensis* e *C. vulgaris* foram lavadas até atingir pH 7,0, secas a 40 °C por 24 h e trituradas até atingirem pó com uso de peneira com malha de 0,125 mm. As frações menores foram, então, utilizadas para os testes de adsorção.

IV.3.2 Biossorção e procedimentos analíticos

Soluções estoques de 100 mL foram preparadas dissolvendo $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Sigma-Aldrich Co., Milão, Itália) com água deionizada de elevada pureza e estocadas em frascos âmbar a temperatura ambiente (20 ± 1 °C).

Os testes de adsorção foram feitos em frascos Erlenmeyers agitados a 150 rpm, em temperatura ambiente (25 ± 1 °C). As soluções de níquel, zinco e chumbo (100 mL) na presença de concentrações crescentes dos metais (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0 mM) foram colocados em contato com 2 g L⁻¹ de cada biossorbente separadamente. Durante os testes, o pH foi medido com uso de um potenciômetro, modelo pH 211 (Hanna, Milão, Itália) e controlado na faixa 5,0-5,5, através da adição de soluções alcalinas (NaOH) ou ácidas (HNO₃) quando necessário. Amostras (2 mL) foram retiradas em determinados intervalos de tempos (5, 10, 15, 30, 45, 60 e 120 minutos) e filtradas em membranas com 0,45 µm de diâmetro de poro (Millipore, Vimodrone, Itália). O filtrado foi analisado para quantificar o metal em solução, utilizando um espectrômetro de absorção atômica, modelo AA240FS (Varian, Milão, Itália). Todos os testes foram realizados em triplicata, e os resultados foram expressos em valores médios. Os desvios padrões entre os dados e os valores médios nunca excederam 6,4 %; portanto, nenhuma análise estatística foi considerada necessária.

Ambas as biomassas com ou sem o metal adsorvido recuperadas após o término dos testes de adsorção foram centrifugadas (centrífuga modelo ALC 4226, Milão, Itália) por 15 minutos a 3500 rpm, secas a 40°C por 24 horas e novamente pulverizadas para as análises de espectroscopia pela transformada de Fourier.

IV.3.3 Estudos de caracterização

Com o objetivo de selecionar o pH ótimo para realizar a cinética, testes preliminares com pH inicial variando na faixa de 3-6 foram feitos com soluções de metal 1,0 mM e 2 g L⁻¹ de biomassa seca. Adicionalmente, o cálculo do ponto isoelétrico foi determinado por titulações potenciométricas de soluções contendo 5 g L⁻¹ de biomassa em soluções de NaCl de 0,01; 0,10 e 1,0 M, utilizando HCl como titulante (ROMERO-GONZÁLEZ *et al.*, 2005).

Amostras de biomassa antes e após a adsorção de metais foram preparadas para as análises de espectroscopia de infravermelho pela transformada de Fourier pela diluição dos pós das amostras em discos de KBr (1 %, m/m) e analisadas com uso do instrumento Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Fisher, Waltham, MA) equipados com detector DTGS-KBr e aquisição do software OMNICTM. Foram feitas 100 leituras para cada espectro e a resolução foi de 2 cm⁻¹. As amostras da biomassa após a adsorção do metal foram lavadas com água deionizada ou simplesmente secas antes da análise de espectroscopia de infravermelho pela transformada de Fourier. Nenhuma diferença foi notada nos espectros resultantes das análises com ou sem lavagem da biomassa, portanto, neste trabalho foram relatados e discutidos os resultados após a lavagem desta.

IV.3.4 Eficiência e capacidade de adsorção

A capacidade das biomassas de *A. platensis* e *C. vulgaris* como adsorventes foi avaliada em função da capacidade de adsorção ao equilíbrio (q_e) dos resultados experimentais, expressa em mmol g⁻¹:

$$q_e = (C_0 - C_e) \frac{v}{m} \quad (1)$$

onde C_0 e C_e (mM) são as concentrações de metal inicial e no equilíbrio, respectivamente, v (L) é o volume da solução e m (g) é massa seca utilizada.

A eficiência de remoção do metal (Y_R) foi expressa em porcentagem e definida como:

$$Y_R = \left(\frac{C_0 - C_e}{C_0} \right) \times 100 \quad (2)$$

III.3.5 Modelos cinéticos

Os modelos cinéticos de Lagergren (1898) (pseudo primeira ordem) e de Ho e McKay (1999) (pseudo segunda ordem), ambos baseados na capacidade de adsorção sólida, foram utilizados para investigar a cinética de adsorção. O modelo de Lagergren é descrito pela equação:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t \quad (3)$$

onde q_t (mmol g^{-1}) é a capacidade de adsorção num dado tempo e k_1 (min^{-1}) a constante de velocidade de Lagergren.

Enquanto que o modelo de Ho e McKay é descrito pela equação:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_c^2} + \frac{1}{q_c} t \quad (4)$$

onde k_2 ($\text{g mmol}^{-1} \text{min}^{-1}$) é a constante de velocidade de Ho e McKay e q_c o valor teórico da capacidade de adsorção no equilíbrio.

A elaboração de um gráfico de $\ln(q_e - q_t) - \ln(q_e)$ em função do tempo t permitiu estimar k_1 , enquanto que a elaboração de um gráfico de t/q_t em função do tempo t permitiu estimar k_2 e q_c .

IV.3.6 Isotermas de equilíbrio

As isotermas de equilíbrio foram avaliadas com uso de dois modelos: Langmuir (1918) e Freundlich (1906). A equação do primeiro modelo é baseada na suposição de que a superfície do bioissorvente é homogênea, que todos os seus

sítios são idênticos, têm igual afinidade pelo adsorbato, e uma completa monocamada é formada quando a superfície se torna saturada. Sua forma linearizada é:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{K_L q_m} + \frac{1}{q_m} C_e \quad (5)$$

onde q_m (mmol g⁻¹) é a capacidade de adsorção máxima teórica para a formação de uma monocamada completa e K_L (L mmol⁻¹) é a constante de equilíbrio de Langmuir relacionada à afinidade dos sítios de ligação na superfície da célula.

A equação de Freundlich (1906), a qual leva em consideração uma superfície celular heterogênea é dada como:

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \quad (6)$$

onde K_F (mmol^{1-1/n} L^{1/n} g⁻¹) e $1/n$ (dimensionless) são constantes para um dado adsorvente e adsorbato em uma temperatura particular. Estas constantes estão relacionadas com a capacidade e intensidade de adsorção, respectivamente.

Os parâmetros e constantes que aparecem em ambas as equações foram utilizados para fazer uma regressão linear, através de gráficos C_e/q_e em função de C_e para a isoterma de Langmuir e $\log q_e$ em função de $\log C_e$ para a isoterma de Freundlich.

IV.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.4.1 Efeito do pH

Sabe-se que o pH é um fator crítico para a adsorção de íons de metais, tanto devido a sua influência na solubilidade do metal como no grau de dissociação dos grupos funcionais localizados na superfície do adsorvente. Geralmente, a velocidade de adsorção do metal diminui consideravelmente com o aumento da alcalinidade,

principalmente em $\text{pH} > 6,0-7,0$ (VANNELA e VERMA, 2006), devido a precipitação dos íons metálicos como hidróxidos. Em $\text{pH} < 3,0$, os íons hidrogênio competem com os íons metálicos pelos mesmos sítios de adsorção no bioissorvente, comprometendo novamente a adsorção do metal (GONG *et al.*, 2005). Por este motivo existe um pH ótimo para a adsorção de cada metal, geralmente dentro da faixa de $4,0-6,0$, na qual a competição com os íons hidrogênio é minimizada, o que melhoraria a adsorção do metal.

A fim de selecionar uma faixa de pH ótimo para a adsorção do metal, é necessário saber o ponto isoelétrico (pI) do bioissorvente selecionado, ou seja, o valor de pH no qual a superfície do adsorvente apresenta carga igual a zero. Quando o $\text{pH} < \text{pI}$, a superfície do adsorvente se torna carregada positivamente, e a adsorção do metal é inibida, devido a repulsão eletrostática dos íons metálicos e grupos funcionais. Ao contrário, quando $\text{pH} > \text{pI}$, o número de sítios com cargas negativas aumenta na superfície do bioissorvente, e a adsorção do metal é favorecida.

Os valores de pI para *A. platensis* e *C. vulgaris*, estimados pela média aritmética de pK_a e pK_b (Material suplementar 1), foram 4,0 e 3,4, respectivamente. Adicionalmente, testes de adsorção preliminares foram feitos na faixa de pH de $3,0-6,0$, e os resultados, expressos em mmol de metal adsorvido por grama de biomassa, estão apresentados na tabela Material suplementar 2. Estes resultados mostram claramente que o pH ótimo para a adsorção do níquel e zinco está na faixa $5,0-6,0$, enquanto que o chumbo precipitou no limite maior desta faixa (6,0).

Material Suplementar 1 – Valores de pK_a e pK_b em diferentes concentrações de NaCl, e valores de pI estimados para as biomassas secas de *A. platensis* e *C. vulgaris*.

<i>A. platensis</i>				<i>C. vulgaris</i>		
NaCl (M)	pK_a	pK_b	pI	pK_a	pK_b	pI
1,00	4,6	3,6	4,1	4,0	2,9	3,5
0,10	3,9	3,5	3,7	3,9	2,9	3,4
0,01	4,5	3,7	4,1	3,8	2,9	3,4
média			4,0			3,4

Material Suplementar 2 – Resultados da adsorção de Ni^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} em biomassas secas de *Arthrospira (Spirulina) platensis* e *Chlorella vulgaris* em diferentes valores de pH.^a

<i>A. platensis</i>				<i>C. vulgaris</i>		
pH	Ni^{2+}	Zn^{2+}	Pb^{2+}	Ni^{2+}	Zn^{2+}	Pb^{2+}
3,0	0,11	0	0,09	0,08	0	0,19
4,0	0,14	0,21	0,27	0,17	0,16	0,37
5,0	0,17	0,28	0,29	0,24	0,32	0,43
6,0	0,17	0,27	- ^b	0,16	0,31	- ^b

^a Os experimentos foram realizados com soluções de 1 mM, 2 g L⁻¹ de biomassa e os resultados foram expressos em mmol g⁻¹, com valor de remoção teórico máximo de 0,50 mmol g⁻¹.

^b Precipitação do metal antes do teste de adsorção.

Com base nestes resultados, foi escolhido realizar experimentos com pH da solução entre 5,0-5,5 (GONG *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2009; ŞEKER *et al.*, 2008), já que neste intervalo é possível evitar a precipitação do chumbo e, além disso é esperado que haja maior dissociação de grupos funcionais, e, portanto, ligação dos metais à superfície da célula.

IV.4.2 Estudos cinéticos

Os testes de bioadsorção foram realizados com ambas as biomassas com diferentes concentrações de Ni^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} e retirada de amostras até 120 minutos de tempo de contato. Os dados coletados no início de cada experimento foram utilizados para estudos cinéticos, enquanto que aqueles até atingir o equilíbrio foram utilizados para estudos de isoterma.

Os modelos de pseudo primeira ordem (LAGERGREN, 1898) e pseudo segunda ordem (HO e MCKAY, 1999) foram utilizados para avaliar os dados experimentais obtidos. Entretanto, como mostra a Tabela IV.1, somente o último modelo, no qual a capacidade de ligação do metal é supostamente proporcional ao número de sítios ativos ocupados no adsorvente, pareceu representar bem o suficiente a velocidade de adsorção na maioria dos testes; portanto, este foi selecionado como o melhor modelo para representar a adsorção de metais pelas biomassas secas de *A. platensis* e *C. vulgaris*.

Tabela IV.1 – Os parâmetros cinéticos de Ho e McKay obtidos a partir dos ajustes lineares dos dados experimentais da bioadsorção de Ni^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} pelas biomassas secas de *A. platensis* e *C. vulgaris*.

C_0 (mM)	Ni^{2+}			Zn^{2+}			Pb^{2+}		
	q_c^a (mmol g^{-1})	k_2^b (g mmol^{-1} min^{-1})	R^2	q_c^a (mmol g^{-1})	k_2^b (g mmol^{-1} min^{-1})	R^2	q_c^a (mmol g^{-1})	k_2^b (g mmol^{-1} min^{-1})	R^2
<i>A. platensis</i>									
0,5	0,087	2,04	0,997	0,171	5,33	0,999	0,193	5,28	0,999
1,0	0,169	2,19	0,999	0,284	4,25	0,999	0,288	3,42	0,999
1,5	0,239	1,48	0,998	0,334	1,28	0,999	0,358	3,64	0,999
2,0	0,290	1,62	0,999	0,389	1,43	0,994	0,386	2,30	0,999
2,5	0,351	1,37	0,999	0,450	1,07	0,999	0,446	2,41	0,999
3,0	0,361	1,55	0,999	0,516	1,03	0,999	0,491	2,50	0,999
<i>C. vulgaris</i>									
0,5	0,135	3,17	0,999	0,174	5,62	0,999	0,226	6,11	0,999
1,0	0,237	3,34	0,999	0,327	5,10	1,00	0,434	4,45	0,999
1,5	0,320	1,60	0,980	0,413	1,81	0,998	0,533	4,48	1,00
2,0	0,450	1,01	0,999	0,554	2,05	0,999	0,612	2,64	0,999
2,5	0,515	0,663	0,995	0,635	1,94	0,999	0,620	2,50	0,999
3,0	0,499	0,462	0,983	0,669	1,85	0,999	0,635	2,41	0,999

^a q_c – capacidade de adsorção, calculada pela equação de cinética de Ho e McKay.

^b k_2 – constante de velocidade de pseudo segunda ordem, calculada de acordo com a equação cinética de Ho e McKay.

A Figura IV.1 ilustra a aplicação da equação de Ho e McKay (1999) para os resultados de adsorção do Zn^{2+} por *A. platensis* (Figura IV.1A) e *C. vulgaris* (Figura IV.1B), como exemplos. Os valores teóricos da capacidade de adsorção (q_c) calculada por esta equação (Tabela IV.1) mostraram estar de acordo com os valores experimentais (q_e) (Tabela IV.2), além dos valores dos R^2 terem sido excelentes ($0,980 \leq R^2 \leq 1,000$). Para a adsorção do chumbo, a constante de velocidade de pseudo segunda ordem (k_2) diminuiu progressivamente com o aumento da

concentração inicial de metal (C_0) (Tabela IV.1). Maior variação entre os valores de k_2 foi observada com *C. vulgaris* (2,41-6,11 g mmol⁻¹ min⁻¹) quando comparada com *A. platensis* (2,30-5,28 g mmol⁻¹ min⁻¹).

Figura IV.1. Cinética e isothermas da bioissorção de Zn^{2+} em diferentes concentrações iniciais de metal por *A. platensis* and *C. vulgaris*, respectivamente: modelo cinético de Ho e McKay (A e B), modelo da isoterma de Langmuir (C e D), e de Freundlich (E e F).

Tabela IV.2 – Capacidade das biomassas secas de *A. platensis* e *C. vulgaris* como adsorventes em termos de capacidade de adsorção no equilíbrio (q_e) ou eficiência de remoção de metal (Y_R).

C_0 (mM)	Ni^{2+}		Zn^{2+}		Pb^{2+}	
	q_e (mmol g ⁻¹)	Y_R (%)	q_e (mmol g ⁻¹)	Y_R (%)	q_e (mmol g ⁻¹)	Y_R (%)
<i>A. platensis</i>						
0,5	0,088	35,4	0,168	67,3	0,195	78,0
1,0	0,167	33,3	0,285	57,0	0,286	57,2
1,5	0,236	31,4	0,325	43,3	0,353	47,1
2,0	0,285	28,5	0,384	38,4	0,385	38,5
2,5	0,349	27,9	0,443	35,5	0,445	35,6
3,0	0,354	23,6	0,508	33,9	0,495	33,0
<i>C. vulgaris</i>						
0,5	0,136	54,4	0,182	72,6	0,216	86,5
1,0	0,236	47,2	0,324	64,8	0,430	86,0
1,5	0,341	45,5	0,426	56,8	0,532	70,9
2,0	0,436	43,6	0,549	54,9	0,615	61,5
2,5	0,499	39,9	0,633	40,7	0,624	49,9
3,0	0,495	33,0	0,664	44,2	0,634	42,3

Para a adsorção de Zn^{2+} e Ni^{2+} , os valores de k_2 foram muito maiores em baixa concentração inicial de metal ($C_0 \leq 1.0$ mM) quando comparadas às elevadas ($C_0 \geq 1,5$ mM). Pequena diferença foi observada para os valores de k_2 quando $C_0 \geq 1.5$ mM, provavelmente devido à saturação dos sítios de adsorção na superfície da célula. É importante mencionar que *A. platensis* e *C. vulgaris* mostraram comportamentos similares para a adsorção de Zn^{2+} e valores de k_2 , apesar de os bioadsorventes serem essencialmente diferentes. Em contraste, um comportamento diferente para a adsorção de Ni^{2+} foi observado. Outro ponto que merece destaque é que a velocidade de adsorção de Zn^{2+} , quando em baixas concentrações, foi muito maior que a de Ni^{2+} para a biomassa de *A. platensis*, enquanto que testes com $C_0 \geq 1,5$ mM resultaram em valores de k_2 quase coincidentes. Sabendo-se que Ni^{2+} e

Zn^{2+} têm quase a mesma configuração eletrônica externa, é possível dizer que esta diferença dos valores de k_2 foi devido a uma provável maior afinidade da *A. platensis* pelo Zn^{2+} , como será confirmado mais tarde pelos modelos de isotermas.

É possível concluir que, apesar de alguns resultados obtidos com baixas concentrações iniciais de metal, os valores de k_2 respeitaram a seguinte ordem para ambos os bioissorventes: $\text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$, sendo o valor mais elevado (6,11 g $\text{mmol}^{-1} \text{min}^{-1}$) obtido a $C_0 = 0,5 \text{ mM Pb}^{2+}$, e a mais baixa (0,462 g $\text{mmol}^{-1} \text{min}^{-1}$) a $C_0 = 3,0 \text{ mM Ni}^{2+}$, ambos com *C. vulgaris*.

IV.4.3 Capacidade de eficiência de adsorção

A capacidade de adsorção de metais por *A. platensis* e *C. vulgaris* foi avaliada em termos da capacidade adsorção no equilíbrio (q_e) e eficiência de remoção (Y_R), através de testes de adsorção realizados com soluções de 0,5-3,0 mM de Ni^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} . Em geral, para ambos os bioissorventes, q_e aumentou conforme o aumento de C_0 (Figura IV.2), provavelmente devido ao aumento das colisões entre a biomassa e os íons dos metais (GOKHALE; JYOTI; LELE, 2008). Ao contrário do q_e , Y_R diminuiu com o aumento de C_0 (Tabela IV.2), como o resultado provável da diminuição na capacidade de adsorção da biomassa também relacionada a progressiva saturação dos sítios disponíveis para a ligação do metal.

Figura IV.2. Capacidade de adsorção no equilíbrio (q_e) em função da concentração inicial de metal (C_0) para os testes realizados com Pb^{2+} (■ e □), Zn^{2+} (● e ○), e Ni^{2+} (▲ e △), para *A. platensis* e *C. vulgaris*, respectivamente. Condições: Temperatura = 20 °C; pH 5,0-5,5; 2 g L⁻¹ de biomassa.

C. vulgaris provou ser um melhor bioissorvente que *A. platensis*; sua eficiência de remoção máxima, obtida em testes realizados com soluções de 0,5 mM de Ni^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} foram 54,4; 72,6 e 86,5 % respectivamente, enquanto que *A. platensis* atingiu valores de 35,4; 67,3 e 78,0 %, respectivamente. Os valores máximos de q_e foram para os mesmos metais 0,499; 0,664 e 0,634 mmol g^{-1} com *C. vulgaris* e 0,354; 0,508 e 0,495 mmol g^{-1} com *A. platensis*.

A partir destes resultados é possível inferir que ambas as biomassas secas são bioissorventes suficientemente bons para chumbo e zinco, mas não muito bons para o níquel, dadas as condições estabelecidas neste trabalho.

IV.4.4 Isotermas de adsorção

Para o estudo de isotermas de adsorção, os modelos de Langmuir e Freundlich foram aplicados aos dados experimentais no equilíbrio obtidos para a adsorção de Zn^{2+} , Ni^{2+} e Pb^{2+} pelas biomassas de *A. platensis* and *C. vulgaris*. As

Figuras IV.1C e IV.1D ilustram, como exemplo, a aplicação do modelo de Langmuir aos dados de adsorção de Zn^{2+} no equilíbrio utilizando as biomassas de *A. platensis* e *C. vulgaris* como bioissorventes, respectivamente, enquanto que, da mesma forma, as Figuras IV.1E e IV.1F ilustram para o modelo de Freundlich. A Tabela IV.3 mostra os valores das constantes de adsorção calculados por ambos os modelos de isotermas assim como os valores de R^2 . Sabe-se que o modelo de Freundlich é uma relação empírica pela qual supõe-se que a energia de adsorção da ligação do metal ao sítio de um adsorvente depende de quando ou sítios ativos estão ocupados ou não (KRATOCHVIL; PIMENTEL; VOLESKY, 1998). Por outro lado, o modelo de Langmuir é baseado na suposição de que a adsorção máxima ocorre quando a monocamada saturada de moléculas é formada na superfície do adsorvente, a energia de adsorção é constante e não há migração de moléculas de adsorbato na superfície plana (ANCA *et al.*, 2004).

Tabela IV.3 – Parâmetros e constantes de isotermas calculados no equilíbrio pelos modelos de Langmuir e Freundlich para remoção de Ni^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} utilizando biomassas secas de *A. platensis* e *C. vulgaris* como bioissorventes.

	Langmuir			Freundlich		
	q_m (mmol g ⁻¹)	K_L (L mmol ⁻¹)	R^2	K_F (mmol ^{1-1/n} L ^{1/n} g ⁻¹)	n	R^2
<i>A. platensis</i>						
Ni^{2+}	0,740	0,438	0,954	0,215	1,36	0,982
Zn^{2+}	0,604	1,82	0,957	0,367	2,42	0,978
Pb^{2+}	0,546	2,84	0,970	0,380	3,21	0,990
<i>C. vulgaris</i>						
Ni^{2+}	0,823	0,867	0,949	0,366	1,56	0,970
Zn^{2+}	0,918	1,60	0,984	0,546	1,87	0,988
Pb^{2+}	0,668	11,3	0,999	0,614	3,66	0,886

Os R^2 ($0,970 \leq R^2 \leq 0,990$ obtidos pela aplicação do modelo de Freundlich e $0,949 \leq R^2 \leq 0,999$ obtidos pelo modelo de Langmuir) foram suficientemente elevados para sugerir que ambos os modelos foram capazes de descrever bem o

processo de adsorção; portanto, pode-se dizer que a adsorção de metal seguiu um comportamento intermediário entre um mecanismo de adsorção mono- e multicamada.

A constante de Freundlich está relacionada com a capacidade de adsorção do bioissorvente e por este motivo, os valores deste parâmetro na Tabela IV.3 sugerem que, para ambas as biomassas, a adsorção de Pb^{2+} e Zn^{2+} foi relativamente fácil, enquanto que a de Ni^{2+} foi um pouco mais difícil. Além disso, os valores muito elevados de n , obtidos do modelo de Freundlich, sugerem que a bioissorção de todos os íons foi altamente não linear. Sendo n um parâmetro que representa a intensidade de adsorção (AKSU e DÖNMEZ, 2006), pode-se concluir que a intensidade mais elevada foi obtida para a adsorção de Pb^{2+} , isto mostra a grande afinidade de ambas as biomassas para este metal.

