

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA - FEQ

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO

Desenvolvimento de Processos Químicos - ACDPQ

SEQÜESTRO DE DIÓXIDO DE CARBONO EM FOTOBIORREACTORES

Eduardo Jacob Lopes

Orientador: Prof. Dr. Telma Teixeira Franco

Tese de doutorado apresentada a Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Campinas – São Paulo
Dezembro, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

L881s Lopes, Eduardo Jacob
Seqüestro de dióxido de carbono em
fotobiorreatores / Eduardo Jacob Lopes.--
Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Telma Teixeira Franco
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Aquecimento global. 2. Dióxido de carbono.
3. Bioreatores. 4. Fotossíntese. 5. Microalga. 6.
Cianobactéria. I. Franco, Telma Teixeira. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Carbon dioxide sequestration in photobioreactors

Palavras-chave em Inglês: Global warming, Carbon dioxide sequestration,
Photobioreactor, Photosynthesis, Microalgae,
Cyanobacteria

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Químicos

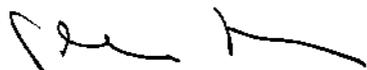
Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Maria Isabel Queiroz, Gustavo Paim Valença,
Ranulfo Monte Alegre, Edson Tomaz

Data da defesa: 03/12/2007

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

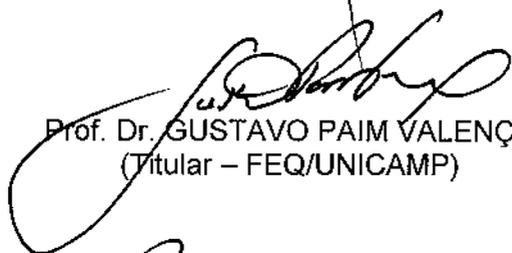
Tese de doutorado defendida por Eduardo Jacob Lopes e aprovada em 3 de dezembro de 2007 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr. TELMA TEIXEIRA FRANCO
(Orientadora – FEQ/UNICAMP)



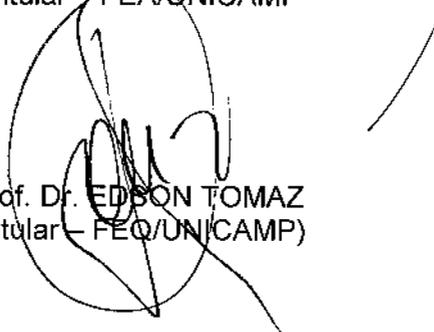
Prof. Dr. MARIA ISABEL QUEIROZ
(Titular – FURG)



Prof. Dr. GUSTAVO PAIM VALENÇA
(Titular – FEQ/UNICAMP)



Prof. Dr. RANULFO MONTE ALEGRE
(Titular – FEA/UNICAMP)



Prof. Dr. EDSON TOMAZ
(Titular – FEQ/UNICAMP)

Este exemplar corresponde à versão final da tese de doutorado em Engenharia Química.

A handwritten signature in black ink, consisting of a large initial 'T' followed by a cursive 'e' and 'l' for 'Telma', and another large initial 'F' followed by a cursive 'r' and 'a' for 'Franco'. The signature is fluid and extends to the right.

Prof. Dr. Telma Teixeira Franco

(Orientadora)

A small, simple handwritten mark consisting of a single diagonal stroke, possibly a checkmark or a signature element, located in the lower right quadrant of the page.

AGRADECIMENTOS

À professora Telma Teixeira Franco pela orientação, oportunidades proporcionadas e agradável convivência.

À meus pais Eduardo Rodrigues Lopes e Helenita Jacob Lopes, pelo exemplo.

À Leila, pela dedicação e contagiante alegria de todos os dias.

A professora Maria Isabel Queiroz, da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, pela colaboração na concepção inicial do trabalho e pelas culturas de Aphanothece.

Aos professores Gustavo Paim Valença e José Roberto Nunhez do departamento de processos químicos da Unicamp, pela sempre presente colaboração.

Aos professores Sérgio Revah, Sérgio Hernández e Keiko Shirai da Universidad Autónoma Metropolitana do México pela oportunidade de treinamento e pesquisa em seus laboratórios.

A equipe de trabalho, composta pelos engenheiros Lucy Mara Cacia Ferreira Lacerda e Silva e Carlos Henrique Gimenes Scoparo pelo trabalho desenvolvido.

Aos órgãos de fomento a pesquisa: FAPESP, CAPES e CNPq.

Ao programa Alfa Polylife (União Européia), em nome do professor Martin G. Peter da Universidade de Potsdam pelas oportunidades de intercâmbio concedidas.

Aos colegas do Laboratório de Engenharia Bioquímica.

Á Deus por tudo que proporciona.