De acordo com o modelo de Langmuir, os valores teóricos máximos da capacidade de adsorção (q_m) de *A. platensis* e *C. vulgaris* foram 0,740 e 0,823 mmol g⁻¹ para o Ni^{2+} ; 0,604 e 0,918 mmol g⁻¹ para o Zn^{2+} ; e, 0,546 e 0,668 mmol g⁻¹ para o Pb^{2+} , respectivamente (Tabela IV.3). Como esperado, os valores de q_m , que foram calculados para todas as concentrações de metal, não corresponderam aos valores experimentais (q_e), os quais são específicos para um dado C_0 . Estes resultados são similares àqueles obtidos por outros autores, exceto pequenas variações devido a diferentes condições experimentais (LEE *et al.*, 2009; ŞEKER *et al.*, 2008; VANNELA e VERMA, 2006). Por exemplo, as capacidades de adsorção máxima obtidas neste trabalho para Ni^{2+} e Zn^{2+} são maiores que as encontradas por Klimmek *et al.* (2001) (0,65 e 0,49 mmol g⁻¹, respectivamente), utilizando a cianofícea *Lyngbya taylorii*, a qual se comportou como o melhor bioissorvente dentre as 30 diferentes cianobactérias e microalgas, incluindo três cepas de *A. platensis* e uma de *C. vulgaris*. Por outro lado, o valor de q_m encontrado no presente trabalho para Pb^{2+} foi significativamente menor que aquele observado pelos autores acima (1,47 mmol g⁻¹), o que indica que a adsorção do metal poderia ser fortemente dependente do tipo de cepa.

Os valores da constante de equilíbrio de Langmuir (K_L), a qual está relacionada a afinidade do bioissorvente pelo íon metálico, foram muito elevados especialmente para a adsorção de Pb^{2+} por *C. vulgaris* (11,3 L mmol⁻¹), deste modo confirmando a alta afinidade deste bioissorvente por este metal. Uma afinidade

menor foi observada para o Zn^{2+} ($K_L = 1,60 \text{ L mmol}^{-1}$) e principalmente para o Ni^{2+} ($K_L = 0,867 \text{ L mmol}^{-1}$). Apesar de todos os valores de K_L serem elevados o suficiente para indicar elevada afinidade entre os bioissorventes selecionados e os íons dos metais, a biomassa de *C. vulgaris* apresentou maior afinidade aos metais que a de *A. platensis*.

Concluindo, em geral, ambas as biomassas mostraram uma diminuição da afinidade para os metais, de acordo com a seguinte ordem: $\text{Pb} \gg \text{Zn} > \text{Ni}$. Este comportamento poderia ser devido às diferentes configurações da camada eletrônica mais externa destes metais; ou seja, $[\text{Xe}] 4f^{14} 5d^{10} 6s^2 6p^2$ para o Pb, $[\text{Ar}] 3d^{10} 4s^2$ para Zn e $[\text{Ar}] 3d^8 4s^2$ para o Ni. Pode-se dizer que as diferentes afinidades para estes metais poderiam ter sido o resultado de uma diminuição progressiva no número de elétrons localizados em orbitais muito difusos e distantes (d e f), os quais são mais disponíveis que aqueles mais próximos do núcleo para estabelecer interações atrativas com os adsorventes. Como o raio iônico diminui progressivamente passando de 1,19 Å para Pb^{2+} até 0,74 Å para Zn^{2+} e 0,69 para o Ni^{2+} , estes resultados estão de acordo com as conclusões de Vázquez *et al.* (2002) sobre o aumento progressivo da constante K_F com o raio. Além disso, como já enfatizado por Chong e Volesky (1996) para o sistema ternário Cu/Cd/Zn, o fato de o Ni^{2+} ter o menor raio iônico, mas a maior capacidade de adsorção (Tabela IV.3), indica que a correlação linear entre q_m e o raio iônico, já proposto para *Rhizopus arrhizus* (TOBIN; COOPER; NEUFELD, 1984), não pode ser aplicado para uso de microalgas e cianobactérias como bioissorventes.

IV.4.5 Análise espectroscópica de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise FTIR foi feita para as amostras de biomassas com e sem metal adsorvido com o objetivo de identificar picos característicos associados ao complexo matriz, contendo frações de carboidratos, proteínas e lipídios, assim como grupos funcionais envolvidos na adsorção de metal.

Na região de alta frequência da Figura IV.3, é possível observar no espectro da biomassa de *C. vulgaris* sem metal adsorvido um discreto pico a 3300 cm^{-1} que pode ser atribuído ao grupo NH, e a larga e forte banda localizada por volta de 3420

cm^{-1} . Esta última banda provavelmente resultou da ligação OH de grupos hidroxilas interagindo através pontes de hidrogênio, embora a sobreposição dos sinais de vapor de água adsorvidos sobre a matriz de KBr altamente higroscópica deve ser levada em consideração.

Figura IV.3. Espectro da biomassa de *C. vulgaris* tanto antes (a) como após a adsorção de Ni^{2+} (b), Zn^{2+} (c), Pb^{2+} (d), obtido pela análise espectroscópica de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

As bandas $2955/2871 \text{ cm}^{-1}$ e $2923/2852 \text{ cm}^{-1}$ ocorreram devido aos estiramentos CH simétricos e assimétricos dos grupos CH_3 e CH_2 , respectivamente, pertencendo a cadeias longas metilênicas de frações de lipídios. O pico discreto na região de 3011 cm^{-1} pode ser atribuído ao estiramento $=\text{C}-\text{H}$ nas ligações *cis* $\text{CH}=\text{CH}$, o qual está de acordo com o elevado conteúdo de ácidos graxos insaturados da biomassa de *C. vulgaris* (ZHENG *et al.*, 2011). Corropondentemente, a banda na região 1748 cm^{-1} ocorreu devido ao estiramento $\text{C}=\text{O}$ do grupo éster de triacil ou diacilglicerídios. Bandas fortes na região de 1651 e 1548 cm^{-1} podem ser atribuídas aos modos vibracionais de amida I e amida II, da fração protéica (PISTORIUS; DEGRIP; EGOROVA-ZACHERNYUK, 2009).

A banda na região de 1450 cm^{-1} foi provavelmente associada à deformação dos grupos CH em cadeias longas alquil. Por outro lado, o pico na região 1415 cm^{-1} foi devido ao estiramento simétrico COO^- , cujo forte pico assimétrico foi relatado por

estar na região por volta de 1610 cm^{-1} , deste modo sendo mascarado pela banda amida na região 1650 cm^{-1} . A análise espectroscópica da biomassa de *C. vulgaris* tratada com pH 2,0 mostrou que a banda na região 1415 cm^{-1} quase desapareceu (espectro não mostrado), porque o tratamento ácido reduziu a quantidade de grupos carboxilatos expostos, desta forma confirmando a atribuição proposta.

Vários autores (PISTORIUS; DEGRIP; EGOROVA-ZACHERNYUK, 2009; VOGEL *et al.*, 2010) atribuem a forte banda na região $1235\text{-}1245\text{ cm}^{-1}$ aos estiramentos fosfatos assimétricos, e também ao modo vibracional OCO de grupos ésteres (SAWALHA *et al.*, 2007). As bandas nas regiões 1150 and 1080 cm^{-1} podem ser atribuídas a presença de grupos fosfatos (estiramentos vibracionais PO), enquanto que a banda na região 1050 cm^{-1} pode ser, em grande parte, atribuída à fração de carboidratos (estiramentos CC e CO) (PISTORIUS; DEGRIP; EGOROVA-ZACHERNYUK, 2009).

A comparação das regiões de frequência da biomassa com e sem metal adsorvido permite identificar grupos funcionais relacionados à adsorção de metais. Na Figura IV.3, um geral aumento da intensidade relativa das bandas OH pode ser observado, principalmente no espectro do chumbo adsorvido (maior adsorção). Assim como o estiramento NH foi ligeiramente reduzido, sugerindo uma interação dos íons com os grupos NH através dos pares de elétrons do átomo de nitrogênio. A análise da banda de estiramento muito fraca C=C antes e após a adsorção do metal mostra uma modificação menor somente no caso da biomassa com chumbo adsorvido. Por outro lado, os cátions metálicos poderiam coordenar mais de uma ligação dupla (atuando como espécie ligante) através da ligação π e isto não pode ser descartado.

A diminuição da intensidade relativa das bandas nas regiões 1650 cm^{-1} e 1548 cm^{-1} é visível, particularmente na primeira. Este efeito pode ser observado calculando o valor da razão I_{1650}/I_{1748} , sendo a banda na região 1748 cm^{-1} não perturbada pela interação do metal. Este valor diminuiu da biomassa sem metal adsorvido para a biomassa com metal adsorvido, o que pode ser atribuído à preferência pela interação do cátion com os grupos carboxila (FIGUEIRA; VOLESKY; MATHIEU, 1999; PAN *et al.*, 2006; ROMERO-GONZÁLEZ; WILLIAMS; GARDINER, 2001; SAWALHA *et al.*, 2007; SHENG *et al.*, 2004; XU E LIU, 2008) e amida, caracterizados pela presença de pares de elétrons isolados nos átomos de

oxigênio e nitrogênio. Esta hipótese parece ser confirmada pela diminuição na intensidade da banda amida II. A banda na região 1416 cm^{-1} , a qual corresponde ao estiramento simétrico de carboxilatos, foi ligeiramente reduzida, o que confirma o envolvimento dos grupos carboxilato na adsorção de metal pesado. Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos pela análise de XPS feita por Vázquez *et al.* (2009), salientando o papel do grupo funcional carboxil na adsorção dos cátions pelas biomassas.

Uma mudança na forma ou posição dos grupos fosfato e carboidrato causa uma alteração nas bandas dos espectros como um resultado da adsorção do metal à biomassa, e isto pode ser detectado na subtração dos espectros (dados não mostrados). Possivelmente, estas alterações dos grupos fosfato e hidroxila ocorreram devido a ligação do metal (VOGEL *et al.*, 2010).

Finalmente, uma comparação entre os espectros obtidos da adsorção dos diferentes metais bivalentes (Figura IV.3) não evidenciou nenhuma diferença significativa na natureza dos grupos químicos envolvidos no processo. Possivelmente, no caso da adsorção do chumbo, por ter ocorrido uma redução notável na intensidade dos estiramentos OH, sugere-se que os grupos hidroxilas poderiam estar mais envolvidos na adsorção deste metal.

Em relação aos espectros da biomassa de *A. platensis* sem metal adsorvido (Figura IV.4), os principais picos detectados foram os mesmos descritos para *C. vulgaris* e foram relatados em trabalho prévio (FINOCCHIO *et al.*, 2010) a presença de grupos amida, éster e carboxilato, e resíduos de carboidratos. Na região de alta frequência, as bandas fracas, sobrepostas ao amplo estiramento OH, ocorreram devido aos estiramentos dos grupos NH (3300 cm^{-1}) e CH ($2950\text{-}2850\text{ cm}^{-1}$). É importante notar que não foi detectada nenhuma banda dos grupos insaturados =C-H , e a razão da intensidade entre as bandas dos grupos CH_2 e CH_3 (2926 e 2958 cm^{-1} , respectivamente) foi menor quando comparada a dos espectro de *C. vulgaris*. Tal efeito está relacionado à menor fração de lipídios insaturados na biomassa de *A. platensis* quando comparada à de *C. vulgaris*, assim como ao maior conteúdo de fosfolipídios de cadeia curta para *A. platensis*. Na região de baixa frequência, a banda do estiramento C=O de grupos éster foi detectada como um apoio da principal amida I/ banda do estiramento assimétrico -COO^- (1650 cm^{-1}), enquanto que os estiramentos simétricos COO^- estavam na região 1410 cm^{-1} . Três fortes

picos apareceram nas regiões 1154, 1080 e 1025 cm^{-1} , como de acordo com o que foi observado por Pistorius; Degrip; Egorova-Zachernyuk (2009), resultantes da vibração dos estiramentos CO e CC o que caracterizou a fração de carboidratos. A intensidade destas bandas sugere maior conteúdo de carboidratos na biomassa de *A. platensis* quando comparada a de *C. vulgaris*, o que está de acordo com a presença dos peptidoglicanos na parede celular procariótica da primeira.

Figura IV.4. Espectro da biomassa de *A. platensis* tanto antes (a) como após a adsorção de Ni^{2+} (b), Zn^{2+} (c), Pb^{2+} (d), obtido pela análise espectroscópica de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

Em relação à adsorção de metal pesado, o espectro da biomassa de *A. platensis* (Figura IV.4) mostrou que a intensidade relativa das bandas na região 1650-1410 cm^{-1} diminuiu, indicando que os grupos amida e carboxilato estão envolvidos no processo de adsorção (ROMERO-GONZÁLEZ e WILLIAMS, 2001; VÁSQUEZ *et al.*, 2009). Por outro lado, a região do espectro correspondente aos grupos funcionais carboidrato e fosfato não parecem ter sido significativamente afetados pela adsorção do metal. A análise FTIR não mostrou grandes diferenças entre a adsorção dos diferentes metais para esta cianobactéria.

IV.5 CONCLUSÕES

A adsorção de Ni^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} pelas biomassas de *Arthrospira platensis* e *Chlorella vulgaris* foi grandemente influenciada pela concentração inicial de metal ($C_0 = 0.5\text{-}3.0$ mM). À medida que houve aumento de C_0 , a eficiência de remoção (Y_R) diminuiu, indicando que ocorreu um processo de adsorção passivo envolvendo sítios ativos da biomassa. *C. vulgaris* foi considerada um melhor bioissorvente quando comparada com *A. platensis*, devido aos altos valores de ambos: capacidade de adsorção ao equilíbrio ($q_e = 0,495, 0,664$ e $0,634$ mmol g⁻¹ para Ni^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} , respectivamente) e eficiência de remoção ($Y_R = 54,4, 72,6$ e $86,5$ %, respectivamente). O modelo cinético de Ho e Mckay se adequou de forma excelente aos dados experimentais. Ambos os modelos de equilíbrio Freundlich e Langmuir descreveram bem o processo de adsorção. A análise espectroscópica FT-IR auxiliaram na confirmação dos resultados, salientando os grupos funcionais similares envolvidos nas ligações com os metais pesados. Os grupos caboxilatos foram os principais envolvidos na coordenação e/ou troca iônica dos íons bivalentes, mas também os grupos doadores de elétrons, como, amina e grupos hidroxilas, tiveram um papel no processo de adsorção. Adicionalmente, uma possível interação dos íons do chumbo com as duplas ligações de CC é sugerida para a biomassa de *C. vulgaris*. A próxima etapa será lidar com testes de adsorção na presença simultânea de dois ou três destes metais na mesma solução.

CONCLUSÕES FINAIS

A partir dos resultados apresentados nesta tese de doutorado conclui-se que:

- O tradicional sistema de circulação de células denominado *airlift* pode ser substituído pelos sistemas motobomba (MDPS) e pressurizado (PS) para o cultivo de *Arthrospira platensis* em fotobiorreator tubular e nitrato de sódio como fonte de nitrogênio.
- Dentre as intensidades luminosas testadas neste trabalho, a intensidade de $120 \mu \text{ mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ foi escolhida por resultar na melhor combinação das respostas estudadas para o cultivo de *Arthrospira platensis* em fotobiorreator tubular e nitrato de sódio como fonte de nitrogênio.
- Dentre os protocolos de alimentação simultânea de nitrato de sódio e sulfato de amônio, aplicados por processo descontínuo alimentado em cultivos de *Arthrospira platensis* em fotobiorreator tubular, o protocolo I (proporção de maior quantidade de sulfato de amônio em relação à quantidade de nitrato de sódio) foi o escolhido por apresentar a melhor combinação dos resultados.
- É indicado o uso do resíduo (CO_2) proveniente de fermentação alcoólica, em vez do CO_2 proveniente de cilindro para aplicação em cultivos de *Arthrospira platensis*, devido, principalmente, a redução de custos e auxílio na mitigação dos gases causadores de efeito estufa.
- Ambas as biomassas secas, *A. platensis* e *Chlorella vulgaris*, foram capazes de remover os metais Ni^{2+} , Zn^{2+} e Pb^{2+} em soluções aquosas.
- As biomassas secas, *A. platensis* e *C. vulgaris*, são adsorventes bons para chumbo e zinco, mas não muito bons para o níquel, para as condições estabelecidas neste trabalho.

- À medida que a concentração inicial de metal (C_0) aumenta, a eficiência de remoção (Y_R) do metal pelas biomassas (*Arthrospira platensis* e *Chlorella vulgaris*) diminui.
- *C. vulgaris* foi considerada como melhor adsorvente quando comparada à *A. platensis* devido aos maiores valores de capacidade de adsorção (q_e) e eficiência de remoção (Y_R) calculados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES, DISEASE REGISTRY (ATSDR). **Toxicological Profile for Nickel**. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA, 2005.

AKSU, Z. Determination of the equilibrium, kinetic and thermodynamic parameters of the batch biosorption of nickel(II) ions onto *Chlorella vulgaris*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 89-99, 2002.

AKSU, Z.; DÖNMEZ, G. Binary biosorption of cadmium(II) and nickel(II) onto dried *Chlorella vulgaris*: Co-ion effect on mono-component isotherm parameters. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 860-868, 2006.

ALVES, P.L.C.A.; MAGALHÃES, A.C.N.; BARJA, P.R. The phenomenon of photoinhibition of photosynthesis and its importance in reforestation. **The Botanical Review**, v. 68, p. 193-208, 2002.

ANCA, M.Y.; BAYRAMOGLU, G.; YILMAZ, M.; BEKTAS, S.; GENÇ, Ö. Biosorption of Hg^{2+} , Cd and Zn by Ca-alginate and immobilized wood-rotting fungus *Funalia trogii*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 135, p. 191-199, 2004.

AQUARONE, E. Penicillin and tetracycline as contamination control agents in alcoholic fermentation of sugar cane molasses. **Applied Microbiology**, v. 8, p. 263-268, 1960.

BAI, R.S.; ABRAHAM, T.E. Studies on enhancement of Cr(VI) biosorption by chemically modified biomass of *Rhizopus nigricans*. **Water Research**, v. 36, p. 1224-1236, 2002.

BECKER, E.W. **Microalgae: Biotechnology and Microbiology**. 1ª Ed. Cambridge University Press, 301p., 1994.

BELAY, A. Mass culture of *Spirulina* outdoors - the earthrise farms experience. In: VONSHAK, A., editor, ***Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology***. London: Taylor and Francis; p. 131-158, 1997.

¹De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

BEZERRA, R.P.; MATSUDO, M.C.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J.C.M. Influence of ammonium chloride feeding time and light intensity on the cultivation of *Spirulina (Arthrospira) platensis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, p. 297-305, 2008.

BINAGHI, L.; DEL BORGHI, A.; LODI, A.; CONVERTI, A.; DEL BORGHI, M. Batch and fed-batch uptake of carbon dioxide by *Spirulina platensis*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1341-1346, 2003.

BISCHOFF, H.W.; BOLD, H.C. Phycological Studies IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. The **University of Texas Publication**, v. 6318, p. 1-95, 1963.

BOROWITZKA, M.A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology**, v.70, p. 313-321, 1999.

BOUSSIBA, S. Ammonia uptake in the alkalophilic cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Plant Cell Physiology**, v. 30, p. 303-308, 1989.

CACHOT, T.; MÜLLER, M.; PONS, M. Kinetics of volatile metabolites during alcoholic fermentation of cane molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 450-454, 1991.

CARLOZZI, P.; PINZANI, E. Growth characteristics of *Arthrospira platensis* cultured inside a new closed-coil photobioreactor incorporating a mandrel to control culture temperature. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, p. 675-684, 2005.

CARVALHO, J.C.M.; FRANCISCO, F.R.; ALMEIDA, K.A.; SATO, S.; CONVERTI, A. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* by fed-batch addition of ammonium chloride at exponentially-increasing feeding rate. **Journal of Phycology**, v. 40, p. 589-597, 2004.

CARVALHO J.C.M.; AQUARONE E.; SATO S.; BRAZZACH M.L.; ALMEIDA K.A.; BORZANI W. Influence of exponentially decreasing feeding rates on fed-batch ethanol fermentation of sugar cane blackstrap molasses. **Biotechnology Letters**, v. 12, p. 777-782, 1990.

CASTENHOLZ, R.W. Subsection III, Order Oscillatoriales. In: STANLEY, J.T.; BRYANT, M.P.; PFENNING, N.; HOLT, J.G. ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: William and Wilkins, 1989, v. 3, p. 1771.

CHEN C, MA X, LIU K. Thermogravimetric analysis of microalgae combustion under different oxygen supply concentrations. **Applied Energy**, v. 88, p. 3189-3196, 2011.

CHENG J, ZHANG M, SONG W, XIA A, ZHOU J, CEN K. Cogeneration of hydrogen and methane from *Arthrospira maxima* biomass with bacteria domestication and enzymatic hydrolysis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, p. 1474-1481, 2011.

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

CHOJNACKA, K. Biosorption and bioaccumulation – the prospects for practical applications. **Environment International**, v. 36, p. 299-307, 2010.

CHONG, K.H.; VOLESKY, B. Metal biosorption equilibria in a ternary system. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, p. 629-638, 1996.

CIFERRI, O. *Spirulina*, the Edible Microorganism. **Microbiological Reviews**, v. 47, p. 551-578, 1983.

COHEN, Z. The chemical of *Spirulina*. In: VONSHAK, A., ed. ***Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology***. London: Taylor and Francis, p.175-204, 1997.

CONVERTI, A.; LODI, A.; DEL BORGHI, A.; SOLISIO, C. Cultivation of *Spirulina platensis* in a combined airlift tubular reactor system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 32, p. 13-18, 2006.

CONVERTI, A.; ARNI, S.; SATO, S.; CARVALHO, J.C.M.; AQUARONE, E. Simplified modeling of fed-batch alcoholic fermentation of sugarcane blackstrap molasses. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 84, p. 88-95, 2003.

CORNET, J.F.; DUSSAP, C.G.; CLUZEL, P.; DUBERTRET, G. A structured model for simulation of cultures of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in photobioreactors: II. Identification of kinetic parameters under light and mineral limitations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, p. 826–834, 1992.

DĄBROWSKI, A.; HUBCKI, Z.; PODKOŚCIELNY, P.; ROBENS, E. Selective removal of the heavy metal ions from waters and industrial wastewaters by ion-exchange method. **Chemosphere**, v. 56, p. 91-106, 2004.

DANESI, E.D.G.; RANGEL, C.O.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass & Bioenergy**, v. 26, p. 329-335, 2004.

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

DAS, K.K.; DAS, S.N.; DHUNDASI, S.A. Nickel, its adverse health effects & oxidative stress, **Indian Journal of Medical Research**, v. 128, p. 412–425, 2008.

DE MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. **Journal of Biotechnology**, v. 129, p. 439-445, 2007.

DILLON, J.C.; PHUN, A.P.; DUBACQ, J.P. Nutritional Value of the Alga *Spirulina*. **World Review of Nutrition and Dietetics**, v. 77, p. 32-46, 1995.

DURUIBE, J.O.; OGWUEGBU, M.O.C.; EGWURUGWU, J.N. Heavy metal pollution and human biotoxic effects. **International Journal of Physical Sciences**, v. 2, p. 112-118, 2007.

FAINTUCH, B.L. **Análise comparativa da produção de biomassa a partir de três cianobactérias empregando distintas fontes nitrogenadas**. 1989. Dissertação de mestrado - Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 1989.

FENG, Y.; LI, C.; ZHANG, D. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. **Bioresource Technology**, v.102, p. 101-105, 2011.

FERREIRA, L.S.; RODRIGUES, M.S.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J.C.M. A new approach to ammonium sulphate feeding for fed-batch *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation in tubular photobioreactor. **Biotechnology Progress**, v. 26, p. 1271-1277, 2010.

FERREIRA, L.S.; RODRIGUES, M.S.; CONVERTI A.; SATO S.; CARVALHO J.C.M. Kinetic and growth parameters of *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivated in tubular photobioreactor under different cell circulation systems. **Biotechnology and Bioengineering**, 2011. In press.

FIGUEIRA, M.M.; VOLESKY, B.; MATHIEU, H.J. Instrumental analysis study of iron species biosorption by *Sargassum* biomass. **Environmental Science and Technology**, v. 33, p. 1840-1846, 1999.

FINOCCHIO, E.; LODI, A.; SOLISIO, C.; CONVERTI, A. Chromium (VI) removal by methylated biomass of *Spirulina platensis*. **Chemical Engineering Journal**, v. 156, p. 264-269, 2010.

FORTI, E.; SALOVAARA, S.; CETIN, Y.; BULGHERONI, A.; TESSADRI, R.; JENNINGS, P.; PFALLER, W.; PRIETO, P. In *vitro* evaluation of the toxicity induced by nickel soluble and particulate forms in human airway epithelial cells. **Toxicology in Vitro**, v. 25, p. 454-461, 2011.

FREUNDLICH, H. Über die Adsorption in Lösungen. **Journal of Research in Physical Chemistry and Chemical Physics**, v. 57, p. 385-470, 1906.

GARDEA-TORRESDEY, J.L.; PERALTA-VIDEA, J.R.; DE LA ROSA, G.; PARSONS, J.G. Phytoremediation of heavy metals and study of the metal coordination by X-ray absorption spectroscopy. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 249, p. 1797-1810, 2005.

GAVRILESCU M. Removal of heavy metals from the environment by biosorption. **Engineering in Life Sciences**, v. 4, p. 219-232, 2004.

GOKHALE, S.V.; JYOTI, K.K.; LELE, S.S. Kinetic and equilibrium modeling of chromium (VI) biosorption on fresh and spent *Spirulina platensis/Chlorella vulgaris* biomass. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3600-3608, 2008.

GONG, R.; DING, Y.; LIO, H.; CHEN, Q.; LIU, Z. Lead biosorption and desorption by intact and pretreated *Spirulina maxima* biomass. **Chemosphere**, v. 58, p. 125-130, 2005.

GROBBELAAR, J.U. **Algal nutrition: mineral nutrition**. In: RICHMOND A, editor. Handbook of Microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology. Oxford: Blackwell Science, 2004. p 97-115.

HAMISSA, A.M.B.; LODI, A.; SEFFEN, M.; FINOCCHIO, E.; BOTTER, R.; CONVERTI, A. Sorption of Cd(II) and Pb(II) from aqueous solutions onto *Agave americana* fibers. **Chemical Engineering Journal**, v. 159, p. 67-74, 2010.

HARUN, R.; SINGH, M.; FORDE, G.M.; DANQUAH, M.K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 1037–1047, 2010.

HATTORI, A.; MYERS, J. Reduction of nitrate and nitrite by subcellular preparations of *Anabaena cylindrica*. I. Reduction of nitrite to ammonia. **Journal of Plant Physiology**, v. 41, p. 1031, 1966.

HO, Y.S.; MCKAY, G. Pseudo-second order model for sorption processes. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 451-465, 1999.

JANK, M.S. **A energia da cana pode fortalecer o sistema elétrico**. 2009. Disponível em www.unica.com.br. Acesso em dez.02.2011.

JANSSEN, M.; TRAMPER, J.; MUR, L.R.; WIJFFELS, R.H. Enclosed outdoor photobioreactors: light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, p. 193-210, 2002.

JEEJI BAI, N. Competitive exclusion or morphological transformation? A case study with *Spirulina fusiformis*. **Archives of Hydrobiology**, 71(suppl), Algology Study 38/39, p. 191-199, 1985.

JOHNSON, F.O.; GILBREATH, E.T.; OGDEN, L.; GRAHAM, T.C.; GORHAM S. Reproductive and developmental toxicities of zinc supplemented rats. **Reproductive Toxicology**, v. 31, p. 134-143, 2011.

JOSLYN, M.A. **Methods in food analysis**. 2nd ed. New York: Academic Press; 1970.

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

KAPLAN, D. **Water Pollution and Bioremediation by Microalgae: Absorption and Adsorption of heavy metals by microalgae**. In: RICHMOND A, editor. Handbook of

Microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology. Oxford: Blackwell Science, 2004. p 439-447.

KLIMMEK, S.; STAN, J.; WILKE, A.; BUNKE, G.; BUCHHOLZ, R. Comparative analysis of the biosorption of cadmium, lead, nickel, and zinc by algae. **Environmental Science and Technology**, v. 35, p. 4283-4288, 2001.

KRATOCHVIL, D.; PIMENTEL, P.; VOLESKY, B. Removal of trivalent and hexavalent chromium by seaweed biosorbent. **Environmental Science and Technology**, v. 32, p. 2693–2698, 1998.

LAGERGREN, S. About theory of so-called adsorption of soluble substances. **Kungliga Svenska vetenskapsakademiens handlingar**, v. 24, p. 1-39, 1898.

LANGMUIR, I. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. **Journal of the American Chemical Society**, v. 40, p. 1361-1403, 1918.

LEDUY, A.; THERIEN, N. An improved method for optical density measurement of the semicroscopic blue algae *Spirulina maxima*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 19, p. 1219-1224, 1977.

LEE, J.-Y.; KWON, T.-S.; BAEK, K.; YANG, J.-W. Adsorption characteristics of metal ions by CO₂-fixing *Chlorella* sp. HA-1. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 15, p. 354-358, 2009.

LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Produção de Etanol. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, N. (Coords.) **Biotecnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. Vol. 3. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. P. 1-43.

LIU, F.; ZHANG, G.; MENG, Q.; ZANG, H. Performance of nanofiltration and reverse osmoses membrane in metal effluent treatment. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 16, p. 441-445, 2008.

LIU, Y.; LIU, Y.-J. Biosorption isotherms, kinetics and thermodynamics. **Separation and Purification Technology**, v. 61, p. 229–242, 2008.

LODI, A.; FINOCCHIO, E.; CONVERTI, A.; SOLISIO, C. Removal of bivalent and trivalent ions by *Spirulina platensis* biomass: batch experiments and biosorbent characterization. **International Journal of Environmental Technology and Management**, v. 12, p. 202-213, 2010.

MACEDO, I.C.M.; CORTEZ, L.A.B. O processamento industrial da cana de açúcar no Brasil. In: ROSILLO-CALLE, F.; BAJAY, S.V.; ROTHMAN, H. (Orgs). **Uso da biomassa para produção de energia na indústria brasileira**. Campinas: Editora Unicamp. 2005. P. 247-268.

MAEDA, K.; OWADA, M.; KIMURA, N.; OMATA, K.; KARUBE, J. CO₂ fixation from the flue gas on coal-fired thermal power plant by microalgae. **Energy Conversion and Management**, v. 36, p. 717-720, 1995.

MARKOU, G.; GEORGAKAKIS, D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. **Applied Energy** 2011. In press.

MASOJÍDEK, J.; PAPÁČEK, Š.; SERGEJEVOVÁ, M.; JIRKA, V.; ČERVENÝ, J.; KUNC, J.; KOREČKO, J.; VERBOVIKOVA, O.; KOPECKÝ, J.; ŠTYS, D.; TORZILLO, G. A closed solar photobioreactor for cultivation of microalgae under supra-high irradiance: basic design and performance. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, p. 239-248, 2003.

MATSUDO, M.C.; BEZERRA, R.P.; SATO, S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J.C.M. Repeated fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* using urea as nitrogen source. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, p. 52-57, 2009.

MATSUDO, M.C.; BEZERRA, R.P.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J.C.M. CO₂ from Alcoholic Fermentation for Continuous Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in Tubular Photobioreactor Using Urea as Nitrogen Source. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 03, p. 650-656, 2011.

MOHANTY, P.; SRIVASTAVA, M.; KRISHNA, K.B. **The photosynthetic apparatus of *Spirulina*: electron transport and energy transfer**. In: VONSHAK, A., editor. *Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology*. London: Taylor and Francis. p 17-34, 1997.

MOLINA, E.; FERNÁNDEZ, J.; ACIÉN, F.G.; CHISTI, Y. Tubular photobioreactor design for algal cultures. **Journal of Biotechnology**, v. 92, p. 113-131, 2001.

MUDIPALLI, A. Lead hepatotoxicity & potential health effects. **Indian Journal of Medical Research**, v. 126, p. 518-527, 2007.

MURPHY, V.; HUGHES, H.; MCLOUGHLIN, P. Comparative study of chromium biosorption by red, green and brown seaweed biomass. **Chemosphere**, v. 70, p. 1128-1134, 2008.

OHMORI, M.; OHMORI, K.; STROTMANN, H. Inhibition of nitrate uptake by ammonia in a blue-green alga *Anabaena cylindrica*. **Archives of Microbiology**, v. 114, p. 225-229, 1977.

OLGUÍN, E.J.; GALICIA, S.; HERNÁNDEZ, E.; ÂNGULO, O. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. growth on pig waste. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 19-24, 2001.

OLIVEIRA M, VASCONCELOS Y. Revolução no canavial. **Revista Pesquisa FAPESP**, v. 122, p. 1-6, 2006.

ONCEL, S.; SUKAN, F.V. Comparison of two different pneumatically mixed column photobioreactors for the cultivation of *Arthrospira platensis* (*Spirulina platensis*). **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4755-4760, 2008.

PAGNANELLI, F.; PETRANGELI PAPINI, M.; TRIFONI, M.; VEGLIÒ, F. Biosorption of metal ions on *Arthrobacter* sp.: biomass characterization and biosorption modeling. **Environmental Science and Technology**, v. 34, p. 2773-2778, 2000.

PAN, J.; GE, X.; LIU, R.; TANG, H. Characteristic features of *Bacillus cereus* cell surfaces with biosorption of Pb(II) ions by AFM and FT-IR. **Colloids and Surfaces B - Biointerfaces**, v. 52, p. 89-95, 2006.

PAOLETTI, C.; PUSHPARAJ, B.; TOMASELLI, L. Ricerche sulla nutrizione minerale di *S. platensis*. In: **Atti Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia**, v.17, Padua. Atti. Pádua: Italian Society of Microbiology, 1975, p. 833-839.

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

PIERCE, W.C.; HAENISCH, E.L. **Quantitative Analysis**. 3rd ed. New York: John Wiley & Sons; 1948.

PIRT, S.J.; LEE, Y.K.; WALACH, M.R.; PIRT, M.W.; BALYUZI, H.H.M.; BAZIN, M.J. A tubular bioreactor for photosynthetic production of biomass from carbon dioxide: design and performance. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 33, p. 35-58, 1983.

PISTORIUS, A.M.A.; DEGRIP, W.J.; EGOROVA-ZACHERNYUK, T.A. Monitoring of biomass composition from microbiological sources by means of FT-IR spectroscopy. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, p. 123-129, 2009.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 635-648, 2004.

RAMANATHAN, V.; FENG, Y. Air pollution, greenhouse gases and climate change: Global and regional perspectives. **Atmospheric Environment**, v. 43, p. 37-50, 2009.

RIPPKA, R.; DERUELLES, J.; WATERBURY, J.B.; HERDMAN, M.; STANIER, R.Y. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 111, p. 1-61, 1979.

RODRIGUES, M.S.; FERREIRA, L.S.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J.C.M. Fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4491-4498, 2010.

ROMERO-GONZÁLEZ, J.; GARDEA-TORRESDEY, J.L.; PERALTA-VIDEA, J.R.; RODRÍGUEZ, E. Determination of equilibrium and kinetic parameters of the adsorption of Cr(III) and Cr(VI) from aqueous solutions to *Agave lechuguilla* biomass. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 3, p. 55-68, 2005.

ROMERO-GONZÁLEZ, M.E.; WILLIAMS, C.J.; GARDINER, P.H.E. Study of the mechanisms of cadmium biosorption by dealginated seaweed waste. **Environmental Science and Technology**, v. 35, p. 3025-3030, 2001.

SÁNCHEZ, M.; BERNAL-CASTILLO, J.; ROZO, C.; RODRÍGUEZ, I. *Spirulina (Arthrospira)*: An edible microorganism. A Review. **Revista de la Facultad de Ciencias**, v. 8, n. 1, 2003.

SÁNCHEZ-LUNA, L.D.; BEZERRA, R.P.; MATSUDO, M.C.; SATO, S.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J.C.M. Influence of pH, temperature and urea molar flowrate on

Arthrospira platensis fed-batch cultivation. A kinetic and thermodynamic approach. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 96, p. 702-711, 2007.

SAWALHA, M.F.; PERALTA-VIDEA, J.R.; SAUPE, G.B.; DOKKEN, K.M.; GARDEA-TORRESDEY, J.L. Using FTIR to corroborate the identity of functional groups involved in the binding of Cd and Cr to saltbush (*Atriplex canescens*) biomass. **Chemosphere**, v. 66, p. 1424-1430, 2007.

SCHLÖSSER, U.G. Sammlung von Algenkulturen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v. 95, p. 181-276, 1982.

ŞEKER, A.; SHAHWAN, T.; EROĞLU, A.E.; YILMAZ, S.; DEMIREL, Z.; DALAY, M.C. Equilibrium, thermodynamic and kinetic studies for the biosorption of aqueous lead(II), cadmium(II) and nickel(II) ions on *Spirulina platensis*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 154, p. 973-980, 2008.

SHENG, P.X.; TING, Y.-P.; CHEN, J.P.; HONG, L. Sorption of lead, copper, cadmium, zinc, and nickel by marine algal biomass: characterization of biosorptive capacity and investigation of mechanisms. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 275, p. 131-141, 2004.

SIEGEL, M.H.; ROBINSON, C.W. Applications of Airlift Gas-Liquid-Solid Reactors in Biotechnology. **Chemical Engineering Science**, v. 47, n. 13/14, p. 3215-3229, 1992.

SIERRA, E.; ACIÉN, F.G.; FERNÁNDEZ, J.M.; GARCÍA, J.L.; GONZÁLEZ, C.; MOLINA, E. Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. **Chemical Engineering Journal**, v. 138, p. 136-147, 2008.

SINGH, S.P.; MONTGOMERY, B.L. Determining cell shape: adaptive regulation of cyanobacteria cellular differentiation and morphology. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 6, p. 278-285, 2011.

SIVULKA, D.J. Assessment of respiratory carcinogenicity associated with exposure to metallic nickel: a review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 43, p. 117-133, 2005.

SOBCZUK, T.M.; CAMACHO, F.G.; RUBIO, F.C.; FERNÁNDEZ, F.G.; GRIMA, E.M. Carbon dioxide uptake efficiency by outdoor microalgal cultures in tubular airlift photobioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 67, p. 465-475, 2000.

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

SOLETTO, D.; BINAGHI, L.; FERRARI, L.; LODI, A.; CARVALHO, J.C.M.; ZILLI, M.; CONVERTI, A. Effects of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulse-feeding cultivation of *Spirulina platensis* in helical photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, p. 369-375, 2008.

SOLORZANO, L. Determination of ammonia in natural waters by the phenol hypochlorite method. **Limnology and Oceanography**, v. 14, p. 799-801, 1969.

SOMOGY, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, p. 19-23, 1952.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae, **Journal Bioscience and Bioengineering**, v. 101, p. 87-96, 2006.

SYDNEY, E.B.; STURM, W.; CARVALHO, J.C; THOMAZ-SOCCOL, V.; LARROCHE, C.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Potential carbon dioxide fixation by industrially important microalgae. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5892-6, 2010.

TOBIN, J.M.; COOPER, D.G.; NEUFELD, R.J. Uptake of metal ions by *Rhizopus arrhizus* biomass. **Applied Microbiology**, v. 47, p. 821-824, 1984.

TOBIN, J.M.; ROUX, J.C. Mucor biosorbent for chromium removal from tanning effluent. **Water Research**, v. 32, p. 1407-1416, 1998.

TOMASELLI, L. **The microalgal cell**. In: RICHMOND A, editor. Handbook of Microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology. Oxford: Blackwell Science, 2004. p 3-19.

TORZILLO, G. **Tubular bioreactors**. In: Vonshak A, editor. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor and Francis, 1997. p. 101-115.

TORZILLO, G.; VONSHAK, A. Effect of light and temperature on the photosynthetic activity of cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 6, p. 399-403, 1994.

TRAVIESO, L.; HALL, D.O.; RAO, K.K.; BENÍTEZ, F.; SÁNCHEZ, E.; BORJAC, R. A helical tubular photobioreactor producing *Spirulina* in a semicontinuous mode. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 47, p. 151-155, 2001.

TREDICI, M.R. **Mass Production of Microalgae: Photobioreactors**. In: RICHMOND A, editor. Handbook of Microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology. Oxford: Blackwell Science, 2004. p. 178-214.

TREDICI, M.R.; ZITTELLI, G.C. Efficiency of sunlight utilization: tubular versus flat photobioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, p. 187-197, 1998.

UGWU, C.U.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4021-4028, 2008.

UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO (UNICA). Desenvolvimento ecologicamente correto. www.portalunica.com.br/dadosCotacao/estatistica. Accessed in 10/08/2011.

VANNELA, R.; VERMA, S.K. Co^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} accumulation by cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Biotechnology Progress**, v. 22, p. 1282-1293, 2006.

VÁZQUEZ, G.; CALVO, M.; FREIRE, M.S.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, J.; ANTORRENA, G. Chestnut shell as heavy metal adsorbent: Optimization study of lead, copper and zinc cations removal. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, p. 1402-1414, 2009.

VÁZQUEZ, G.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, J.; FREIRE, S.; LÓPEZ-LORENZO, M.; ANTORRENA, G. Removal of cadmium and mercury ions from aqueous solution by sorption on treated *Pinus pinaster* bark: kinetics and isotherms. **Bioresource Technology**, v. 82, p. 247-251, 2002.

VENKITASAMY, C.; HENDRY, D.; WILKINSON, N.; FERNANDO, L.; JACOBY, W.A. Investigation of thermochemical conversion of biomass in supercritical water using a batch reactor. **Fuel**, v. 90, p. 2662-2670, 2011.

VIEIRA, R.S.; OLIVEIRA, M.L.M.; GUIBAL, E.; RODRÍGUEZ-CASTELLÓN, E.; BEPPU, M.M. Copper, mercury and chromium adsorption on natural and crosslinked chitosan films: An XPS investigation of mechanism. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 374, p. 108-114, 2011.

VOGEL, A.I. **Análise química quantitativa**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Ltda., 1992. 712 p.

VOGEL, M.; GUNTHER, A.; ROSSBERG, A.; LI, B.; BERNHARD, G.; RAFF, J. Biosorption of U(VI) by the green algae *Chlorella vulgaris* in dependence of the pH value and cell activity. **Science of the Total Environment**, v. 409, p. 384-395, 2010.

VONSHAK, A. Outdoor Mass Production of *Spirulina*: The Basic Concept. In: VONSHAK, A., editor, ***Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology***. London: Taylor and Francis; p.79-99, 1997a.

VONSHAK, A. *Spirulina*: Growth, Physiology and Biochemistry. In: VONSHAK, A., ed. ***Spirulina platensis (Arthrospira): physiology, cell-biology and biotechnology***. London: Taylor and Francis, p. 43-66, 1997b.

WATANABE, Y.; HALL, D.O. Photosynthetic production of the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* in a cone-shaped helical tubular photobioreactor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, p. 693-98, 1996.

WANG, B.; LI, Y.; WU, N.; LAN, C.Q. CO₂ bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, p. 707-18, 2008.

WANG, Z.P.; CHEN, S.M.; JIA, X.M.; CUI, H.R.; XU, B.J. The effect of environmental factors and g-rays on the morphology and growth of *Spirulina platensis*. **Journal of Zhejiang Agricultural University**, v. 23, p. 36-40, 1997.

WANG, Z.P.; ZHAO, Y. Morphological reversion of *Spirulina (Arthrospira) platensis* (Cyanophyta): from linear to helical. **Journal of Phycology**, v. 41, p. 622-628, 2005.

WIJFFELS, R.H. Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 26, p. 26-31, 2007.

XU, Y.; ISOM, L.; HANNA, M.A. Adding value to carbon dioxide from ethanol fermentations. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3311-3319, 2010.

XU, H.; LIU, Y. Mechanisms of Cd^{2+} , Cu^{2+} and Ni^{2+} biosorption by aerobic granules. **Separation and Purification Technology**, v. 58, p. 400-411, 2008.

YUAN, X.; KUMAR, A.; SAHU, A.K.; ERGAS, S.J. Impact of ammonia concentration on *Spirulina platensis* growth in an airlift photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3234–3239, 2011.

ZAINI, M.A.A.; AMANO, Y.; MACHIDA, M. Adsorption of heavy metals onto activated carbons derived from polyacrylonitrile fiber. **Journal of Hazardous Materials**, v. 180, p. 552-560, 2010.

ZARROUK, C. **Contribution a l'étude d'une cyanophycee influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance e photosynthese de *Spirulina maxima***. Universite de Paris, Paris, France, p. 4–5, 1966.

ZHENG, H.; YIN, J.; GAO, Z.; HUANG, H.; JI, X.; DOU, C. Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids: a comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v. 164, p. 1215-1224, 2011.

ARTICLE

BIOTECHNOLOGY
and
BIOENGINEERING

Kinetic and Growth Parameters of *Arthrospira (Spirulina) platensis* Cultivated in Tubular Photobioreactor Under Different Cell Circulation Systems

Lívia S. Ferreira,^{1,2} Mayla S. Rodrigues,^{1,2} Attilio Converti,² Sunao Sato,¹ João C.M. Carvalho¹

¹Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 580, Bloco 16, 05508-900 São Paulo-SP, Brazil; telephone: 55-11-30913886; fax: 55-11-38156386; e-mail: jcmcarv@usp.br

²Department of Chemical and Process Engineering "G.B. Bonino", University of Genoa, via Opera Pia 15, 16145, Genoa, Italy

Received 20 June 2011; revision received 5 August 2011; accepted 18 August 2011

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/bit.23315

ABSTRACT: *Arthrospira platensis* was cultivated in tubular photobioreactor in order to evaluate growth and biomass production at variable photosynthetic photon flux density (PPFD = 60, 120, and 240 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) and employing three different systems for cell circulation, specifically an airlift, a motor-driven pumping and a pressurized system. The influence of these two independent variables on the maximum cell concentration (X_m), cell productivity (P_x), nitrogen-to-cell conversion factor ($Y_{X/N}$), photosynthetic efficiency (PE), and biomass composition (total lipids and proteins), taken as responses, was evaluated by analysis of variance. The statistical analysis revealed that the best combination of responses' mean values ($X_m = 4,055 \text{ mg L}^{-1}$, $P_x = 406 \text{ mg L}^{-1}\text{day}^{-1}$, $Y_{X/N} = 5.07 \text{ mg mg}^{-1}$, total lipids = 8.94%, total proteins = 30.3%, PE = 2.04%) was obtained at PPFD = 120 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$; therefore, this light intensity should be considered as the most well-suited for *A. platensis* cultivation in this photobioreactor configuration. The airlift system did not exert any significant positive statistical influence on the responses, which suggests that this traditional cell circulation system could successfully be substituted by the others tested in this work.

Biotechnol. Bioeng. 2011;xxx: xxx–xxx.

© 2011 Wiley Periodicals, Inc.

KEYWORDS: *Arthrospira (Spirulina) platensis*; cell circulation systems; light intensity; tubular photobioreactor

Introduction

Arthrospira (Spirulina) platensis is a filamentous cyanobacterium that has been studied and produced by large factories in large-size countries such as China, India, and the United States, for it presents numerous intracellular compounds of great commercial interest, including high contents of proteins, fatty acids (i.e., γ -linolenic acid), and pigments (chlorophyll *a* and phycocyanin) (Pulz and Gross, 2004).

This cyanobacterium has also been investigated in a bench scale using alkaline culture media with high levels of carbonate and bicarbonate, which are used as carbon sources and whose correct proportions can provide the desired pH value (about 9.5). As the cells multiply, bicarbonate concentration decreases and leads, consequently, to an increase in pH, which has been successfully controlled by supplying CO_2 to maintain this parameter within an optimal range (Binaghi et al., 2003; De Moraes and Costa, 2007; Soletto et al., 2008).