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
Capítulo 1: Introdução geral.....	3
2 Objetivos.....	5
2.1 Objetivo geral.....	5
2.2 Objetivos específicos.....	5
3 Revisão Bibliográfica.....	6
3.1 O potencial biotecnológico das microalgas.....	6
3.2 Aplicação de microalgas no tratamento de resíduos.....	7
3.3 Fotobiorreatores.....	8
3.4 Fatores operacionais do processo.....	10
3.5 Considerações Finais.....	13
4 Referências Bibliográficas.....	15
Capítulo 2: A alternativa fotossintética para a mitigação de dióxido de carbono: uma revisão.....	20
RESUMO.....	21
1 Introdução.....	21
2 Emissões de dióxido de carbono.....	22
3 Protocolo de Kyoto.....	23
4 Microalgas.....	25
4.1 Metabolismo fotossintético.....	26
5 Mecanismos de concentração de carbono em microalgas.....	27
6 Fotobiorreatores.....	28
6.1 Transferência de dióxido de carbono em fotobiorreatores.....	29
6.2 Condições operacionais.....	30
7 Remoção de dióxido de carbônico a partir do cultivo de microalgas.....	32
8 Usos potenciais da biomassa.....	36
9 Aplicabilidade do processo.....	38
Tabela 3: Patentes relacionadas a processos de seqüestro de carbono em fotobiorreatores por microalgas.....	38
10 Perspectivas Futuras.....	39
Capítulo 3: Produção de biomassa e fixação de dióxido de carbono em fotobiorreatores tubulares por <i>Aphanothece microscopica Nægeli</i>.....	54
RESUMO.....	55
1 Introdução.....	55
2 Considerações Cinéticas.....	56
3 Material e Métodos.....	57
3.1 Microrganismo e meio de cultura.....	57
3.2 Fotobiorreator.....	57
3.3 Obtenção e análise dos dados cinéticos em reator de bancada.....	57
3.4 Métodos Analíticos.....	58
4 Resultados e Discussão.....	59
5 Conclusão.....	68
6 Referências Bibliográficas.....	69
Capítulo 4: Taxas de remoção de dióxido de carbono em fotobiorreatores tubulares por <i>Aphanothece microscopica Nægeli</i>.....	72
RESUMO.....	73
1 Introdução.....	73
2 Modelagem Cinética.....	74
3 Material e Métodos.....	75
3.1 Microrganismo e meio de cultura.....	75
3.2 Fotobiorreator.....	75

3.3 Obtenção e análise dos dados cinéticos em reator de bancada.....	76
3.4 Determinação da concentração de CO ₂ dissolvido e obtenção dos perfis de concentração...	76
3.5 Métodos Analíticos.....	77
4 Resultados e Discussão.....	77
5 Conclusão.....	86
6 Referências Bibliográficas.....	87
Capítulo 5: Fixação biológica de dióxido de carbono em reatores de coluna de bolhas	90
RESUMO.....	91
1 Introdução.....	91
2 Material e Métodos	92
2.1 Microrganismo e meio de cultura	92
2.2 Fotobiorreator	92
2.3 Obtenção dos dados cinéticos	92
2.4 Análise dos dados cinéticos.....	93
2.5 Métodos Analíticos.....	94
3 Resultados e Discussão.....	94
4 Conclusão.....	99
5 Referências Bibliográficas.....	99
Capítulo 6: Efeito dos ciclos de luminosidade (escuro/claro) na fixação de CO₂ por microalgas em fotobiorreatores	102
RESUMO.....	103
1 Introdução.....	103
2 Material e Métodos	104
2.1 Microrganismo e meio de cultura	104
2.2 Fotobiorreator	104
2.3 Obtenção dos dados cinéticos	104
2.4 Parâmetros cinéticos.....	105
2.5 Métodos Analíticos.....	105
3 Resultados e Discussão.....	106
4 Conclusão.....	111
5 Referências Bibliográficas.....	111
Capítulo 7: Desenvolvimento de estratégias operacionais para a remoção de dióxido de carbono em fotobiorreatores	114
RESUMO.....	115
1 Introdução.....	115
2 Material e Métodos	116
2.1 Microrganismo e meio de cultura	116
2.2 Fotobiorreatores.....	116
2.3 Obtenção dos dados cinéticos	117
2.4 Modelagem cinética	117
2.5 Métodos Analíticos.....	118
3 Resultados e Discussão.....	120
3.1 Reatores descontínuos com operação simples.....	120
3.2 Reatores descontínuos com recirculação do ar.....	123
3.3 Reatores em série de dois estágios	126
3.4 Capacidade global de seqüestro de carbono	127
4 Conclusão.....	128
5 Referências Bibliográficas.....	128
Capítulo 8: Conclusão geral.....	131
Conclusão.....	132
Capítulo 9: Sugestão para trabalhos futuros.....	134
Sugestão para Trabalhos Futuros.....	135
Capítulo 10: Anexo I	136