Light intensity should be provided with care to cultivations, since excess light leads to photoinhibition, that is, a reduction in the photosynthesis rate when the cells exceed the light saturation level. This phenomenon occurs usually at high photosynthetic photon flux densities (PPFD), but it can take place even at lower values under suboptimal conditions, for example, at temperature lower than the optimum one for growth (Vonshak, 1997). On the other hand, low PPFD values usually lead to light limited cultivations, characterized by low values of cell concentration (Bezerra et al., 2008). It is interesting to note that the lower the PPFD the higher the PE, that is, photosynthetic microorganisms convert light with higher efficiencies (Wijffels, 2007).

Correspondence to: João C.M. Carvalho

Contract grant sponsor: CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

Light is better captured by cells in tubular photobioreactors when compared to open ones. The former, which are usually made of thin transparent tubes (Ferreira et al., 2010), have in fact high area/volume ratios, whereas in the latter, due to their relatively high depth, the light has to go through thick layers to reach the inner cells (Bezerra et al., 2008; Rodrigues et al., 2010). Although open ponds are mainly used for *A. platensis* commercial production, tubular photobioreactors have been widely studied, not only because of their high cell productivity, but also of many other advantages, such as low levels of contamination and better CO₂ solubilization in the media (Converti et al., 2006; Soletto et al., 2008).

The success of growing photosynthetic microorganisms in tubular reactors also depends on the size of the tubes, culture mixing and cell circulation system (Molina et al., 2001). In particular, the performance of cell circulation systems can be evaluated on the basis of their capacity of air solubilization in the medium, the mixture efficiency (Oncel and Sukan, 2008), the mechanical stress to cell and O₂ concentration (Sierra et al., 2008). Some of them have been studied, such as the use of a peristaltic pump for *Chlorella* sp. cultivation in tubular photobioreactor (Pirt et al., 1983) and a bubble column system for *A. platensis* culture in a closed photobioreactor (Oncel and Sukan, 2008). The most commonly used cell circulation system is the airlift one, whose success is mainly related to its ability to avoid cell damage by mechanical stress, especially in the case of filamentous cyanobacteria (Converti et al., 2006).

The aim of this work was to evaluate the influence of PPFD (60, 120, and 240 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and cell circulation system (airlift, motor-driven pumping, and pressurized system) on *A. platensis* growth in tubular photobioreactor, using as responses: maximum cell concentration, cell productivity, nitrogen-to-cell conversion factor, PE, and biomass composition (protein and lipid) contents.

Materials and Methods

Arthrospira platensis Cultivation

Microorganism, Cultivation Medium, and Inoculum Preparation

Arthrospira platensis UTEX 1926 was cultivated using a standard medium (Schlösser, 1982), containing sodium nitrate as nitrogen source. This medium was used either for the microorganism maintenance or inoculum preparation for all the runs. The inoculum was grown in 500 mL-Erlenmeyer flasks, placed on rotary shaker at 100 min^{-1} , at 30°C and using a photosynthetic photon flux density (PPFD) of 72 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. After 6–8 days of cultivation (Pelizer et al., 2003), the culture was filtered, washed with physiological saline solution and resuspended in sodium nitrate-free cultivation medium. This was the

inoculum for all the runs, which started with a cell concentration of 400 mg L^{-1} (Soletto et al., 2008).

Photobioreactor and Cultivation Conditions

The tubular photobioreactor (Fig. 1) used in this work was developed at the Fermentation Technology Laboratory of the Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology of São Paulo University. It is made of a metal structure surrounded by 40 glass tubes with a 2% (1.15°) inclination, each of them having 0.01 m internal diameter (Carlozzi and Pinzani, 2005), 0.0015 m wall thickness, and 0.5 m length. Light was provided by up to six 20 W fluorescent lamps located in the inside part of the structure, illuminating around 57% of the total working volume. A cylinder glass flask placed on the top of the photobioreactor held part of the culture and worked as a degassing device. The culture flow was set at 0.2 m s^{-1} .

Figure 1. Scheme of the photobioreactor and the three cell circulation systems. (1): degasser; (2): air pump; (3): rotameter; (4): 20 W fluorescent lamps; (5): glass tubes; (6): external silicon tube; (7): motor pump; (8): level sensors; (9): connected air pump; (10): connected solenoid valve. [A] = airlift system; [B] = motor-driven pumping system; [C1] = pressurized system (glass flask on the top); [C2] = pressurized system (glass flask on the bottom).

The pH of the culture medium was controlled at 9.5 ± 0.5 (Sánchez-Luna et al., 2007) by daily addition of CO_2 from a cylinder (Converti et al., 2006), while the temperature was maintained at $29 \pm 1^\circ\text{C}$ (Sánchez-Luna et al., 2007) in a thermostated chamber. The PPFD was regulated at 60, 120, and $240 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Table I) (Ferreira et al., 2010) and measured by an illuminance meter, model LI-250A (LI-COR, Lincoln, NE), at the beginning of each run and at nine different points of the photobioreactor, in order to ensure the selected average PPFD value.

Sodium nitrate was the nitrogen source used in all the runs at a concentration of 2.5 g L^{-1} (Schlösser, 1982). It was added so that its concentration in the medium never was lower than 1 g L^{-1} (Faintuch, 1989) to avoid any nitrogen deficiency.

Cell Circulation Systems

Three cell circulation systems were tested: an airlift (AS), a motor driven pumping (MDPS), and a pressurized one (PS) (Table I, Fig. 1). The airlift system was based on an air pump, model S-6000 (Seven Star Electronics, Hsin Tien, Taiwan), connected at the base of the photobioreactor that propelled cells to circulate clockwise, as in cells moved upwards through an external silicon tube and downwards through the glass tubes. The motor-driven pumping system did not include air to move the cells, for a motor pump, model AE-01-180 (Alife, Nantou, Taiwan), submersed in the culture inside the cylinder glass flask, propelled them to circulate, this time counterclockwise, that is, oppositely to the previous system.

To develop the pressurized system, an additional cylinder glass flask was placed at the bottom of the photobioreactor and linked to a solenoid valve, an air pump and, finally, the last glass tube of the main structure. The upper glass flask

now held two level sensors placed at 6 cm from each other; when culture volume was at level with the lower sensor, the solenoid valve at the base of the photobioreactor allowed air to enter the system. The pressure forced the culture to move upwards through the external silicon tube, thus leading to the filling of the top cylinder glass flask. In doing so, the higher level sensor was reached by culture, and it switched on again the solenoid valve, but this time it deviated air so as to leave the system and allowed the culture to move downwards inside the glass tubes solely by gravitation.

Analytical Methods

Biomass concentration was determined by optical density measurements at 560 nm (Leduy and Therien, 1977), using a calibration curve and a spectrophotometer, model 700 Plus (Femto, São Paulo, Brazil). In cell-free medium samples, the nitrate concentration was quantified according to the methodology described by Vogel (1992). The pH was measured using a potentiometer, model 710-A (Orion, Beverly, MA) and, finally, at the end of all runs, the total protein contents of the dry biomass was determined according to the Kjeldhal method, and the total lipid content by extraction with a chloroform-methanol solution 2:1 (v/v) (Olguín et al., 2001).

Parameters Calculation

The nitrogen-to-cell conversion factor ($Y_{X/N}$) was calculated according to the following equation:

$$Y_{X/N} = \frac{(X_m - X_i)V}{N_t} \quad (1)$$

where X_m and X_i are the maximum and starting cell concentrations (mg L^{-1}), V is the photobioreactor volume (L) and N_t is the total nitrogen amount added (mg).

Table I. Results of the main kinetic, growth and cell composition parameters (X_m , maximum cell concentration; P_x , cell productivity; $Y_{X/N}$, nitrogen-to-cell conversion factor; PE, photosynthetic efficiency; LIP, lipid content; PTN, protein content) of *A. platensis* cultivation in tubular photobioreactor as function of photosynthetic photon flux density (PPFD) and cell circulation system (AS, airlift system; MDPS, motor-driven pumping system; PS, pressurized system).

Runs	PPFD ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	Cell circulation system	X_m (mg L^{-1})	P_x ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$)	$Y_{X/N}$ (mg mg^{-1})	PE (%)	LIP (%)	PTN (%)
1	60	PS	2,907	279	4.46	2.69	9.09	32.5
2	60	PS	2,728	259	3.71	2.59	8.93	31.1
3	60	AS	2,548	239	3.98	2.37	9.31	33.8
4	60	AS	2,285	209	3.48	2.07	9.05	31.6
5	60	MDPS	2,291	270	3.32	2.76	8.26	32.3
6	60	MDPS	2,089	241	3.09	2.99	10.1	33.7
7	120	PS	3,733	370	5.09	1.86	9.61	31.6
8	120	PS	3,760	373	4.81	1.87	8.87	28.2
9	120	AS	4,247	427	5.60	2.11	9.27	28.5
10	120	AS	4,185	421	5.09	2.16	7.89	32.1
11	120	MDPS	4,052	406	4.83	1.98	8.60	29.3
12	120	MDPS	4,353	439	5.01	2.27	9.37	32.0
13	240	PS	3,722	369	4.75	0.90	9.54	23.8
14	240	PS	3,433	337	4.54	0.82	9.35	21.6
15	240	AS	3,785	376	5.04	0.93	7.86	21.0
16	240	AS	4,092	410	5.10	1.03	8.18	21.0
17	240	MDPS	4,098	411	4.98	1.03	8.85	20.9
18	240	MDPS	3,886	387	5.54	0.97	8.83	21.7

The cell productivity (P_X), expressed in $\text{mg L}^{-1} \text{day}^{-1}$, was calculated as the ratio between the total amount of cells produced per unit volume ($X_m - X_i$) and the cultivation time (T_c) (day), according to the equation:

$$P_X = \frac{(X_m - X_i)}{T_c} \quad (2)$$

The PE, expressed in percentage, was calculated as:

$$\text{PE} = \frac{r_G \times H_G}{\text{IPAR}} \times 100 \quad (3)$$

where r_G is the maximum daily biomass growth ($\text{g}_{\text{DW}} \text{day}^{-1}$), H_G is the enthalpy of dry biomass ($21.01 \text{ kJ g}_{\text{DW}}^{-1}$), and IPAR is the input of photosynthetically active radiation, expressed in kJ day^{-1} , using the conversion factor $18.78 \text{ kJ s day}^{-1}$ (Soletto et al., 2008) as well as the PPFD applied in each run.

Statistical Analysis

Comparison of results was made by two-way analysis of variance (ANOVA), performed by the program MINITAB 16, and the statistical significance was evaluated by estimation of the descriptive level (P), being the results considered statistically significant when $P < 0.05$ (confidence level $> 95\%$).

Results and Discussion

Effect of Cell Circulation System

Culture circulation is an important parameter to guarantee cultivations with high cell concentrations and productivities, since it helps the mixing and consequently ensures high light and nutrient availability. Because of this, the first aspect studied in this work was the influence of the cell circulation system on the main kinetic and growth parameters of the culture. To this purpose, three different cell circulation systems were tested, namely AS, MDPS, and PS.

In order to effectively evaluate such an influence, the flowrate used in this work was the same in all cultivations, so as to have almost the same cell stress effect. According to Torzillo (1997), the cell stress does in fact depend mostly on the rate at which cells flow, and the higher the flowrate the greater the damage to cells: whereas a culture flowrate of about 0.3 m s^{-1} was not enough to cause damage to *A. platensis* cells, the cell concentration was reduced by 16% when it was increased to 0.8 m s^{-1} . Moreover, Converti et al. (2006) found, using a similar photobioreactor configuration, that flowrates lower than 0.21 m s^{-1} are suited to prevent excess thricome stress to *A. platensis*. Consistently, a flowrate of 0.20 m s^{-1} proved to be well suited to the photobioreactor structure and the cultivation conditions

applied in this work, for it helped avoiding stably cell deposition inside the glass tubes of the photobioreactor.

The average values obtained for the response variables are satisfactory ($X_m = 3,381\text{--}3,524 \text{ mg L}^{-1}$, $P_X = 331\text{--}359 \text{ mg L}^{-1} \text{day}^{-1}$, $Y_{X/N} = 4.46\text{--}4.72 \text{ mg mg}^{-1}$, $\text{PE} = 1.78\text{--}2.00\%$, lipid content = $8.59\text{--}9.23\%$, and protein content = $28.0\text{--}28.3\%$), being comparable to results of *A. platensis* cultivation in closed photobioreactors in batch and semicontinuous processes (Travieso et al. 2001; Tredici and Zittelli, 1998; Watanabe and Hall, 1996). In Figure 2, the

Figure 2. Average values of cell concentration (and error bars) versus time during all the runs. A: $60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$: runs 1–2 ($\circ$, pressurized system), 3–4 ($\blacktriangle$, airlift system), 5–6 ($\square$, motor driven pumping system). B: $120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$: runs 7–8 ($\circ$, pressurized system), 9–10 ($\blacktriangle$, airlift system), 11–12 ($\square$, motor driven pumping system). C: $240 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$: runs 13–14 ($\circ$, pressurized system), 15–16 ($\blacktriangle$, airlift system), 17–18 ($\square$, motor driven pumping system).

cell growth curves of all the runs are presented to show that even though different cell circulation systems were applied, the behavior of cells during the cultivations was very similar. Although the curves of the runs 7–8 (duplicate) and 13–14 (Fig. 2B and C), carried out using the PS, appear to be slightly lower than the others, the cell concentrations determined along these runs were within the standard deviation and statistically the same when compared to the other systems, so these differences should be disregarded.

These results are better, for instance, than those obtained by Masojidek et al. (2003) with *A. platensis* (X_m of around 2,200 mg L⁻¹) in a tubular loop photobioreactor with temperature control, sun light and a flowrate of 0.2 m s⁻¹ ensured by a peristaltic circulation pump.

The AS is the most common cell circulation system applied to cyanobacteria and microalgae cultivations in closed tubular photobioreactors nowadays (Molina et al., 2001; Oncel and Sukan, 2008; Yuan et al., 2011). Although it seems to be the most suitable for *A. platensis* cultivation, one of the aims of this work was to identify possible alternative recycling systems with comparable costs, but able to ensure additional advantages. The statistical evaluation showed that practically all the responses were not significantly influenced by the types of cell circulation systems studied in this work, except the PE whose *P*-value was 0.018 (Table II). The PE was statistically higher when the MDPS was used for *A. platensis* cultivations and this result suggests that this system can capture the light a little better than the others, maybe due to a better homogenization. These results show that in general, despite the exception, the traditional AS could be successfully substituted by the PS or MDPS ones. This conclusion is of special interest because the MDPS, for example, when compared to AS, is equally easy to build up and is expected to reduce the water loss by evaporation. Besides, as seen previously in materials and methods, the MDPS ensures better CO₂ solubilization, because this system allows the cells to be longer in contact with the gas, thus preventing the CO₂ loss typically observed in AS (Sobczuk et al., 2000).

Effect of Light Intensity

Table I shows the conditions and results of all runs carried out in duplicate, while Figure 2 illustrates some growth

curves behaviors obtained at different light intensities as examples. Average X_m values, obtained independently of the type of cell circulation system, were 2,475, 4,055, and 3,836 mg L⁻¹ at PPFD = 60, 120, and 240 μmol photons m⁻² s⁻¹, respectively (Table III). The runs carried out at 60 μmol photons m⁻² s⁻¹ (Fig. 2A) presented X_m values lower than that ones obtained at PPFD 120 and 240 μmol photons m⁻² s⁻¹ (Fig. 2B and C), which is confirmed by the statistical analysis (Table III). The increase in X_m resulting from the PPFD increase, in this work from 60 to 120 μmol photons m⁻² s⁻¹, was also observed by Bezerra et al. (2008) and Danesi et al. (2004), who cultivated *A. platensis* in open tanks, as well as by Soletto et al. (2008), who cultivated the same cyanobacterium in a tubular helical photobioreactor. This result is consistent with the fact that *A. platensis* is a photosynthetic microorganism that efficiently absorbs light and, by the photosynthesis, transforms this light energy to chemical one in the form of ATP for cell growth (Mohanty et al., 1997). Thus, under conditions of light limitation, as those occurring in such a PPFD range, the higher the light intensity provided to cultivation the higher the final cell concentration.

On the other hand, a further increase in PPFD up to 240 μmol photons m⁻² s⁻¹ led to an average X_m value (3,836 mg L⁻¹) statistically coincident to that at 120 μmol photons m⁻² s⁻¹ (4,055 mg L⁻¹) (Table III, Fig. 2), which suggests that, at the highest PPFD, the *A. platensis* culture was carried out under conditions of photosaturation, that is, of excess light. According to Vonshak (1997), each photosynthetic microorganism has in fact its own threshold value of light intensity to absorb the electromagnetic radiation, and the growth of his *A. platensis* strain was saturated at PPFD > 150–200 μmol photons m⁻² s⁻¹; while, Ferreira et al. (2010) obtained, with another strain, highly productive cultivations at 240 μmol photons m⁻² s⁻¹, indicating that even this PPFD value may be suitable to *A. platensis* growth.

Considering that most runs lasted around the same time (8–9 days), the cell productivity (P_x) exhibited almost the same behavior as X_m , in that its average values obtained at PPFD = 120 and 240 μmol photons m⁻² s⁻¹ (406 and 382 mg L⁻¹ day⁻¹, respectively) were statistically the same (Table III) and significantly higher than at 60 μmol photons m⁻² s⁻¹ (250 mg L⁻¹ day⁻¹). These results suggest

Table II. Mean values of the main kinetic, growth and cell composition parameters (X_m , maximum cell concentration; P_x , cell productivity; $Y_{X/N}$, nitrogen-to-cell conversion factor; PE, photosynthetic efficiency; LIP, lipid content; PTN, protein content) obtained by ANOVA for *A. platensis* cultivation in tubular photobioreactor using three cell circulation systems (AS, airlift system; MDPS, motor-driven pumping system; PS, pressurized system).^{a,b}

Cell circulation system	X_m (mg L ⁻¹)	P_x (mg L ⁻¹ day ⁻¹)	$Y_{X/N}$ (mg mg ⁻¹)	PE (%)	LIP (%)	PTN (%)
AS	3,524 ^A	347 ^A	4.72 ^A	1.78 ^A	8.59 ^A	28.0 ^A
MDPS	3,462 ^A	359 ^A	4.46 ^A	2.00 ^B	9.00 ^A	28.3 ^A
PS	3,381 ^A	331 ^A	4.56 ^A	1.79 ^A	9.23 ^A	28.1 ^A
<i>P</i> -value ^c	0.342	0.076	0.373	0.018	0.237	0.943

^aMean values are the average results of runs carried out using all the three different light intensities.

^bDifferent capital letters were used for means significantly different, for each response analyzed, according to ANOVA.

^c*P*-values (descriptive level) obtained in the two-way analysis of variance (ANOVA), being the results considered statistically significant when *P* < 0.05 (confidence level > 95%).

Table III. Mean values of the main kinetic, growth and cell composition parameters (X_m , maximum cell concentration; P_x , cell productivity; $Y_{X/N}$, nitrogen-to-cell conversion factor; PE, photosynthetic efficiency; LIP, lipid content; PTN, protein content) obtained by ANOVA for *A. platensis* cultivation in tubular photobioreactor using three light intensities (60,120,240 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$).^{a,b}

Light intensity	X_m (mg L ⁻¹)	P_x (mg L ⁻¹ day ⁻¹)	$Y_{X/N}$ (mg mg ⁻¹)	PE (%)	LIP (%)	PTN (%)
60	2,475 ^A	250 ^A	3.67 ^A	2.58 ^A	9.12 ^A	32.5 ^A
120	4,055 ^B	406 ^B	5.07 ^B	2.04 ^B	8.94 ^A	30.3 ^A
240	3,836 ^B	382 ^B	4.99 ^B	0.95 ^C	8.77 ^A	21.7 ^B
<i>P</i> -value ^c	0.000	0.000	0.000	0.000	0.616	0.000

^aMean values are the average results of runs carried out using all the three different light intensities.

^bDifferent capital letters were used for means significantly different, for each response analyzed, according to ANOVA.

^c*P*-values (descriptive level) obtained in the two-way analysis of variance (ANOVA), being the results considered statistically significant when $P < 0.05$ (confidence level > 95%).

that additional effort should be made to search the upper photosaturation threshold for the strain used in this work within the above PPFD range. To provide only some examples, the highest P_x value (439 mg L⁻¹ day⁻¹), obtained in this work in the run 12 at 120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, was only slightly lower than that obtained in a tubular photobioreactor exposed to solar irradiance (500 mg L⁻¹ day⁻¹) (Masojidek et al., 2003), and much higher than those obtained in open tanks (69.9–73.1 mg L⁻¹ day⁻¹) (Danesi et al., 2002; Sánchez-Luna et al., 2007). Such a comparison also highlights the potential that could be harnessed by the industrial use of tubular photobioreactors (Torzillo, 1997).

Since the nitrogen source was the same in all the runs (NaNO₃) and was supplied whenever necessary, so that its concentration in the medium was never lower than 1 g L⁻¹, the $Y_{X/N}$ values should be the same; however, the highest average $Y_{X/N}$ values (5.07 and 4.99 mg mg⁻¹) (Table III) were obtained at 120 and 240 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectively. These results suggest higher nitrogen uptake by the cells in these cultivations, likely related to the need of synthesizing higher content of photosynthetic pigments.

According to Wijffels (2007), the PE is defined as the percentage of energy in the visible light spectrum that is converted into biomass; so, at low light intensities the microalgae and cyanobacteria should convert light with higher efficiency. Accordingly, cultivations carried out in this work at 60, 120, and 240 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ led to average PE values of 2.58%, 2.04%, and 0.95%, respectively ($P = 0.000$) (Table III). Because PE is usually lower than 1% (Richmond et al., 2003), the PE values obtained in this study at 60 and 120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ were satisfactory, whereas, as expected, a large portion of light was lost under conditions of photosaturation (PPFD = 240 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

As far as the effect of light intensity on biomass composition is concerned, although luminance, amongst other environmental factors, is reported to have a great impact on lipid content (Cohen, 1997), the three different PPFD values applied in this work did not exert any statistically significant influence on it ($P = 0.616$) (Table III). The average lipid content from all the runs

(9%) was within the range 6–13% reported as a standard for *A. platensis* (Cohen, 1997). On the other hand, the protein content was statistically dependent on light ($P = 0.000$), being the average value at the highest PPFD (21.7%) statistically lower than those obtained at PPFD = 60 and 120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (32.5% and 30.3%, respectively) (Table III). A variability of biomass composition with light intensity was also observed by Bezerra et al. (2008) for *A. platensis* cultivations in mini-tanks at PPFD = 60–168 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$; however, those authors noted that an increase in this parameter caused a progressive decrease in the protein content that reached an average value (36%) work at an optimum PPFD of 156 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ comparable to that of this work.

In conclusion, since the runs carried out at 60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ exhibited unsatisfactorily low X_m and P_x values, whereas that at 240 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ did not lead to any improvement of cell growth compared to 120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, the last PPFD was considered to ensure the best irradiance conditions for *A. platensis* growth in the tubular photobioreactor configuration proposed here, despite a slightly lower PE. Biomass obtained under these conditions had the average composition: lipid content (8.94%) and protein content (30.3%).

Conclusions

The aim of this study was to evaluate the influence of three cells circulation systems (AS, airlift system; MDPS, motor-driven pumping system; and PS, pressurized system) and three different light intensities (PPFD = 60, 120, and 240 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) on the selected responses: maximum cell concentration (X_m), cell productivity (P_x), nitrogen-to-cell conversion factor ($Y_{X/N}$), PE, and biomass composition (protein and lipid contents).

The cell circulation systems did not exert statistical influence on *A. platensis* growth for almost all the responses studied in this work, from which we can suggest the possibility of using PS and MDPS instead of the traditional AS for indoor cultivation of this cyanobacterium in tubular photobioreactor. On the other hand, the chosen responses

were influenced by light intensity, and the best set of results was obtained using $\text{PPFD} = 120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($X_m = 4,055 \text{ mg L}^{-1}$, $P_x = 406 \text{ mg L}^{-1} \text{ day}^{-1}$, $Y_{X/N} = 5.07 \text{ mg mg}^{-1}$, total lipids = 8.94%, total proteins = 30.3%, 30.3%, PE = 2.04%).

References

- Bezerra RP, Matsudo MC, Converti A, Sato S, Carvalho JCM. 2008. Influence of ammonium chloride feeding time and light intensity on the cultivation of *Spirulina (Arthrospira) platensis*. *Biotechnol Bioeng* 100:297–305.
- Binaghi L, Del Borghi A, Lodi A, Converti A, Del Borghi M. 2003. Batch and fed-batch uptake of carbon dioxide by *Spirulina platensis*. *Process Biochem* 38:1341–1346.
- Carlozzi P, Pinzani E. 2005. Growth characteristics of *Arthrospira platensis* cultured inside a new closed-coil photobioreactor incorporating a mandrel to control culture temperature. *Biotechnol Bioeng* 90:675–684.
- Cohen Z. 1997. The chemicals of *Spirulina*. In: Vonshak A, editor. *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology*. London: Taylor and Francis. p 175–204.
- Converti A, Lodi A, Del Borghi A, Solisio C. 2006. Cultivation of *Spirulina platensis* in a combined airlift tubular reactor system. *Biochem Eng J* 32:13–18.
- Danesi EDG, Rangel-Yagui CO, Carvalho JCM, Sato S. 2002. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass Bioeng* 23:261–269.
- Danesi EDG, Rangel CO, Carvalho JCM, Sato S. 2004. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. *Biomass Bioeng* 26:329–335.
- De Morais MG, Costa JAV. 2007. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. *J Biotechnol* 129:439–445.
- Faintuch BL. 1989. Análise comparativa da produção de biomassa a partir de três cianobactérias empregando distintas fontes nitrogenadas [Master thesis]. São Paulo (SP): São Paulo University.
- Ferreira LS, Rodrigues MS, Converti A, Sato S, Carvalho JCM. 2010. A new approach to ammonium sulphate feeding for fed-batch *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation in tubular photobioreactor. *Biotechnol Progr* 26:1271–1277.
- Leduy A, Therien N. 1977. An improved method for optical density measurement of the semimicroscopic blue algae *Spirulina maxima*. *Biotechnol Bioeng* 19:1219–1224.
- Masojidek J, Papáček Š, Sergejevoá M, Jirka V, Červený J, Kunc J, Korečko J, Verbovikova O, Kopecký J, Štys D, Torzillo G. 2003. A closed solar photobioreactor for cultivation of microalgae under supra-high irradiance: Basic design and performance. *J App Phycol* 15:239–248.
- Mohanty P, Srivastava M, Krishna KB. 1997. The photosynthetic apparatus of *Spirulina*: Electron transport and energy transfer. In: Vonshak A, editor. *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology*. London: Taylor and Francis. p 17–34.
- Molina E, Fernández J, Acien FG, Chisti Y. 2001. Tubular photobioreactor design for algal cultures. *J Biotechnol* 92:113–131.
- Olguin EJ, Galicia S, Hernández E, Angulo O. 2001. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. growth on pig waste. *Bioresour Technol* 77:19–24.
- Oncel S, Sukan FV. 2008. Comparison of two different pneumatically mixed column photobioreactors for the cultivation of *Arthrospira platensis (Spirulina platensis)*. *Bioresour Technol* 99:4755–4760.
- Pelizer LH, Danesi EDG, Rangel CO, Sassano CEN, Carvalho JCM, Sato S, Moraes IO. 2003. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. *J Food Eng* 56:371–375.
- Pirt SJ, Lee YK, Walach MR, Pirt MW, Balyuzi HHM, Bazin MJ. 1983. A tubular bioreactor for photosynthetic production of biomass from carbon dioxide: Design and performance. *J Chem Biotechnol* 33:35–58.
- Pirt SJ, Lee YK, Walach MR, Pirt MW, Balyuzi HHM, Bazin MJ. 1983. A tubular bioreactor for photosynthetic production of biomass from carbon dioxide: Design and performance. *J Chem Biotechnol* 33:35–58.
- Pulz O, Gross W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 65:635–648.
- Richmond A, Cheng-Wu Z, Zarmi Y. 2003. Efficient use of strong light for high photosynthetic productivity: Interrelationships between the optical path, the optimal population density and cell growth inhibition. *Biomol Eng* 20:229–236.
- Rodrigues MS, Ferreira LS, Converti A, Sato S, Carvalho JCM. 2010. Fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: Potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. *Bioresour Technol* 101:4491–4498.
- Sánchez-Luna LD, Bezerra RP, Matsudo MC, Sato S, Converti A, Carvalho JCM. 2007. Influence of pH, temperature and urea molar flowrate on *Arthrospira platensis* fed-batch cultivation. A kinetic and thermodynamic approach. *Biotechnol Bioeng* 96:702–711.
- Schlösser UG. 1982. Sammlung von Algenkulturen. *Ber Dtsch Bot Ges* 95:181–276.
- Sierra E, Acien FG, Fernández JM, García JL, González C, Molina E. 2008. Characterization of a flat plate photobioreactor for the production of microalgae. *Chem Eng J* 138:136–147.
- Sobczuk TM, Camacho FG, Rubio FC, Fernández FG, Grima EM. 2000. Carbon dioxide uptake efficiency by outdoor microalgal cultures in tubular airlift photobioreactors. *Biotechnol Bioeng* 67:465–475.
- Soletto D, Binaghi L, Ferrari L, Lodi A, Carvalho JCM, Zilli M, Converti A. 2008. Effects of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulse-feeding cultivation of *Spirulina platensis* in helical photobioreactor. *Biochem Eng J* 39:369–375.
- Torzillo G. Tubular bioreactors. 1997. In: Vonshak A, editor. *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology*. London: Taylor and Francis. p 101–115.
- Travieso L, Hallb DO, Raob KK, Benítez F, Sánchez E, Borjac R. 2001. A helical tubular photobioreactor producing *Spirulina* in a semicontinuous mode. *Int Biodeter Biodegr* 47:151–155.
- Tredici MR, Zittelli GC. 1998. Efficiency of sunlight utilization: Tubular versus flat photobioreactor. *Biotechnol Bioeng* 57:187–197.
- Vogel AI. 1992. Análise química quantitativa. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Ltda. 712 p.
- Vonshak A. 1997. *Spirulina*: Growth, physiology and biochemistry. In: Vonshak A, editor. *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology*. London: Taylor and Francis. p 43–65.
- Watanabe Y, Hall DO. 1996. Photosynthetic production of the filamentous cyanobacterium *Spirulina platensis* in a cone-shaped helical tubular photobioreactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 44:693–698.
- Wijffels RH. 2007. Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. *Trends Biotechnol* 26:26–31.
- Yuan X, Kumar A, Sahu AK, Ergas SJ. 2011. Impact of ammonia concentration on *Spirulina platensis* growth in an airlift photobioreactor. *Bioresour Technol* 102:3234–3239.

Anexo B – Artigo no prelo apresentado no capítulo III deste trabalho

APEN 2975

24 November 2011

ARTICLE IN PRESS

No. of Pages 8, Model 5G

Applied Energy xxx (2011) xxx–xxx

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Applied Energy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apenergy

Arthrospira (Spirulina) platensis cultivation in tubular photobioreactor: Use of no-cost CO₂ from ethanol fermentation

L.S. Ferreira^{a,b}, M.S. Rodrigues^{a,b}, A. Converti^b, S. Sato^a, J.C.M. Carvalho^{a,*}^a Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 16,

05508-900 São Paulo-SP, Brazil

^b Department of Chemical and Process Engineering "G.B. Bonino", University of Genoa, via Opera Pia 15, 16145 Genoa, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 September 2011

Received in revised form 4 November 2011

Accepted 12 November 2011

Available online xxxxx

Keywords:

*Arthrospira (Spirulina) platensis*CO₂ removal

Ammonium sulfate

Fed-batch process

Tubular photobioreactor

Ethanol fermentation

ABSTRACT

The present study aimed at evaluating the production of *Arthrospira platensis* in tubular photobioreactor using CO₂ from ethanol fermentation. The results of these cultivations were compared to those obtained using CO₂ from cylinder at different protocols of simultaneous ammonium sulfate and sodium nitrate feeding. Maximum cell concentration (X_m), cell productivity (P_x), nitrogen-to-cell conversion factor ($Y_{X/N}$), and biomass composition (total lipids and proteins) were selected as responses and evaluated by analysis of variance. The source of CO₂ did not exert any significant statistical influence on these responses, which means that the flue gas from ethanol fermentation could successfully be used as a carbon source as well as to control the medium pH, thus contributing to reduce the greenhouse effect. The results taken as a whole demonstrated that the best combination of responses mean values ($X_m = 4.543 \text{ g L}^{-1}$; $P_x = 0.460 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$; $Y_{X/N} = 15.6 \text{ g g}^{-1}$; total lipids = 8.39%; total proteins = 18.7%) was obtained using as nitrogen source a mixture of 25% NaNO₃ and 75% (NH₄)₂SO₄, both expressed as nitrogen.

© 2011 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

From the biotechnological viewpoint, *Arthrospira (Spirulina) platensis* is one of the most important cyanobacteria because it is able to produce inside its cells high concentrations of pigments (chlorophyll *a* and phycocyanin), fatty acids (i.e., γ -linolenic acid) and proteins [1,2]. The cultivation of this photosynthetic microorganism largely depends on the availability of light and nutrients, pH, cell density, temperature and eventual contamination by other microorganisms.

One of the main elements for *A. platensis* cultivation is nitrogen, which is supplied using either potassium [3] or sodium [4] nitrates as standard nitrogen sources. Nevertheless, urea and ammonium salts have been successfully used as alternative sources, and were chosen especially because of their low acquisition cost [5]. In addition, this cyanobacterium uptakes nitrogen directly in the form of ammonia [6] when either of these sources is present in the cultivation medium, whereas nitrates require an enzymatic reduction to nitrite and then ammonia, thus consuming energy [7]. When

added in alkaline media, ammonium salts are turned into ammonia, which is volatile and then toxic at high concentrations [8]. For these reasons, in order to reduce ammonia off-gassing, it would be preferable to cultivate *A. platensis* in closed photobioreactors [9,10] by the fed-batch process, in which small amount of this nitrogen source is daily added to cultivations [11]. The addition of only one kind of nitrogen source has been reported up to now by many authors [8–11]; however, Rodrigues et al. [5] have recently applied the combined use of two nitrogen sources, one nitrate and the other ammonia-based, to *A. platensis* cultivation in open tanks, thus ensuring better results in terms of maximum cell concentration and biomass quality when compared to cultivations carried out with only one nitrogen source.

Another important medium component is the carbon source, usually a mixture of carbonate and bicarbonate. High levels of these salts in a favorable ratio can in fact provide, at the same time, an optimum pH value (about 9.5) as well as a large availability of carbon source to *A. platensis* cultivations. During cultivation, photosynthetic cells preferably consume bicarbonate and release carbonate into the medium [12]; this bicarbonate/carbonate imbalance leads to a progressive pH increase that can successfully be avoided by a frequent CO₂ supply, enough to maintain this parameter within an optimal range [10,13]. On a bench-scale level, pH control is usually performed by the addition of pure CO₂ from cylinders, whereas on a large-scale one, the CO₂ contained in industrial gaseous effluents could be used. It is well known that

* Corresponding author. Address: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Cidade Universitária, CEP: 05508-900 São Paulo-SP, Brazil. Tel.: +55 11 30913886; fax: +55 11 38156386.

E-mail addresses: liviaseno@hotmail.com (L.S. Ferreira), mayla.sr@gmail.com (M.S. Rodrigues), converti@unige.it (A. Converti), ssbiotec@usp.br (S. Sato), jcmcdcarv@usp.br (J.C.M. Carvalho).

many industries eliminate this exhaust gases into the atmosphere being co-responsible for the greenhouse effect [14].

An alternative large source of CO₂ is the fermentation plants for bioethanol production, whose number is growing worldwide because ethanol is a renewable and less polluting fuel compared to oil [15]. According to *União da Agroindústria Canavieira de São Paulo* (UNICA) [16], the Brazilian ethanol production was of about 11.5 billion liters in 1990/1991 and 27.5 billion liters in 2008/2009. Taking into account that the production of ethanol and CO₂ is almost the same in terms of mass (0.96 g CO₂/g ethanol), the increase in ethanol production results in a worsening of the CO₂ emission situation. CO₂ fixation has been proposed as a method to remove this gas from the atmosphere, thereby contributing to the reduction of the greenhouse effect [17]. One of its possible applications could be in the production of photosynthetic microorganisms [13], which are able to capture light and fixate CO₂ much more efficiently than plants, and can be grown using a smaller cultivation areas when compared to crops [18]. Particularly, the state of São Paulo is the largest producer of ethanol in Brazil and its production achieved, in 2008/2009, about 17 billion liters [16], which corresponds to about 13 billion kg of CO₂. This huge amount of CO₂ could be profitably used to produce about 7 billion kg of biomass, which may be used to obtain energy through combustion [19], gasification [20] or processes involving anaerobic fermentation for the production of energetic gases such as biohydrogen and biomethane [21].

In this work it was investigated the possibility of using CO₂ from ethanol fermentation and a mixture of two different nitrogen sources, namely NaNO₃ and (NH₄)₂SO₄, to cultivate *A. platensis* in a tubular photobioreactor. To this purpose, nitrate and ammonium salts were fed-batch added in three different ratios, and the cultivation pH was controlled by supplying either the flue gas from alcohol fermentation or pure CO₂ from cylinder. The results were evaluated in terms of maximum cell concentration (X_m), cell productivity (P_x), nitrogen-to-cell conversion factor ($Y_{X/N}$) and biomass composition (protein and lipid contents).

2. Material and methods

2.1. *Arthrospira platensis* cultivation

2.1.1. Microorganism, cultivation medium and inoculum preparation

The strain *Arthrospira platensis* UTEX 1926 was obtained from University of Texas Culture Collection. A standard medium [4] containing sodium nitrate as nitrogen source was used for maintenance and inoculum preparation, whereas runs carried out to investigate the effect of the simultaneous use of sodium nitrate and ammonium sulfate were done so with the same standard medium, but with different NaNO₃/(NH₄)₂SO₄ in different ratios.

The inoculum was grown in 500 mL Erlenmeyer flasks placed on rotary shaker at 100 min⁻¹, 29 ± 1 °C and using a photosynthetic photon flux density (PPFD) of 72 μmol photons m⁻² s⁻¹. After 6–8 days of cultivation [22], the culture was filtered, washed with physiological saline solution to remove adsorbed nitrates, and resuspended in nitrogen-free cultivation medium. Starting cell concentration was set at 400 mg L⁻¹ [10].

2.1.2. Photobioreactor, cultivation conditions and runs

The tubular photobioreactor (Fig. 1) used in this work was developed at the Fermentation Technology Laboratory of the Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology of São Paulo University. It is made of a metal structure surrounded by 40 glass tubes with a 2% (1.15°) inclination, each of them having 0.01 m internal diameter [9], 0.0015 m wall thickness, and 0.5 m length. Light was provided by up to six 20 W-fluorescent lamps

Fig. 1. Scheme of the photobioreactor. (1): Degasser; (2): motor driven pump; (3): 20 W Fluorescent lamps; (4): glass tubes; (5): external silicon tube.

located inside of the structure, illuminating around 57% of the total working volume. A cylinder glass flask placed on the top of the photobioreactor held part of the culture and worked as a degassing device. The culture flow was set at 0.2 m s⁻¹.

The culture pH was controlled at 9.5 ± 0.5 [20] by daily addition of flue gas from ethanol fermentation or pure CO₂ from cylinder, while temperature was maintained at 29 °C ± 1 °C [23] in a thermostatic chamber. The PPFD was set at 120 μmol photons m⁻² s⁻¹ [24] and measured by an luminance meter, model LI-250A (LI-COR, Lincoln, NE, USA), at the beginning of each run and at nine different points of the photobioreactor, in order to ensure the selected average PPFD value. The working volume was 3.5 L and the cell circulation system used in this work was the motor driven-pumping [24].

The experimentation conditions of all runs performed in this work are listed in Table 1 together with the results. Runs C1 and C2, carried out with pure CO₂ (C), and runs E1 and E2, to which ethanol fermentation flue gas (E) was supplied, are standard runs taken as reference that were carried out using only nitrate as nitrogen source. Runs 1–6 and their respective repetitions were performed using mixtures of sodium nitrate and ammonium sulfate at different ratios (see later).

2.1.3. Nitrogen feeding protocols

A reference run was initially carried out at the selected PPFD (120 μmol photons m⁻² s⁻¹) with the addition of sodium nitrate whenever it was necessary, so that its concentration in the medium never went below 1 g L⁻¹ [25]. The resulting growth curve was used to calculate the amount of nitrogen that should be daily added, in the form of ammonium and nitrate salts mixture, to sustain the expected cell growth. Such calculation was based on the supposition that *A. Platensis* nitrogen content is 7% of dry biomass, as previously reported [11].

According to the three selected protocols, all the nitrogen source necessary for cell growth was added in the following ratios, expressed as nitrogen percentages: (I) 25% NaNO₃ and 75% (NH₄)₂SO₄; (II) 50% NaNO₃ and 50% (NH₄)₂SO₄; (III) 75% NaNO₃ and 25% (NH₄)₂SO₄ (Table 2). The sodium nitrate was entirely added at the beginning of the runs, while the ammonium sulfate was pulse-fed every 12 h from the start up to the 8th day of cultivation.

Table 1

Runs and results of X_m (maximum cell concentration), P_x (cell productivity), $Y_{X/N}$ (nitrogen-to-cell conversion factor), lipid and protein contents for *Arthrospira platensis* cultivations in tubular photobioreactor.

Run ^a	CO ₂ source	Nitrogen feeding protocols ^b	X_m (g L ⁻¹)	P_x (g L ⁻¹ d ⁻¹)	$Y_{X/N}$ (g g ⁻¹)	Lipids (%)	Proteins (%)
1	Ethanol fermentation	I	4.392	0.444	15.0	8.90	22.2
1 _r	Ethanol fermentation	I	4.479	0.453	15.3	8.99	17.2
2	Ethanol fermentation	II	3.911	0.390	13.2	9.39	27.0
2 _r	Ethanol fermentation	II	4.118	0.413	14.0	8.05	25.3
3	Ethanol fermentation	III	3.861	0.385	13.0	9.33	28.9
3 _r	Ethanol fermentation	III	3.785	0.376	12.7	9.80	30.3
4	Cylinder	I	4.724	0.480	16.2	7.34	17.1
4 _r	Cylinder	I	4.576	0.464	15.7	8.31	18.1
5	Cylinder	II	4.130	0.414	14.0	9.07	25.2
5 _r	Cylinder	II	4.265	0.429	14.5	8.36	28.4
6	Cylinder	III	3.720	0.369	12.5	8.56	30.5
6 _r	Cylinder	III	3.939	0.393	13.3	10.4	29.0
E	Ethanol fermentation	Only nitrate	4.041	0.405	5.35	9.79	28.2
E _r	Ethanol fermentation	Only nitrate	3.680	0.364	4.61	9.27	27.4
C	Cylinder	Only nitrate	4.038	0.404	4.73	8.60	29.3
C _r	Cylinder	Only nitrate	3.804	0.378	4.42	9.37	32.0

^a r = Repetition.

^b Nitrogen mixture of: protocol I = 25% NaNO₃ and 75% (NH₄)₂SO₄; protocol II = 50% NaNO₃ and 50% (NH₄)₂SO₄; protocol III = 75% NaNO₃ and 25% (NH₄)₂SO₄, expressed in terms of nitrogen.

Table 2

The daily addition of ammonium sulfate and sodium nitrate simultaneously according to the nitrogen feeding protocols: protocol I = 25% NaNO₃ and 75% (NH₄)₂SO₄; protocol II = 50% NaNO₃ and 50% (NH₄)₂SO₄; protocol III = 75% NaNO₃ and 25% (NH₄)₂SO₄, expressed in nitrogen.^a

Time (days)	Cell concentration (mg L ⁻¹)	Nitrogen daily added (mM)	Nitrogen feeding protocol I (runs 1 and 4) (mM)		Nitrogen feeding protocol II (runs 2 and 5) (mM)		Nitrogen feeding protocol III (runs 3 and 6) (mM)	
			Nitrogen from NaNO ₃	Nitrogen from (NH ₄) ₂ SO ₄	Nitrogen from NaNO ₃	Nitrogen from (NH ₄) ₂ SO ₄	Nitrogen from NaNO ₃	Nitrogen from (NH ₄) ₂ SO ₄
0	400	0.72	4.75	0.54	9.51	0.36	14.3	0.18
1	544	1.81	–	1.36	–	0.91	–	0.45
2	907	2.66	–	2.00	–	1.33	–	0.67
3	1439	2.82	–	2.12	–	1.41	–	0.71
4	2003	2.48	–	1.86	–	1.24	–	0.62
5	2500	2.71	–	2.04	–	1.36	–	0.68
6	3042	2.29	–	1.72	–	1.15	–	0.57
7	3501	1.93	–	1.45	–	0.97	–	0.48
8	3887	1.58	–	1.18	–	0.79	–	0.39
9	4202	–	–	–	–	–	–	–
10	4116	–	–	–	–	–	–	–

^a The nitrogen from NaNO₃ was all added at the first cultivation day (zero day) and that from (NH₄)₂SO₄ was added each day at a different concentration, from the 1th until 8th day, according to the standard cultivation carried out using only nitrate as nitrogen source.

2.1.4. Analytical methods

Biomass concentration was determined by optical density measurements at 560 nm [26], using a calibration curve and a spectrophotometer, model 700 Plus (Femto, São Paulo, Brazil). In cell-free medium samples, the following analyses were performed: nitrate concentration according to Vogel [27], total ammonia concentration according to the phenol hypochlorite method [28], and total carbonate according to Pierce and Haenisch [29]. The pH was measured using a potentiometer, model 710-A (Orion, Beverly, MA, USA).

Finally, at the end of all runs, the cells were harvested by centrifugation, washed thrice with distilled water to remove salts and dried at about 55 °C for 12 h. The powdered samples were used in the analysis of total protein contents according to Kjeldhal method, and total lipid content by extraction with a chloroform-methanol solution 2:1 (v/v) [30].

2.1.5. Parameters calculation

The cell productivity (P_x), expressed in g L⁻¹ d⁻¹, was calculated as the ratio between the total amount of cells produced per unit volume ($X_m - X_i$) and the cultivation time (T_c), according to the equation:

$$P_x = \frac{(X_m - X_i)}{T_c} \quad (1)$$

The nitrogen-to-cell conversion factor ($Y_{X/N}$) was calculated according to the following equation:

$$Y_{X/N} = \frac{(X_m - X_i)V}{N_t} \quad (2)$$

where X_m and X_i are the maximum and starting cell concentrations (g L⁻¹), V (L) is the photobioreactor volume and N_t is the total nitrogen amount added.

2.2. *Saccharomyces cerevisiae* cultivation

2.2.1. Microorganism, inoculum preparation and cultivation

The inoculum for alcoholic fermentation was prepared using 1.1 kg of commercial pressed yeast (*S. cerevisiae*) homogenized in 6 L of distilled water, and the mash was prepared by diluting black-strap molasses in distilled water until a concentration of about 220 g L⁻¹ of total reducing sugars (TRS). 500 U L⁻¹ of penicillin [31] and 0.5 g L⁻¹ of urea were added to the mash. Its pH was adjusted at 4.5–5.0 using sulfuric acid or sodium hydroxide as needed [32].

Please cite this article in press as: Ferreira LS et al. *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation in tubular photobioreactor: Use of no-cost CO₂ from ethanol fermentation. Appl Energy (2011), doi:10.1016/j.apenergy.2011.11.019

2.2.2. Alcoholic fermentation bioreactor and conditions

The fermentation runs were carried out in a New Brunswick fermenter at $32 \pm 2^\circ\text{C}$. The impeller speed was 200 min^{-1} , no air was supplied, and the medium pH was not controlled [32]. After the inoculum addition, the impeller speed and temperature were adjusted, and the mash was constantly fed into the reactor at 2.8 L h^{-1} during the first 5 h, when the total volume reached 20 L. The fermentations were kept running for four more hours, until ethanol concentration was constant. Samples were withdrawn at the times 1, 3, 5, 7, 8 and 9 h. Nine fed-batch ethanol fermentations were done to supply the necessary carbon dioxide to *A. platensis* cultivations.

2.2.3. Analytical methods

Biomass concentration was determined by filtering 5 mL samples of the broth through a $1.2\text{ }\mu\text{m}$ Millipore® membrane, after washing with 50 mL of distilled water; they were then dried at about 100°C for 3 h and weighed until to constant weight. Additional 12 mL samples were centrifuged at 3000 rpm for 15 min, and the supernatant was used to analyze sugars and ethanol by Somogy [33] and the dichromate [34] methods, respectively.

2.3. Statistical analysis

Comparison of results was made by the analysis of variance (ANOVA – program MINITAB 16), specifically one-way ANOVA for ethanol fermentation and two-way ANOVA for *A. platensis* cultivations. The statistical significance was evaluated by estimation of the descriptive level (p), being the results considered statistically significant when $p < 0.05$ (confidence level of 95%).

3. Results and discussion

3.1. Effect of CO_2 feeding

The average results of fed-batch ethanol fermentations performed to supply CO_2 to the *A. platensis* cultivation system are

Fig. 2. Cell (A), ethanol and total reducing sugars (B) concentrations as a function of time with the standard deviation for the nine ethanol fermentations carried out in this work.

presented in Fig. 2. During feeding time (first 5 h), the total reducing sugars (TRS) increased up to about 35 g L^{-1} . From the fifth hour, residual TRS concentration of about 5 g L^{-1} was observed, which is common in fermentations carried out using sugar cane molasses as carbon source [32] and, probably, corresponds to non-sugars substances determined as reducing sugars by Somogyi method. The cell concentration decreased from 56.2 to 30.9 g L^{-1} as a consequence of medium addition, while ethanol concentration increased up to 68.8 g L^{-1} at the 7th hour of the run, after the end of mash addition. It is important to notice that all nine ethanol fermentation results were considered statistically equal ($p = 0.998\text{--}1.000$) when analyzed by one-way ANOVA.

The highest ethanol mean production obtained in this work (68.8 g L^{-1}) was higher than that obtained by Converti et al. [35] (58.6 g L^{-1}), who also cultivated commercial yeast, using a fed-batch process for the ethanol production, but adding clarified blackstrap molasses as substrate, using a working volume of 10 L and the filling up time of 7 h. Taking into account that ethanol and CO_2 are produced in equimolar amounts, such a high value of ethanol production pointed out an equally high CO_2 release that was expected to be able to sustain the fed-batch growth of *A. platensis* in the photobioreactor.

The CO_2 , either pure from cylinder or contained in the ethanol fermentation flue gas, was bubbled into the photobioreactor tubes to control the pH at an optimum value (9.5) as well as to act as a carbon source. As already highlighted by Binaghi et al. [12], bicarbonate is the prevalent species of the $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ system at pH 9.6, while at pH 11.3 it is practically absent. This being so, the optimum pH for *A. platensis* growth is around 9.5, because this microorganism consumes preferentially bicarbonate, two moles of which, once transported actively into the cells, are converted into CO_3^{2-} and CO_2 , the latter being used in the photosynthesis and the former released into the medium.

Fig. 3 illustrates the daily pH variation and cell growth of duplicate runs carried out using only nitrate as nitrogen source, taken as examples, and using either pure CO_2 from cylinder (C) or the ethanol fermentation flue gas as a CO_2 source (E). This figure clearly shows that, as expected, the pH increased as the cells multiplied, and that this increment was higher when the cells were in the exp-phase, which is consistent with the well-known quicker cell growth in this phase. The total carbonate concentration (about 9.0 g L^{-1}) kept almost constant during all the runs, thus suggesting that the CO_2 addition was able to replace the consumed carbon source, avoiding, at the same time, any accumulation in the medium. Taking as an example the run 1 (Table 1), whose P_X value was $0.444\text{ g L}^{-1}\text{ d}^{-1}$ and considering that the dry cell weight is constituted by about 50% of carbon [36], we can estimate a carbon

Fig. 3. Maximum cell concentration (X_m) and pH as a function of time (days) for the cultivations carried out using only NaNO_3 as nitrogen source, and flue gas from ethanol fermentation (run E; gray squares and bars) and pure CO_2 from cylinder (run C; empty squares and bars).

Table 3

Influence of the CO₂ from cylinder and ethanol fermentation on mean values of X_m (maximum cell concentration), P_x (cell productivity), $Y_{X/N}$ (nitrogen-to-cell conversion factor), lipid and protein contents and respectively p values obtained from *A. platensis* cultivations.^a

CO ₂	X_m (g L ⁻¹)	P_x (g L ⁻¹ d ⁻¹)	$Y_{X/N}$ (g g ⁻¹)	Lipid (%)	Protein (%)
Ethanol fermentation	4.033 ^A	0.404 ^A	11.6 ^A	9.19 ^A	25.8 ^A
Cylinder	4.150 ^A	0.416 ^A	11.9 ^A	8.75 ^A	26.2 ^A
p^a	0.144	0.154	0.212	0.242	0.676

^a According to ANOVA, the results were considered statistically significant when $p < 0.05$ (confidence level of 95%).

^b Different capital letters were used for means significantly different, for each response analyzed, according to ANOVA.

dioxide necessity of 2.849 g/day for the 3.5 L of culture. Taking into account that cells achieved their maximum concentration within 9 days, the total amount of CO₂ required for their growth was about 26 g, which accounts for approximately 84% of the total carbon dioxide present in the initial Schlösser medium (30.8 g), either in the form of bicarbonate or carbonate. Previous study demonstrated that, if the pH is not regulated, cells stop growing [13], thus justifying the significant daily CO₂ addition required in this work to this purpose. It is worth mentioning that pH correction with CO₂ is preferable to the one with inorganic acid, because it allows preventing a reduction of total carbon along cultivations, which otherwise would lead to carbon shortage [23]. Moreover, bicarbonate and carbonate present in the starting medium at the beginning of runs are not totally consumed by the microorganisms until the end of the cultivations; but, if this medium is reused there is no need to add carbon source, which will result in cost savings to the process.

According to Cachot et al. [37] the carbon dioxide from ethanol fermentation can carry relatively low levels of volatile organic compounds (VOC), as propanol, isobutanol, acetaldehyde and acetic acid. Matsudo et al. [13] who worked with the same cyanobacterium in continuous process, detected, by gas-chromatographic analysis, CO₂ as the main volatile compound released from ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*, together with small amount of ethanol and traces of acetaldehyde. Thus, in the present work, it is possible that the microorganism assimilated ethanol as a carbon source, but, as suggested by the statistical analysis, if so, it occurred to so low extent that was not sufficient to significantly increase the maximum cell concentration when compared to the runs carried out with CO₂ from cylinder (Table 3). This result suggests the use of ethanol fermentation flue gases as no-cost carbon source for the cultivation of photosynthetic microorganisms as a means to mitigate the greenhouse effect.

3.2. Effect of nitrogen feeding

Nitrogen is the second most important element in biomass composition and, in the case of commercial cyanobacteria cultivations, it is usually added in the form of nitrate salts. This choice is dictated by their easy handling and ability to guarantee high maximum cell concentrations; however, these nitrogen sources are in general expensive when compared to ammonium compounds. These last ones, in solution, release ammonium ions that, under alkaline conditions, become ammonia; therefore, they are toxic at high concentrations [8] and, for this reason, it is recommended that only the necessary amount to sustain cell growth should be daily supplied to cultivations by the so-called fed-batch process [11] rather than to be entirely added at the beginning of a batch run. In this work, the simultaneous addition of two nitrogen sources was suggested by the promising results reported by Rodrigues et al. [5] in open photobioreactor and using another kind of nitrogen feeding protocol.

Table 4

Influence of the three nitrogen feeding protocols: protocol I = 25% NaNO₃ and 75% (NH₄)₂SO₄; protocol II = 50% NaNO₃ and 50% (NH₄)₂SO₄; protocol III = 75% NaNO₃ and 25% (NH₄)₂SO₄, on response's mean values of X_m (maximum cell concentration), P_x (cell productivity), $Y_{X/N}$ (nitrogen-to-cell conversion factor), lipid and protein contents and respectively p values obtained from *A. platensis* cultivations.^a

Nitrogen feeding protocol	X_m (g L ⁻¹)	P_x (g L ⁻¹ d ⁻¹)	$Y_{X/N}$ (g g ⁻¹)	Lipid (%)	Protein (%)
I	4.543 ^A	0.460 ^A	15.6 ^A	8.39 ^A	18.7 ^A
II	4.106 ^B	0.412 ^B	13.9 ^B	8.72 ^A	26.5 ^B
III	3.826 ^B	0.381 ^B	12.9 ^C	9.52 ^A	29.7 ^B
Only nitrate	3.891 ^B	0.388 ^B	4.78 ^D	9.26 ^A	29.2 ^B
p^a	0.000	0.000	0.000	0.166	0.000

^a According to ANOVA, the results were considered statistically significant when $p < 0.05$ (confidence level of 95%).

^b Different capital letters were used for means significantly different, for each response analyzed, according to ANOVA.

gues et al. [5] in open photobioreactor and using another kind of nitrogen feeding protocol.

The effect of the nitrogen feeding protocol was analyzed in terms of maximum cell concentration (X_m), cell productivity (P_x), nitrogen-to-cell conversion factor ($Y_{X/N}$), and lipid and protein contents (Table 1), which were selected as responses. As it can be seen in Table 4, the lipid content was the only response that was not statistically influenced by the nitrogen feeding protocol.

Cell growth was statistically higher when the protocol I [25% NaNO₃ and 75% (NH₄)₂SO₄] was applied, which can be explained by the fact that photosynthetic microorganisms consume energy to reduce nitrate to nitrite and then to ammonia, by the enzymes nitrate and nitrite reductases [38], respectively, before uptaking this nitrogen source in the form of ammonia. Therefore, the high X_m values can be ascribed to the higher (NH₄)₂SO₄ amount of protocol I. It is clear why these microorganisms do prefer ammonium salts as nitrogen sources, when available at non-toxic levels [6]. As expected by the lower content of ammonium and higher content of nitrate, the feeding protocols II and III and the standard runs (containing only nitrate) resulted in lower X_m values compared to protocol I (Table 4), though statistically equivalent among them.

According to Ohmori et al. [39], who cultivated *Anabaena cylindrica*, when ammonia is available in the medium, this cyanobacterium almost does not utilize nitrate as nitrogen source until practically all the ammonia has been consumed. However, in the present work, the nitrogen consumption profile did not reflect a so strict selectivity, in that the nitrate and ammonia concentrations decreased at the same time. On the basis of this comparison, one can suspect that some induction mechanism could have been involved in the assimilation of these nitrogen sources by the above microorganism. Fig. 4 shows an example of ammonia and nitrate consumption (run 2), in which ammonia was almost entirely uptaken throughout the cultivation, while nitrate was slowly consumed until the end of cultivation. This simultaneous consumption could have been due to the optimum nitrogen uptake conditions ensured by the feeding protocols, i.e., the amount of nitrogen added through the fed-batch process was exactly the one necessary for the cell growth. So, although both nitrogen sources were simultaneously consumed, ammonium uptake took place at higher rate, as suggested by the higher slope of its curve depicted in Fig. 4.

As far as cell productivity is concerned, since all the runs carried out with both nitrogen sources were done following a pre-fixed nitrogen addition, the cultivation time was the same in all the runs, which resulted in a P_x pattern qualitatively resembling that of X_m . This being so, the lowest mean P_x value (0.381 g L⁻¹ d⁻¹) was obtained applying the feeding protocol III, followed by protocols II (0.412 g L⁻¹ d⁻¹) and I (0.460 g L⁻¹ d⁻¹). This last value was higher than that obtained by Rodrigues et al. [5] for the same strain in

6

L.S. Ferreira et al. / Applied Energy xxx (2011) xxx–xxx

Fig. 4. Concentrations of nitrate (g L^{-1}) = ○ and ammonia (mM) = ● as a function of time (days) for the run 2 carried out using the nitrogen feeding protocol II = 50% NaNO_3 and 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

open tank, and this result confirms the better performance of tubular closed photobioreactors.

Because of the same reason, i.e. a pre-fixed nitrogen addition based on the actual needs of the microorganism, the higher the cell concentration (protocol I), the higher $Y_{X/N}$ (Table 4), which provides a further confirmation of the preference of the cyanobacterium for ammonium salts as nitrogen source [6]. These $Y_{X/N}$ values are satisfactory and similar to those obtained by Ferreira et al. [11] using a different nitrogen feeding protocol for the same microorganism. These results taken as a whole suggest that the use of suited protocols for nitrogen supply is able to ensure high $Y_{X/N}$ values and, consequently, a reduction of costs.

The mean values of lipid content of cells obtained in this work (Table 4) are in accordance to the range (6–13%) found in literature for cyanobacteria [1]; but, the kind of nitrogen feeding protocol did not exert any statistically significant effect ($p = 0.166$) on such a response. On contrary, it did so on the protein content of cells, in that the runs carried out according to protocol I resulted in cells with protein content statistically lower (18.7%) than those obtained through protocol II and III (26.5% and 29.7%, respectively) (Table 4). Such a stimulation of protein synthesis by nitrate was already observed Ferreira et al. [11] for the same system using a different nitrogen feeding protocol.

It should be noticed that we can exclude any phosphorus limitation under the conditions adopted in this work. In fact, the N/P ratio in the nutrients solution added during the cultivation (2.99) was by far lower than that of dry *A. platensis* biomass (12.8), which can be estimated from the elemental composition reported for this microorganism by Cornet et al. [36] ($\text{CH}_{1.650}\text{O}_{0.531}\text{N}_{0.170}\text{S}_{0.007}\text{P}_{0.006}$). Finally these results suggest that, under bioenergetic stress conditions, i.e. nitrate excess and ammonium shortage, the microorganism prefers to accumulate the nitrogen source in the form of proteins rather than to grow.

4. Conclusions

The aim of this study was to evaluate the influence of three different ratios of nitrate and ammonium salts as nitrogen sources and two different sources of CO_2 (pure from cylinder or flue gas from ethanol fermentation) on the maximum cell concentration (X_m), cell productivity (P_x), nitrogen-to-cell conversion factor ($Y_{X/N}$), and biomass composition (protein and lipid contents).

The kind of CO_2 source did not exert any statistical influence on *A. platensis* growth, from which we can suggest the possibility of using the flue gas from ethanol fermentation as an alternative and hugely available no-cost carbon source for cyanobacteria cultivations. On the other hand, the selected responses were statisti-

cally influenced by the nitrogen feeding protocol. The best set of results was obtained when using the nitrogen mixture with the lowest nitrate level (protocol I) ($X_m = 4.543 \text{ g L}^{-1}$; $P_x = 0.460 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$; $Y_{X/N} = 15.6 \text{ g g}^{-1}$; total lipids = 8.39%), likely due to the less bioenergetics requirements under these conditions. On the other hand, the highest content of proteins (26.5% and 29.7%) obtained under these conditions suggests a preference of the microorganism to accumulate the nitrogen source in the form of proteins rather than to grow.

Acknowledgements

The authors thank CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the financial support of this work (Bolsista da CAPES – Proc. No. 0252/10-7).

References

- [1] Cohen Z. The chemicals of *Spirulina*. In: Vonshak A, editor. *Spirulina platensis* (*Arthrospira*): physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor and Francis; 1997. p. 175–204.
- [2] Pulz O, Gross W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004;65:635–48.
- [3] Paoletti C, Pushpaj B, Tomaselli Feroci L. Ricerche sulla nutrizione minerale di *Spirulina platensis*. In: Atti del XVII Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Padua, Italy: Italian Society of Microbiology; 1975. p. 833–9.
- [4] Schüssler UG. Sammlung von Algenkulturen. *Ber Dtsch Bot Ges* 1982;95:181–276.
- [5] Rodrigues MS, Ferreira LS, Converti A, Sato S, Carvalho JCM. Fed-batch cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*: potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. *Bioresour Technol* 2010;101:4491–8.
- [6] Boushiba S. Ammonia uptake in the alkalophilic cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Plant Cell Physiol* 1989;30:303–8.
- [7] Markou G, Georgakakis D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Appl Energ*, in press.
- [8] Carvalho JCM, Francisco FR, Almeida KA, Sato S, Converti A. Cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* by fed-batch addition of ammonium chloride at exponentially-increasing feeding rate. *J Phycol* 2004;40:589–97.
- [9] Carlotto P, Pinzani E. Growth characteristics of *Arthrospira platensis* cultured inside a new closed-coil photobioreactor incorporating a mandrel to control culture temperature. *Biotechnol Bioeng* 2005;90:675–84.
- [10] Soletto D, Binaghi L, Ferrari L, Lodi A, Carvalho JCM, Zilli M, et al. Effects of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulse-feeding cultivation of *Spirulina platensis* in helical photobioreactor. *Biochem Eng J* 2008;39:369–75.
- [11] Ferreira LS, Rodrigues MS, Converti A, Sato S, Carvalho JCM. A new approach to ammonium sulfate feeding for fed-batch *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* cultivation in tubular photobioreactor. *Biotechnol Progr* 2010;26:1271–7.
- [12] Binaghi L, Del Borghi A, Lodi A, Converti A, Del Borghi M. Batch and fed-batch uptake of carbon dioxide by *Spirulina platensis*. *Process Biochem* 2003;38:1341–6.
- [13] Matsudo MC, Bezerra RP, Converti A, Sato S, Carvalho JCM. CO_2 from alcoholic fermentation for continuous cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* in tubular photobioreactor using urea as nitrogen source. *Biotechnol Progr* 2011;27:650–6.
- [14] Ramanathan V, Feng Y. Air pollution, greenhouse gases and climate change: global and regional perspectives. *Atmos Environ* 2009;43:37–50.
- [15] Oliveira M, Vasconcelos Y. Revolução no canavia. *Revista Pesquisa FAPESP* 2006;122:1–6.
- [16] União da Agroindústria Canavieira de São Paulo. Desenvolvimento ecologicamente correto. www.portal.unica.com.br/dados/Cotacao/estatistica [Accessed 10.08.2011].
- [17] Maeda K, Owada M, Kimura N, Omata K, Karube J. CO_2 fixation from the flue gas on coal-fired thermal power plant by microalgae. *Energy Convers Manage* 1995;36:717–20.
- [18] Janssen M, Tramper J, Mur LR, Wijffels RH. Enclosed outdoor photobioreactors: light regime, photosynthetic efficiency, scale-up, and future prospects. *Biotechnol Bioeng* 2002;81:193–210.
- [19] Chen C, Ma X, Liu K. Thermogravimetric analysis of microalgae combustion under different oxygen supply concentrations. *Appl Energy* 2011;88:3189–96.
- [20] Venkatasamy C, Hendry D, Wilkinson N, Fernando L, Jacoby WA. Investigation of thermochemical conversion of biomass in supercritical water using a batch reactor. *Fuel* 2011;90:2662–70.
- [21] Cheng J, Zhang M, Song W, Xia A, Zhou J, Cen K. Cogeneration of hydrogen and methane from *Arthrospira maxima* biomass with bacteria domestication and enzymatic hydrolysis. *Int J Hydrogen Energy* 2011;36:1474–81.
- [22] Pelizer LH, Danesi ED, Rangel CO, Sassano CEN, Carvalho JCM, Sato S, et al. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. *J Food Eng* 2003;56:371–5.

Please cite this article in press as: Ferreira LS et al. *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* cultivation in tubular photobioreactor: Use of no-cost CO_2 from ethanol fermentation. *Appl Energy* (2011), doi:10.1016/j.apenergy.2011.11.019

- [23] Sánchez-Luna LD, Bezerra RP, Matsudo MC, Sato S, Converti A, Carvalho JCM. Influence of pH, temperature and urea molar flowrate on *Arthrospira platensis* fed-batch cultivation. A kinetic and thermodynamic approach. *Biotechnol Bioeng* 2007;96:702–11.
- [24] Ferreira LS, Rodrigues MS, Converti A, Sato S, Carvalho JCM. Kinetic and growth parameters of *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivated in tubular photobioreactor under different cell circulation systems. *Biotechnol Bioeng*, in press.
- [25] Faintuch BL. Análise comparativa da produção de biomassa a partir de três cianobactérias empregando distintas fontes nitrogenadas. Master Thesis, University of São Paulo, Brazil; 1989.
- [26] Leduy A, Therien N. An improved method for optical density measurement of the semimicroscopic blue algae *Spirulina maxima*. *Biotechnol Bioeng* 1977;19:1219–24.
- [27] Vogel AI. Análise Química Quantitativa. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Ltda; 1992.
- [28] Solorzano L. Determination of ammonia in natural waters by the phenol hypochlorite method. *Limnol Oceanogr* 1969;14:799–801.
- [29] Pierce WC, Haenisch EL. Quantitative analysis. 3th ed. New York: John Wiley & Sons; 1948.
- [30] Olguín EJ, Galicia S, Angulo-Guerrero O, Hernández E. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina* sp. growth on pig waste. *Bioresour Technol* 2001;77:19–24.
- [31] Aquarone E. Penicillin and tetracycline as contamination control agents in alcoholic fermentation of sugar cane molasses. *Appl Microbiol* 1960;8:263–8.
- [32] Carvalho JCM, Aquarone E, Sato S, Brazzachi ML, Almeida KA, Borzani W. Influence of exponentially decreasing feeding rates on fed-batch ethanol fermentation of sugar cane blackstrap molasses. *Biotechnol Lett* 1990;12:777–82.
- [33] Somogyi M. Notes on sugar determination. *J Biol Chem* 1952;195:19–23.
- [34] Joslyn MA. Methods in food analysis. 2th ed. New York: Academic Press; 1970.
- [35] Converti A, Arni S, Sato S, Carvalho JCM, Aquarone E. Simplified modeling of fed-batch alcoholic fermentation of sugarcane blackstrap molasses. *Biotechnol Bioeng* 2003;84:88–95.
- [36] Cornet JF, Dussap CG, Cluzel P, Dubertret GA. Structured model for simulation of cultures of the cyanobacterium *Spirulina platensis* in photobioreactors: II. Identification of kinetic parameters under light and mineral limitations. *Biotechnol Bioeng* 1992;40:826–34.
- [37] Cachot T, Müller M, Pons M. Kinetics of volatile metabolites during alcoholic fermentation of cane molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 1991;35:450–4.
- [38] Hattori A, Myers J. Reduction of nitrate and nitrite by subcellular preparations of *Anabaena cylindrica* II. Reduction of nitrate to nitrite. *Plant Cell Physiol* 1967;8:327–37.
- [39] Ohmori M, Ohmori K, Strotmann H. Inhibition of nitrate uptake by ammonia in a blue-green alga *Anabaena cylindrica*. *Arch Microbiol* 1977;114:225–9.

Anexo C – Artigo publicado apresentado no capítulo IV deste trabalho

Chemical Engineering Journal 173 (2011) 326–333

Contents lists available at ScienceDirect

Chemical Engineering Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cejChemical
Engineering
JournalAdsorption of Ni^{2+} , Zn^{2+} and Pb^{2+} onto dry biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis* and *Chlorella vulgaris*. I. Single metal systemsLívia Seno Ferreira^{a,b}, Mayla Santos Rodrigues^{a,b}, João Carlos Monteiro de Carvalho^a, Alessandra Lodi^b, Elisabetta Finocchio^b, Patrizia Perego^b, Attilio Converti^{b,*}^a Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes 580, Bloco 16, 05508-900 São Paulo-SP, Brazil^b Department of Chemical and Process Engineering "G.B. Bonino", University of Genoa, via Opera Pia 15, 16145 Genoa, Italy

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 April 2011

Received in revised form 8 July 2011

Accepted 20 July 2011

Keywords:

Heavy metals sorption

*Arthrospira (Spirulina) platensis**Chlorella vulgaris*

Kinetics

Isotherms

FT-IR spectroscopy

ABSTRACT

Adsorption of Ni^{2+} , Zn^{2+} or Pb^{2+} by dry biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis* and *Chlorella vulgaris* was studied as a function of contact time and initial metal concentration. The zero point of charge calculated for these biosorbents (pH_{zpc} 4.0 and 3.4, respectively) and additional pH tests suggested the use of pH in the range 5.0–5.5 for the experiments. The equilibrium isotherms were evaluated in terms of maximum sorption capacity and sorption affinity. The pseudo first and second order kinetic models were considered to interpret the experimental data, and the latter best described the adsorption system. Both the Freundlich and Langmuir models were shown to well describe the sorption isotherms, thus suggesting an intermediate mono/multilayer sorption mechanism. Compared to *A. platensis* ($q_e = 0.354$, 0.495 and 0.508 mmol g^{-1} for Ni^{2+} , Pb^{2+} and Zn^{2+} , respectively), *C. vulgaris* behaved as a better biosorbent because of higher equilibrium sorption capacity ($q_e = 0.499$, 0.634 and 0.664 mmol g^{-1} , respectively). The removal efficiency decreased with increasing metal concentration, pointing out a passive adsorption process involving the active sites on the surface of the biomasses. The FT-IR spectroscopy evidenced that ions removal occurred mainly by interaction between metal and carboxylate groups present on both the cell walls.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Heavy metal pollution in air, water and soil is a global problem generated by mining and refining operations, metal processing plants and waste incineration. In particular, nickel, zinc and lead constitute high pollution sources, as the exposure to flue gases or the ingestion of compounds of these metals lead to serious system dysfunctions that can affect permanently both animals and human beings. Lead is highly hepatotoxic [1], nickel is a well-known carcinogenic agent [2], and the excess of zinc may cause even the impairment of growth and reproduction [3]. Therefore, the presence of ions of these metals in wastewaters, even at very low concentrations, is a hazard to the aquatic ecosystem and raises many risks for human beings.

The most common methods used to remove heavy metals from wastewater are ion-exchange, reverse osmosis and chemical precipitation [4,5]. Although more attention has recently been paid to the sorption onto activated carbon [6], alternative less expensive methods are being searched, and the use of natural biomass as

sorbent is economically attractive for this purpose [7]. The metal sequestering ability of microorganisms such as yeasts, bacteria, fungi, cyanobacteria and microalgae has been largely investigated [8]. The mechanism by which binding of ions occurs is not yet completely understood; it seems to be a passive adsorption to chemical groups present on the surface of the biosorbent, and it can vary significantly depending on the kind of material [9]. The main mechanisms responsible for sorption of metal ions are electrostatic interaction on cell surface, ion complexation, and ion exchange. In particular, carboxyl and amino groups on the surface of an adsorbent have been reported to be very effective in ion removal [10,11].

Arthrospira (Spirulina) platensis and *Chlorella vulgaris*, which are abundantly produced for several commercial uses, can be considered potential biosorbents for heavy metals removal. The dried biomasses of these two microorganisms have in fact shown excellent capacity to remove, for example, chromium [12,13], copper [14] and cadmium [9,15,16]. Moreover, previous works were successfully performed on the use of *A. platensis* or *C. vulgaris* biomasses as binders of nickel, zinc and lead. To give only a few examples, Şeker et al. [16] obtained 0.62 mmol Ni g^{-1} and 0.48 mmol Pb g^{-1} using *A. platensis* as biosorbent at different temperatures, whereas Aksu [17] was able to remove from 0.82 to 1.03 mmol Ni g^{-1} using no less than 10 g L^{-1} of *C. vulgaris* biomass.

* Corresponding author. Tel.: +39 010 3532593; fax: +39 010 3532586.
E-mail address: converti@unige.it (A. Converti).

Even though research in this field is extensive, a comparative study regarding the potential as metal binders of the biomasses of the two microorganisms selected in this study is lacking. Up to now only one attempt has been made, as far as we are aware, to compare the biomasses as biosorbents [13]. Thus, the main novelty of this study is the use of *A. platensis* and *C. vulgaris* as typical representatives of procariotic and eucariotic species, with the aim of ascribing possible differences in the biosorption behavior to their different cell organization.

To elucidate the possible mechanisms responsible for metal sorption, FT-IR spectroscopy has been successfully applied to the study of the functional groups involved in the adsorption phenomenon and their interaction with ions [18–20]. The study of the position and intensity of the main IR bands, and their modification following the adsorption, provides useful information on the chemical groups involved in metal ions binding [18,20,21]. Binding centers have been shown to be carboxyl, hydroxyl, amino, and ether groups, most of which mainly act as ion exchangers through the release of light metal ions such as Ca^{2+} , Na^+ and Mg^{2+} . In recent literature reports, the joint use of other spectroscopic techniques such as XPS, EXAFS and XANES has provided further confirmation of the nature of main chemical groups involved in adsorption processes. Although these techniques allow information on the coordination environment and geometry of metals absorbed by plants as well as on metal bioreduction, as in the case of Cr(VI) adsorption and reduction on biomasses [22–25], the use only of FT-IR spectroscopy was considered to be sufficient for the purposes of this preliminary work on single metals.

The present work aims at evaluating the sorption capacity of dried biomass of *A. platensis* and *C. vulgaris* in the removal of Ni^{2+} , Zn^{2+} and Pb^{2+} from single metal aqueous solutions at increasing concentrations (0.5–3.0 mM). The sorption kinetic study was performed by fitting the experimental data in the models of Lagergren [26] and Ho and McKay [27]. The isotherm models of Langmuir [28] or Freundlich [29] were also used to process the adsorption data at equilibrium. Moreover, in order to study the functional groups involved in metal adsorption, raw and metal-bound biomasses have been investigated by FT-IR spectroscopy.

2. Materials and methods

2.1. Microalgae cultivation

Arthrospira platensis UTEX1926 (University of Texas Culture Collection, Texas, USA) and *C. vulgaris* CCAP211 (Culture Collection of Algae and Protozoa, Argyll, UK) were grown batch-wise in tubular photobioreactor at $82 \pm 5 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ under pH control through the daily addition of pure CO_2 . *A. platensis* was cultivated in the medium of Schlösser [30] at $30 \pm 1^\circ\text{C}$ and pH 9.5 ± 0.5 , whereas *C. vulgaris* was grown in Bold's Basal Medium [31] at $20 \pm 1^\circ\text{C}$ and pH 7.0 ± 0.5 . Once the stationary phase had been reached, after about 10 days of cultivation for *A. platensis*, and 20 days for *C. vulgaris*, cells were centrifuged (ALC 4226 centrifuge, Milan, Italy) for 15 min at 3500 rpm.

The recovered cells of *A. platensis* and *C. vulgaris* were washed until reaching pH 7.0, dried at 40°C for 24 h and ground to a fine powder, which was sieved through a 120 mesh (0.125 mm) sieve. The undersized fraction was then used for the adsorption tests.

2.2. Biosorption and analytical procedures

Stock metal solutions of 100 mM were prepared by dissolving $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Sigma–Aldrich Co., Milan, Italy) in high-purity deionized water and stored in amber flasks at room temperature ($20 \pm 1^\circ\text{C}$).

Adsorption tests were carried out in 250-mL Erlenmeyer flasks agitated at 150 rpm at room temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). Nickel, zinc and lead solutions (100 mL) with increasing metal concentration (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 and 3.0 mM) were put into contact with 2 g L^{-1} of each biosorbent. During tests, the pH was measured by a pHmeter, model pH 211 (Hanna, Milan, Italy) and controlled in the range 5.0–5.5, through the addition of alkaline (NaOH) and acidic (HNO_3) solutions when necessary. Samples (2 mL) were withdrawn at fixed times (5, 10, 15, 30, 45, 60 and 120 min) and filtered through membrane filters with $0.45 \mu\text{m}$ -pore diameter (Millipore, Vimodrone, Italy). The filtrate was analyzed for metal content using an atomic adsorption spectrometer, model AA240FS (Varian, Milan, Italy). All the tests were carried out in triplicate, and the results were expressed as mean values. The standard deviations between data and mean values never exceeded 6.4%; therefore, no additional statistical analysis was considered to be necessary.

Either biomass as such or biomass plus adsorbed metals recovered at the end of biosorption tests was centrifuged (model ALC 4226 centrifuge, Milan, Italy) for 15 min at 3500 rpm, dried at 40°C for 24 h and again powdered for FT-IR spectroscopic analysis.

2.3. Characterization studies

In order to select the optimum pH to perform the kinetic investigation of metal adsorption, preliminary tests at initial pH varying in the range 3–6 were carried out using 1.0 mM metal solutions with 2 g L^{-1} of dry biomass. Additionally, the calculation of *A. platensis* and *C. vulgaris* zero point of charge (pH_{zpc}) was determined by potentiometric titrations of solutions containing 5 g L^{-1} of dry biomass in 0.01, 0.10 and 1.0 M NaCl, using 0.1 M HCl as a titrant [32].

Samples of biomass before and after metal adsorption were prepared for FT-IR analysis by dilution of pure powders in KBr disks (1%, w/w) and analyzed using a Nicolet 6700 FT-IR instrument (Thermo Fisher, Waltham, MA) equipped with DTGS-KBr detector and OMNICTM acquisition software. The acquisition was 100 scans for each spectrum and the resolution 2 cm^{-1} . Biomass samples after heavy metal sorption were either rinsed with deionized water or simply dried before FT-IR analysis. No differences could be detected in the resulting spectra, thus only those of rinsed spent biomass are reported and discussed in the following.

2.4. Sorption capacity and efficiency

The capability of *A. platensis* and *C. vulgaris* biomasses as sorbents was evaluated in terms of experimental sorption capacity at equilibrium (q_e), expressed in mmol g^{-1} :

$$q_e = (C_0 - C_e) \frac{V}{w} \quad (1)$$

where C_0 and C_e (mM) are the initial and equilibrium metal concentrations, respectively, V (L) is the volume of the solution and w (g) the weight of dry biomass used.

Metal removal efficiency (Y_R) was expressed in % and defined as:

$$Y_R = \left(\frac{C_0 - C_e}{C_0} \right) \times 100 \quad (2)$$

2.5. Kinetic models

The pseudo first order model of Lagergren [26] and the pseudo second order model of Ho and McKay [27], both based on solid adsorption capacity, were used to investigate the sorption kinetics. The Lagergren model is described by the equation:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_1 t \quad (3)$$

where q_t (mmol g^{-1}) is the sorption capacity at a given time and k_1 (min^{-1}) the pseudo first order rate constant.

Analogously, the model of Ho and McKay is described by the equation:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_c^2} + \frac{1}{q_c} t \quad (4)$$

where k_2 ($\text{g mmol}^{-1} \text{min}^{-1}$) is the pseudo second order rate constant and q_c the theoretical value of sorption capacity at equilibrium.

Plots of $\ln(q_e - q_t) - \ln(q_e)$ versus t allowed estimating k_1 , whereas plots of t/q_t versus t did so for k_2 and q_c .

2.6. Equilibrium isotherms

The equilibrium isotherms were investigated by both models of Langmuir [28] and Freundlich [29].

The former equation is based on the assumption that the surface of the biosorbent is homogeneous, all sites on it are identical and have equal affinity for the sorbate, and a complete monolayer is formed when the solid surface reaches saturation. Its linearized form is:

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{K_L q_m} + \frac{1}{q_m} C_e \quad (5)$$

where q_m (mmol g^{-1}) is the theoretical maximum sorption capacity for a complete monolayer and K_L (L mmol^{-1}) the Langmuir equilibrium constant related to the affinity of the binding sites on cell surface.

The equation of Freundlich [29], which takes into account heterogeneous surfaces and consequently exponential distribution of active sites, is given as:

$$\log q_e = \log K_F + \frac{1}{n} \log C_e \quad (6)$$

where K_F ($\text{mmol}^{1-1/n} \text{L}^{1/n} \text{g}^{-1}$) and $1/n$ (dimensionless) are constants for a given sorbate and sorbent at a particular temperature, which are related to the relative sorption capacity and intensity, respectively.

The parameters and constants appearing in both equations were estimated by linear regression, by plotting C_e/q_e versus C_e in the former case and $\log q_e$ versus $\log C_e$ in the latter.

3. Results and discussion

3.1. Effect of pH

It is well known that pH is a critical factor in the adsorption of metal ions, either because of its influence on metal solubility or the dissociation degree of functional groups located on sorbent surface. Generally, metal sorption rate decreases considerably with the increase in alkalinity, mainly at $\text{pH} > 6.0$ – 7.0 [14], owing to metal ions precipitation as hydroxides. At $\text{pH} < 3.0$, hydrogen ions compete with metal ions for the same adsorption sites on the biosorbent, compromising again metal sorption [33]. Therefore, there is an optimum pH for the sorption of each metal, usually within the range 4.0 – 6.0 , in which the competition of hydrogen ions is minimized, thereby enhancing metal sorption.

In order to select the optimum pH range for metal sorption, it is useful to resort to the zero point of charge (pH_{zpc}) of the selected biosorbent, i.e. the pH value at which the sorbent surface does not carry charges. When $\text{pH} < \text{pH}_{\text{zpc}}$, the surface of the biosorbent gets positively charged, and metal sorption is inhibited, due to electrostatic repulsion between metal ions and functional groups. Oppositely, when $\text{pH} > \text{pH}_{\text{zpc}}$, the number of negatively charged

sites on the biosorbent increases, and metal sorption is mostly favored.

The pH_{zpc} values for *A. platensis* and *C. vulgaris*, estimated as the arithmetic average of pK_a and pK_b (Supplementary material 1), were 4.0 and 3.4 , respectively. Additionally, preliminary adsorption tests were carried out in the pH range 3.0 – 6.0 , and the results, expressed in millimole of adsorbed metal per gram of biomass, are listed in Supplementary material 2. These results clearly show that the optimum pH for adsorption of nickel and zinc was in the range 5.0 – 6.0 , whereas lead precipitated at the higher limit of this range (6.0).

Based on these results, it has been chosen to carry out experiments at $\text{pH } 5.0$ – 5.5 [15,16,33], as this interval was expected to favor the dissociation of functional groups, and then the binding of metal ions on cell surface, meanwhile avoiding lead precipitation.

3.2. Kinetic studies

Biosorption tests were carried out with either biomass at different Ni^{2+} , Zn^{2+} and Pb^{2+} concentrations sampling until 120 min of contact time. Data collected at the beginning of each run were utilized for kinetic studies, whereas those at equilibrium for isotherm studies discussed in the next section.

The experimental results were fitted using both pseudo first order [26] and second order [27] kinetic models. However, as shown in Table 1, only the latter model, in which the metal binding capacity is assumed proportional to the number of active sites occupied on the sorbent, seemed to represent well enough the sorption rate in most of tests; therefore, it was selected as that better representing metal sorption by dry *A. platensis* and *C. vulgaris* biomasses.

Fig. 1 illustrates the application of the equation of Ho and McKay [27] to the kinetics of Zn^{2+} sorption by *A. platensis* (Fig. 1A) and *C. vulgaris* (Fig. 1B), taken as examples. The theoretical values of sorption capacity calculated by this equation (q_c) (Table 1) showed an excellent agreement with the experimental ones (q_e) (Table 2), and the related determination coefficients were excellent ($0.980 \leq R^2 \leq 1.000$). For Pb^{2+} sorption, the pseudo second order rate constant (k_2) somewhat progressively decreased with increasing the initial metal concentration (C_0) (Table 1). Greater variation among k_2 values was observed with *C. vulgaris* (2.41 – $6.11 \text{ g mmol}^{-1} \text{min}^{-1}$) compared to *A. platensis* (2.30 – $5.28 \text{ g mmol}^{-1} \text{min}^{-1}$).

For Zn^{2+} and Ni^{2+} sorption, k_2 values were much higher at low ($C_0 \leq 1.0 \text{ mM}$) than at high ($C_0 \geq 1.5 \text{ mM}$) metal concentration. Not much of a difference was observed in k_2 when $C_0 \geq 1.5 \text{ mM}$, probably due to saturation of the sorption sites on cell surface. It is worth mentioning that *A. platensis* and *C. vulgaris* showed for Zn^{2+} similar sorption behavior and k_2 values, despite the biosorbents being essentially different. In contrast, a different Ni^{2+} adsorption pattern was found. Another point worth highlighting is that Zn^{2+} sorption rate was much higher than that of Ni^{2+} with *A. platensis* biomass at low concentration, whereas tests at $C_0 \geq 1.5 \text{ mM}$ resulted in almost coincident k_2 values. Since Ni^{2+} and Zn^{2+} have almost the same outer electronic configuration, we suppose this difference in k_2 was due to a probable higher affinity of *A. platensis* for Zn^{2+} , as later confirmed by isotherm models.

We can conclude that, apart from some data at low concentration, k_2 values respected the following order for both biosorbents: $\text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$, being the highest value ($6.11 \text{ g mmol}^{-1} \text{min}^{-1}$) obtained at $C_0 = 0.5 \text{ mM Pb}^{2+}$, and the lowest ($0.462 \text{ g mmol}^{-1} \text{min}^{-1}$) at $C_0 = 3.0 \text{ mM Ni}^{2+}$, both with *C. vulgaris*.

3.3. Adsorption capacity and efficiency

Metal binding capacity of *A. platensis* and *C. vulgaris* was evaluated, in terms of experimental equilibrium sorption capacity (q_e)

Table 1
Ho and McKay kinetic parameters obtained from linear fits of the experimental data of nickel(II), zinc(II) and lead(II) biosorption by *A. platensis* and *C. vulgaris* dried biomasses.

C_0 (mM)	Nickel(II)			Zinc(II)			Lead(II)		
	q_e^a (mmol g ⁻¹)	k_2^b (g mmol ⁻¹ min ⁻¹)	R^2	q_e^a (mmol g ⁻¹)	k_2^b (g mmol ⁻¹ min ⁻¹)	R^2	q_e^a (mmol g ⁻¹)	k_2^b (g mmol ⁻¹ min ⁻¹)	R^2
<i>A. platensis</i>									
0.5	0.087	2.04	0.997	0.171	5.33	0.999	0.193	5.28	0.999
1.0	0.169	2.19	0.999	0.284	4.25	0.999	0.288	3.42	0.999
1.5	0.239	1.48	0.998	0.334	1.28	0.999	0.358	3.64	0.999
2.0	0.290	1.62	0.999	0.389	1.43	0.994	0.386	2.30	0.999
2.5	0.351	1.37	0.999	0.450	1.07	0.999	0.446	2.41	0.999
3.0	0.361	1.55	0.999	0.516	1.03	0.999	0.491	2.50	0.999
<i>C. vulgaris</i>									
0.5	0.135	3.17	0.999	0.174	5.62	0.999	0.226	6.11	0.999
1.0	0.237	3.34	0.999	0.327	5.10	1.00	0.434	4.45	0.999
1.5	0.320	1.60	0.980	0.413	1.81	0.998	0.533	4.48	1.00
2.0	0.450	1.01	0.999	0.554	2.05	0.999	0.612	2.64	0.999
2.5	0.515	0.663	0.995	0.635	1.94	0.999	0.620	2.50	0.999
3.0	0.499	0.462	0.983	0.669	1.85	0.999	0.635	2.41	0.999

^a q_e – sorption capacity, calculated by the Ho and McKay kinetic equation at equilibrium.

^b k_2 – pseudo second order rate constant, calculated according to the Ho and McKay kinetic equation.

and removal efficiency (Y_R), through sorption tests carried out in 0.5–3.0 mM solutions of Ni²⁺, Zn²⁺ and Pb²⁺. In general, with both biosorbents, q_e increased with C_0 (Fig. 2), probably due to the increase in the collisions between biomass and metal ions [13]. Contrary to q_e , Y_R decreased with increasing C_0 (Table 2), as the likely result of a decrease in biomass adsorption capacity also related to a progressive saturation of available sites for metal binding.

C. vulgaris proved a better metal biosorbent than *A. platensis*; its maximum removal efficiencies, obtained in tests carried out in 0.5 mM solutions of Ni²⁺, Zn²⁺ and Pb²⁺ were 54.4, 72.6 and 86.5% respectively, whereas *A. platensis* reached 35.4, 67.3 and 78.0%, respectively. The maximum q_e values were for the same metals 0.499, 0.664 and 0.634 mmol g⁻¹ with *C. vulgaris* and 0.354, 0.508 and 0.495 mmol g⁻¹ with *A. platensis*.

From these results it can be inferred that both dried biomasses are good enough sorbents for lead and zinc, but not so much for nickel, given the conditions set in this study.

3.4. Sorption isotherms

In order to study the adsorption isotherms, the Freundlich and Langmuir models were applied to equilibrium data obtained for Zn²⁺, Ni²⁺ and Pb²⁺ sorption on *A. platensis* and *C. vulgaris* biomass. Fig. 1C and D illustrates, as an example, the fitting by Langmuir model of Zn²⁺ equilibrium sorption data using *A. platensis* and *C. vulgaris* biomass as biosorbents, respectively, while Fig. 1E and F did

so by the Freundlich model. Table 3 shows the values of the sorption constants of both models estimated from the isotherms as well as the related linear regression coefficients. As is well known, the Freundlich model is an empirical relationship whereby it is assumed that the adsorption energy of metal binding to a site on an adsorbent depends on whether or not the adjacent sites are already occupied [34]. On the other hand, the Langmuir one is based on the assumption that maximum adsorption occurs when a saturated monolayer of solute molecules is present on the adsorbent surface, the energy of adsorption is constant, and there is no migration of adsorbate molecules in the surface plane [35].

The determination coefficients of linear fitting ($0.970 \leq R^2 \leq 0.990$ by Freundlich and $0.949 \leq R^2 \leq 0.999$ by Langmuir models, respectively) were sufficiently high to suggest that both models were able to well describe the sorption; therefore, we can infer that metal sorption was likely to follow an intermediate behavior between a mono- and a multilayer adsorption mechanism.

As the Freundlich constant (K_F) is related to biosorbent capacity, the values of this parameter in Table 3 suggest that, for both biomasses, the uptake of Pb²⁺ and Zn²⁺ was relatively easy, whereas that of Ni²⁺ little bit more difficult. Moreover, the very high n values of the Freundlich model suggest that the biosorption of all ions was highly non-linear. Being n a parameter that represents the sorption intensity [36], we can conclude that the highest intensity was obtained for Pb²⁺ sorption, which highlights the large affinity of both biomasses for this metal.

Table 2
Capability of dried *A. platensis* and *C. vulgaris* biomasses as sorbents in terms of either sorption capacity at equilibrium (q_e) or metal removal efficiency (Y_R).

C_0 (mM)	Ni ²⁺		Zn ²⁺		Pb ²⁺	
	q_e (mmol g ⁻¹)	Y_R (%)	q_e (mmol g ⁻¹)	Y_R (%)	q_e (mmol g ⁻¹)	Y_R (%)
<i>A. platensis</i>						
0.5	0.088	35.4	0.168	67.3	0.195	78.0
1.0	0.167	33.3	0.285	57.0	0.286	57.2
1.5	0.236	31.4	0.325	43.3	0.353	47.1
2.0	0.285	28.5	0.384	38.4	0.385	38.5
2.5	0.349	27.9	0.443	35.5	0.445	35.6
3.0	0.354	23.6	0.508	33.9	0.495	33.0
<i>C. vulgaris</i>						
0.5	0.136	54.4	0.182	72.6	0.216	86.5
1.0	0.236	47.2	0.324	64.8	0.430	86.0
1.5	0.341	45.5	0.426	56.8	0.532	70.9
2.0	0.436	43.6	0.549	54.9	0.615	61.5
2.5	0.499	39.9	0.633	40.7	0.624	49.9
3.0	0.495	33.0	0.664	44.2	0.634	42.3

Fig. 1. Kinetics and isotherms of biosorption of Zn^{2+} at different initial metal concentrations by *A. platensis* and *C. vulgaris*, respectively: kinetic model of Ho and McKay [27] (A and B), isotherm model of Langmuir [28] (C and D), and of Freundlich [29] (E and F).

According to the Langmuir model, the theoretical maximum values of sorption capacity (q_m) of *A. platensis* and *C. vulgaris* were 0.740 and 0.823 mmol g^{-1} for Ni^{2+} , 0.604 and 0.918 mmol g^{-1} for Zn^{2+} and 0.546 and 0.668 mmol g^{-1} for Pb^{2+} , respectively (Table 3). Expectedly, q_m values, which were extrapolated for all metal concentrations, did not correspond to the experimental ones (q_e), which are specific for a given C_0 . These results are similar to those obtained by other authors, apart from a few variances resulting from different experimental conditions [14–16]. For instance, the maximum sorption capacities obtained in this work for Ni^{2+} and Zn^{2+} are higher than those found by Klimmek et al. [37] (0.65 and 0.49 mmol g^{-1} , respectively), using the cyanophyceae *Lyngbya taylorii* that behaved as the best biosorbent among 30 different cyanobacteria and microalgae, including three *A. platensis* and one *C. vulgaris* strains. On the other hand, q_m found in this work for Pb^{2+} was significantly lower than the one observed by the above authors (1.47 mmol g^{-1}), which suggests that metal biosorption could be strongly strain-dependent.

The Langmuir equilibrium constant (K_L), which is related to the affinity of a biosorbent for a metal ion, was very high especially for Pb^{2+} adsorption by *C. vulgaris* (11.3 L mmol^{-1}), thereby confirming the high affinity of such a biosorbent for this metal. Less affinity was observed for Zn^{2+} ($K_L = 1.60 \text{ L mmol}^{-1}$) and mainly for Ni^{2+} ($K_L = 0.867 \text{ L mmol}^{-1}$). Nevertheless, all K_L values were high enough to indicate high affinity between the selected biosorbents and metal ions, and *C. vulgaris* exhibited higher affinity when compared to *A. platensis*.

Concluding, in general, both biomasses showed a decreasing affinity for metals, according to the following order: $Pb \gg Zn > Ni$. This behavior could have been due to the different outer electronic configurations of these metals; i.e. $[Xe] 4f^{14} 5d^{10} 6s^2 6p^2$ for Pb, $[Ar] 3d^{10} 4s^2$ for Zn and $[Ar] 3d^8 4s^2$ for Ni. One can easily realize that the different affinity of these metals could have been the result of a progressive decrease in the number of electrons lying in very diffused and distant orbitals (d and f), which are notoriously more available than those closer to the nucleus to

Table 3

Isotherm parameters and constants calculated at equilibrium by the Langmuir and Freundlich models for Ni^{2+} , Zn^{2+} and Pb^{2+} removal using dried biomasses of *A. platensis* and *C. vulgaris* as biosorbents.

	Langmuir			Freundlich		
	q_m (mmol g ⁻¹)	K_L (L mmol ⁻¹)	R^2	K_F (mmol ^{1-1/n} L ^{1/n} g ⁻¹)	n	R^2
<i>A. platensis</i>						
Ni^{2+}	0.740	0.438	0.954	0.215	1.36	0.982
Zn^{2+}	0.604	1.82	0.957	0.367	2.42	0.978
Pb^{2+}	0.546	2.84	0.970	0.380	3.21	0.990
<i>C. vulgaris</i>						
Ni^{2+}	0.823	0.867	0.949	0.366	1.56	0.970
Zn^{2+}	0.918	1.60	0.984	0.546	1.87	0.988
Pb^{2+}	0.668	11.3	0.999	0.614	3.66	0.886

Fig. 2. Equilibrium sorption capacity (q_e) as a function of initial metal concentration (C_0) for tests carried out with Pb^{2+} (■ and □), Zn^{2+} (● and ○), and Ni^{2+} (▲ and △), for *A. platensis* and *C. vulgaris*, respectively. Conditions: $T = 20^\circ\text{C}$, pH 5.0–5.5, biomass 2 g L^{-1} .

establish attractive interactions with sorbents. As the ionic radius progressively decreases passing from Pb^{2+} (1.19 Å) to Zn^{2+} (0.74 Å) and Ni^{2+} (0.69 Å), these results are in accordance with the conclusions of Vázquez et al. [38] about the progressive increase in K_F with this radius. Moreover, as already stressed by Chong and Volesky [39] for the Cu/Cd/Zn ternary system, the fact that Ni^{2+} has the smallest ionic radius, but had the highest maximum sorption capacity (Table 3), indicates that the linear correlation between q_m and the ionic radius, already proposed for *Rhizopus arrhizus* [40], cannot be applied to the use of microalgae or cyanobacteria as biosorbents.

3.5. FT-IR analysis

FT-IR analysis was done to raw and metal-loaded *A. platensis* and *C. vulgaris* biomasses with the aim of identifying characteristic peaks associated to the complex matrix, containing carbohydrates, protein and lipid fractions, as well as the functional groups involved in metal adsorption.

In the high frequency region of Fig. 3, it is possible to observe in the raw *C. vulgaris* spectrum a weak component at 3300 cm^{-1} that can be assigned to NH stretching mode, and the broad and strong band centered around 3430 cm^{-1} . This last band probably resulted from OH stretching mode of hydroxyl groups interacting through H-bonds, although the overlapping with signals of water vapor adsorbed over the highly hygroscopic KBr matrix must be also taken into account.

The bands $2955/2871\text{ cm}^{-1}$ and $2923/2852\text{ cm}^{-1}$ were due to asymmetric and symmetric CH stretching modes of CH_3 and CH_2 groups, respectively, belonging to the long methylenic chains of

lipidic fraction. The weak but sharp peak at 3012 cm^{-1} can be assigned to $=\text{C}-\text{H}$ stretching mode in *cis* $\text{CH}=\text{CH}$ bonds, which is in agreement with the highly unsaturated fatty acid content of *C. vulgaris* biomass [41]. Correspondingly, the band at 1742 cm^{-1} was due to $\text{C}=\text{O}$ stretching mode of the ester group of triacyl (or diacyl) glycerides. Strong bands at 1651 and 1548 cm^{-1} can be assigned to amide I and amide II vibrational modes, from the protein fraction [42].

The complex band at 1450 cm^{-1} was likely associated to the deformation mode of the CH groups in long alkyl chains. On the other hand, the component at 1415 cm^{-1} was due to the symmetric COO^- stretching band, whose asymmetric strong component was reported to fall around 1610 cm^{-1} , thus being masked by the strong amide band at 1650 cm^{-1} . The spectroscopic analysis of *C. vulgaris* biomass treated at pH 2.0 showed that the band at 1415 cm^{-1} almost disappeared (spectrum not reported), because the acid treatment reduced the amount of exposed carboxylate groups, thus confirming the proposed assignation.

Several authors [42,43] assigned the strong band in the region $1235\text{--}1245\text{ cm}^{-1}$ to the asymmetric phosphate stretching band, and also to OCO vibrational modes of ester groups [20]. Bands at 1150 and 1080 cm^{-1} can be attributed to the presence of phosphate groups (PO vibrational stretching modes), whilst the band at 1050 cm^{-1} can be assigned mostly to the carbohydrate fraction (CC and CO stretching modes) [42].

The comparison of the spectra of raw and metal-loaded biomass allows assigning functional groups to metal sorption. In Fig. 3, a general decrease in the relative intensity of the OH bands can be observed, mainly in the Pb-loaded spectrum (higher adsorption). Also the NH stretching band was slightly reduced, suggesting an interaction of ions with NH groups through the electron lone pairs of the nitrogen atom. The analysis of the very weak $\text{C}=\text{C}$ stretching band before and after metal sorption shows a minor modification only in the case of Pb-loaded biomass. On the other hand, metal cations could coordinate over a double bond (acting as a ligand species) through a π -bond and we cannot rule out this possibility.

A decrease in the relative intensity of the 1650 cm^{-1} and 1548 cm^{-1} bands is noticeable, particularly in the former. This effect can be followed calculating the I_{1650}/I_{1742} ratio value, the band at 1742 cm^{-1} being unperturbed by metal interaction. This value decreased from raw to Pb-loaded biomass, which can be ascribed to the preferential interaction of the cation with the carboxyl [19,20,25,44–46] and amide group, characterized by electron lone pairs over oxygen and nitrogen atoms. This hypothesis seems to be confirmed by the parallel decrease in intensity of the amide II band. Also the band at 1416 cm^{-1} , corresponding to the symmetric stretching of carboxylate species, was slightly reduced, which provides further confirmation of carboxylate groups involvement in heavy metal adsorption. These findings are in agreement with data obtained by XPS analysis by Vázquez et al. [23], underlining the role of carboxyl functional groups in cations adsorption by biomasses.

Fig. 3. FT-IR skeletal spectra of *C. vulgaris* biomass either before (a) or after Ni^{2+} (b), Zn^{2+} (c), Pb^{2+} (d) adsorption.

Fig. 4. FT-IR skeletal spectra of *A. platensis* biomass either before (a) or after Ni^{2+} (b), Zn^{2+} (c), Pb^{2+} (d) adsorption.

As for the bands due to phosphate and carbohydrate groups, a change in their shape or position as a result of metal sorption can be detected in the subtraction spectrum (data not shown). Possibly, changes in coordination of phosphate and hydroxyl groups induced by metal binding occurred [43].

Finally, the comparison of spectra recorded following adsorption of different bivalent cations (Fig. 3) did not evidence any significant difference in the nature of chemical groups involved in the sorption process. Possibly, in the case of Pb uptake, the more noticeable decrease in the OH stretching band intensity suggests that hydroxyl groups could have been involved in greater amount in the lead adsorption.

Regarding raw *A. platensis* biomass spectrum (Fig. 4), the main detected peaks were the same as described for *C. vulgaris* and were related in previous work [12] to the presence of amide, ester and carboxylate groups, and carbohydrate residues. In the high frequency region, the weak bands overlapped to the broad OH stretching absorption were due to the stretching modes of NH (3300 cm^{-1}) and CH ($2950\text{--}2850\text{ cm}^{-1}$) groups. It is worth noticing that no bands due to unsaturated $\text{C}=\text{H}$ groups could be detected, and the intensity ratio between the bands due to CH_2 and CH_3 groups (2926 and 2958 cm^{-1} , respectively) was lower compared to *C. vulgaris* spectrum. Such an effect is in agreement with the lower lipid (unsaturated) fraction in *A. platensis* than in *C. vulgaris* biomass, as well as with an increased content in short chain phospholipids. At lower frequencies, the band due to $\text{C}=\text{O}$ stretching of the ester group was detected as a shoulder of the main amide I/asymmetric COO^- stretching band (1653 cm^{-1}), while the symmetric COO^- stretching component fell at 1410 cm^{-1} . Three sharp peaks appeared at 1154 , 1080 and 1025 cm^{-1} , in accordance with

those reported by Pistorius et al. [42], resulting from CO and CC stretching vibration and characterizing the carbohydrate fraction. The intensity of these bands suggests higher carbohydrate content in *A. platensis* biomass compared to *C. vulgaris*, consistently with the presence of peptidoglycan in the procariotic cell wall of the former.

Following heavy metal adsorption, spectra of *A. platensis* biomass (Fig. 4) showed that the relative intensity of bands in the $1650\text{--}1410\text{ cm}^{-1}$ region decreased, providing an indication of the involvement of carboxylate and amide groups in the sorption process [19,23]. On the other side, the region of the spectrum corresponding to the phosphate and carbohydrate functional groups did not seem to be significantly affected by metal adsorption. FT-IR analysis showed no major difference in the adsorption of the different metals by this cyanobacterium.

4. Conclusions

The sorption of Ni^{2+} , Zn^{2+} and Pb^{2+} on dried *A. platensis* and *C. vulgaris* biomasses was largely influenced by the initial metal concentrations ($C_0 = 0.5\text{--}3.0\text{ mM}$). At increasing C_0 values, the removal efficiency (Y_R) decreased, indicating that the process is a passive adsorption process involving the active sites of biomass. *C. vulgaris* behaved as a better biosorbent when compared to *A. platensis*, because of higher values of both equilibrium sorption capacity ($q_e = 0.499$, 0.664 and 0.634 mmol g^{-1} for Ni^{2+} , Zn^{2+} and Pb^{2+} , respectively) and removal efficiency ($Y_R = 54.4$, 72.6 and 86.5% , respectively). The pseudo second order model of Ho and McKay showed an excellent fit of the experimental data. Both equilibrium models of Freundlich and Langmuir were shown to adequately describe the sorption process. The FT-IR spectroscopy investigation

supported the sorption results, pointing out that similar functional groups are involved in the binding of heavy metals. Carboxylate groups were mainly involved in coordination and/or ionic exchange of bivalent ions, but also electron donors groups, such as amino, amide and hydroxyl groups, were likely to play a role in the sorption process. An additional possible interaction of lead ions with CC double bonds through coordination is suggested in the case of *C. vulgaris* biomass. The next attempt will deal with sorption tests in the simultaneous presence of two or three of these metals.

Acknowledgments

The authors thank the Genoa University for financing this research-work and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), São Paulo – Brazil, for the PhD fellowships of Livia Seno Ferreira and Mayla Santos Rodrigues.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.cej.2011.07.039.

References

- [1] A. Mudipalli, Lead hepatotoxicity & potential health effects, *Indian J. Med. Res.* 126 (2007) 518–527.
- [2] D.J. Sivulka, Assessment of respiratory carcinogenicity associated with exposure to metallic nickel: a review, *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 43 (2005) 117–133.
- [3] J.O. Duruibe, M.O.C. Ogwuegbu, J.N. Ekwurugwu, Heavy metal pollution and human biotoxic effects, *Int. J. Phys. Sci.* 2 (2007) 112–118.
- [4] A. Dąbrowski, Z. Hubicki, P. Podkościelny, E. Robens, Selective removal of the heavy metal ions from waters and industrial wastewaters by ion-exchange method, *Chemosphere* 56 (2004) 91–106.
- [5] F. Liu, G. Zhang, Q. Meng, H. Zang, Performance of nanofiltration and reverse osmoses membrane in metal effluent treatment, *Chin. J. Chem. Eng.* 16 (2008) 441–445.
- [6] M.A.A. Zaini, Y. Amano, M. Machida, Adsorption of heavy metals onto activated carbons derived from polyacrylonitrile fiber, *J. Hazard. Mater.* 180 (2010) 552–560.
- [7] A.M.B. Hamissa, A. Lodi, M. Seffen, E. Finocchio, R. Botter, A. Converti, Sorption of Cd(II) and Pb(II) from aqueous solutions onto *Agave americana* fibers, *Chem. Eng. J.* 159 (2010) 67–74.
- [8] K. Chojnacka, Biosorption and bioaccumulation – the prospects for practical applications, *Environ. Int.* 36 (2010) 299–307.
- [9] A. Lodi, E. Finocchio, A. Converti, C. Solisio, Removal of bivalent and trivalent ions by *Spirulina platensis* biomass: batch experiments and biosorbent characterization, *Int. J. Environ. Technol. Mgmt.* 12 (2010) 202–213.
- [10] R.S. Bai, T.E. Abraham, Studies on enhancement of Cr(VI) biosorption by chemically modified biomass of *Rhizopus nigricans*, *Water Res.* 36 (2002) 1224–1236.
- [11] J.M. Tobin, J.C. Roux, Mucor biosorbent for chromium removal from tanning effluent, *Water Res.* 32 (1998) 1407–1416.
- [12] E. Finocchio, A. Lodi, C. Solisio, A. Converti, Chromium (VI) removal by methylated biomass of *Spirulina platensis*, *Chem. Eng. J.* 156 (2010) 264–269.
- [13] S.V. Gokhale, K.K. Jyoti, S.S. Lele, Kinetic and equilibrium modeling of chromium (VI) biosorption on fresh and spent *Spirulina platensis*/*Chlorella vulgaris* biomass, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 3600–3608.
- [14] R. Vannela, S.K. Verma, Co²⁺, Cu²⁺, and Zn²⁺ accumulation by cyanobacterium *Spirulina platensis*, *Biotechnol. Prog.* 22 (2006) 1282–1293.
- [15] J.-Y. Lee, T.-S. Kwon, K. Baek, J.-W. Yang, Adsorption characteristics of metal ions by CO₂-fixing *Chlorella* sp. HA-1, *J. Ind. Eng. Chem.* 15 (2009) 354–358.
- [16] A. Şeker, T. Shahwan, A.E. Eroglu, S. Yilmaz, Z. Demirel, M.C. Dalay, Equilibrium, thermodynamic and kinetic studies for the biosorption of aqueous lead(II), cadmium(II) and nickel(II) ions on *Spirulina platensis*, *J. Hazard. Mater.* 154 (2008) 973–980.
- [17] Z. Aksu, Determination of the equilibrium, kinetic and thermodynamic parameters of the batch biosorption of nickel(II) ions onto *Chlorella vulgaris*, *Process Biochem.* 38 (2002) 89–99.
- [18] V. Murphy, H. Hughes, P. McLoughlin, Comparative study of chromium biosorption by red, green and brown seaweed biomass, *Chemosphere* 70 (2008) 1128–1134.
- [19] M.E. Romero-Gonzales, C.J. Williams, P.H.E. Gardiner, Study of the mechanisms of cadmium biosorption by dealginated seaweed waste, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 3025–3030.
- [20] M.F. Sawalha, J.R. Peralta-Videa, G.B. Saupe, K.M. Dokken, J.L. Gardea-Torresdey, Using FTIR to corroborate the identity of functional groups involved in the binding of Cd and Cr to saltbush (*Atriplex canescens*) biomass, *Chemosphere* 66 (2007) 1424–1430.
- [21] F. Pagnanelli, M. Petrangeli Papini, M. Trifoni, F. Vegliò, Biosorption of metal ions on *Arthrobacter* sp.: biomass characterization and biosorption modeling, *Environ. Sci. Technol.* 34 (2000) 2773–2778.
- [22] J.L. Gardea-Torresdey, J.R. Peralta-Videa, G. de la Rosa, J.G. Parsons, Phytoremediation of heavy metals and study of the metal coordination by X-ray absorption spectroscopy, *Coord. Chem. Rev.* 249 (2005) 1797–1810.
- [23] G. Vázquez, M. Calvo, M.S. Freire, J. González-Alvarez, G. Antorrena, Chestnut shell as heavy metal adsorbent: optimization study of lead, copper and zinc cations removal, *J. Hazard. Mater.* 172 (2009) 1402–1414.
- [24] R.S. Vieira, M.L.M. Oliveira, E. Guibal, E. Rodríguez-Castellón, M.M. Beppu, Copper, mercury and chromium adsorption on natural and crosslinked chitosan films: an XPS investigation of mechanism, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 374 (2011) 108–114.
- [25] P.X. Sheng, Y.-P. Ting, J.P. Chen, L. Hong, Sorption of lead, copper, cadmium, zinc, and nickel by marine algal biomass: characterization of biosorptive capacity and investigation of mechanisms, *J. Colloid Interface Sci.* 275 (2004) 131–141.
- [26] S. Lagergren, About theory of so-called adsorption of soluble substances, *K. Sven. Vetenskapsakad. Handl.* 24 (1898) 1–39.
- [27] Y.S. Ho, G. McKay, Pseudo-second order model for sorption processes, *Process Biochem.* 34 (1999) 451–465.
- [28] I. Langmuir, The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum, *J. Am. Chem. Soc.* 40 (1918) 1361–1403.
- [29] H. Freundlich, Über die Adsorption in Lösungen, *Z. Phys. Chem.* 57 (1906) 385–470.
- [30] U.G. Schlösser, Sammlung von Algenkulturen, *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 95 (1982) 181–276.
- [31] H.W. Bischoff, H.C. Bold, Phycological studies IV. Some soil algae from enchanted rock and related algal species, *Univ. Texas Publ.* 6318 (1963) 1–95.
- [32] J. Romero-González, J.L. Gardea-Torresdey, J.R. Peralta-Videa, E. Rodríguez, Determination of equilibrium and kinetic parameters of the adsorption of Cr(III) and Cr(VI) from aqueous solutions to *Agave lechuguilla* biomass, *Bioinorg. Chem. Appl.* 3 (2005) 55–68.
- [33] R. Gong, Y. Ding, H. Lio, Q. Chen, Z. Liu, Lead biosorption and desorption by intact and pretreated *Spirulina maxima* biomass, *Chemosphere* 58 (2005) 125–130.
- [34] Z. Aksu, U. Açýkel, E. Kabasakal, S. Tezer, Equilibrium modelling of individual and simultaneous biosorption of chromium(VI) and nickel(II) onto dried activated sludge, *Water Res.* 36 (2002) 3063–3073.
- [35] M.Y. Anca, G. Bayramoglu, M. Yilmaz, S. Bektas, Ö. Genç, Biosorption of Hg²⁺, Cd and Zn by Ca-alginate and immobilized wood-rotting fungus *Funalia troglis*, *J. Hazard. Mater.* 135 (2004) 191–199.
- [36] Z. Aksu, G. Dönmez, Binary biosorption of cadmium(II) and nickel(II) onto dried *Chlorella vulgaris*: Co-ion effect on mono-component isotherm parameters, *Process Biochem.* 41 (2006) 860–868.
- [37] S. Klimmek, J. Stan, A. Wilke, G. Bunke, R. Buchholz, Comparative analysis of the biosorption of cadmium, lead, nickel, and zinc by algae, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 4283–4288.
- [38] G. Vázquez, J. González-Alvarez, S. Freire, M. López-Lorenzo, G. Antorrena, Removal of cadmium and mercury ions from aqueous solution by sorption on treated *Pinus pinaster* bark: kinetics and isotherms, *Bioresour. Technol.* 82 (2002) 247–251.
- [39] K.H. Chong, B. Volesky, Metal biosorption equilibria in a ternary system, *Biotechnol. Bioeng.* 49 (1996) 629–638.
- [40] J.M. Tobin, D.G. Cooper, R.J. Neufeld, Uptake of metal ions by *Rhizopus arrhizus* biomass, *Appl. Microbiol.* 47 (1984) 821–824.
- [41] H. Zheng, J. Yin, Z. Gao, H. Huang, X. Ji, C. Dou, Disruption of *Chlorella vulgaris* cells for the release of biodiesel-producing lipids: a comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 164 (2011) 1215–1224.
- [42] A.M.A. Pistorius, W.J. DeGrip, T.A. Egorova-Zachernyuk, Monitoring of biomass composition from microbiological sources by means of FT-IR spectroscopy, *Biotechnol. Bioeng.* 103 (2009) 123–129.
- [43] M. Vogel, A. Gunther, A. Rossberg, B. Li, G. Bernhard, J. Raff, Biosorption of U(VI) by the green algae *Chlorella vulgaris* in dependence of the pH value and cell activity, *Sci. Total Environ.* 409 (2010) 384–395.
- [44] M.M. Figueira, B. Volesky, H.J. Mathieu, Instrumental analysis study of iron species biosorption by *Sargassum* biomass, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 1840–1846.
- [45] J. Pan, X. Ge, R. Liu, H. Tang, Characteristic features of *Bacillus cereus* cell surfaces with biosorption of Pb(II) ions by AFM and FT-IR, *Colloid Surf. B: Biointerfaces* 52 (2006) 89–95.
- [46] H. Xu, Y. Liu, Mechanisms of Cd²⁺, Cu²⁺ and Ni²⁺ biosorption by aerobic granules, *Sep. Purif. Technol.* 58 (2008) 400–411.