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1: Utilização de microalgas em processos de fixação de CO ₂	33
Tabela 2: Usos potenciais da biomassa	37
Tabela 3: Patentes relacionadas a processos de seqüestro de carbono em fotobiorreatores por microalgas.....	38

Capítulo 3

Tabela 1: Valores das variáveis independentes para os diferentes níveis do planejamento .	58
Tabela 2: Parâmetros cinéticos para a <i>Aphanothece microscopica Nägeli</i>	62
Tabela 3: Matriz codificada do efeito da temperatura, luminosidade e concentração de CO ₂ na taxa de carbono incorporado à biomassa	64
Tabela 4: Coeficientes do modelo estimados por regressão linear	65
Tabela 5: Análise de variância para o ajuste do modelo	68

Capítulo 4

Tabela 1: Valores das variáveis independentes para os diferentes níveis do planejamento .	76
Tabela 2: Parâmetros cinéticos para a taxa de remoção de dióxido de carbono	79
Tabela 3: Matriz codificada do efeito da temperatura, luminosidade e concentração de CO ₂ na taxa de remoção de dióxido de carbono	81
Tabela 4: Coeficientes do modelo estimados por regressão linear	82
Tabela 5: Análise de variância para o ajuste do modelo	86

Capítulo 6

Tabela 1: Parâmetros cinéticos para <i>Aphanothece microscopica Nägeli</i>	108
--	-----

Capítulo 7

Tabela 1: Cinética de remoção de dióxido de carbono em reator RCB com recirculação	124
Tabela 2: Cinética de remoção de dióxido de carbono em reator RAL com recirculação	125
Tabela 3: Capacidade diária de seqüestro de carbono dos reatores.....	128

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 3

Figura 1: Diagrama experimental.....	57
Figura 2: Curvas de crescimento em função da temperatura, luminosidade e concentração de CO ₂	60
Figura 3: Variação do pH em função do tempo de residência para as diferentes condições.....	63
Figura 4: Superfícies de resposta e diagramas de contorno para a variável taxa de carbono incorporado a biomassa.....	66

Capítulo 4

Figura 1: Ajuste dos dados experimentais pelo método integral de análise para cinética de primeira ordem.....	78
Figura 2: Superfícies de resposta e diagramas de contorno para a variável taxa de remoção de dióxido de carbono	85

Capítulo 5

Figura 1: Variação da concentração celular (A) e velocidades volumétricas de formação de células (B).....	94
Figura 2: Variação do pH em função do tempo de residência (A) e variação do pH em função da concentração celular (B)	95
Figura 3: Análise de dados cinéticos pelo método diferencial	96
Figura 4: Variação da composição química da biomassa.....	97
Figura 5: Taxas de carbono incorporado à biomassa	98

Capítulo 6

Figura 1: Curva de crescimento em regime contínuo de luz.....	106
Figura 2: Curvas de crescimento em diferentes ciclos de luminosidade	107
Figura 3: Percentual de carbono fixado em relação a condições contínuas de luminosidade.....	110

Capítulo 7

Figura 1: Diagramas experimentais	119
Figura 2: Dados cinéticos para reator RCB com operação simples.....	120
Figura 3: Dados cinéticos para reator RAL com operação simples	123
Figura 4: Dados do reator RCB com recirculação do ar para cinética do processo	124
Figura 5: Dados do reator RAL com recirculação do ar para cinética do processo.....	125
Figura 6: Dados cinéticos para dois reatores RCB em série.....	126
Figura 7: Dados cinéticos para dois reatores RAL em série	127

NOMENCLATURA

μ : velocidade específica de crescimento (h^{-1})
X: concentração celular ($mg.L^{-1}$)
t: tempo de residência (h)
 μ_{max} : velocidade máxima específica de crescimento (h^{-1})
tg: tempo de geração (h)
 R^2 : coeficiente de determinação
 X_{max} : concentração celular máxima ($mg.L^{-1}$)
 t_{log} : tempo de duração da fase logarítmica de crescimento (h)
CB: taxa de carbono incorporado a biomassa ($mg.L^{-1}.h^{-1}$)
 C_c : Percentual de carbono da biomassa (%)
 M_{CO_2} : peso molecular do CO_2
 M_C : peso molecular do carbono
Y: Variável resposta
 X_1, X_2, X_3 : variáveis independentes do modelo estatístico
 β : parâmetros do modelo estatístico
[CO_2]: concentração de dióxido de carbono ($mg.L^{-1}$)
 r_{CO_2} : taxa de remoção de dióxido de carbono ($mg.L^{-1}.h^{-1}$)
k: constante da velocidade de reação (min^{-1})
 k_1 : constante da velocidade de absorção de dióxido de carbono (min^{-1})
 k_2 : constante da velocidade de dessorção de dióxido de carbono (min^{-1})
 k_R : constante da velocidade resultante de remoção de dióxido de carbono (min^{-1})
 k_1/k_2 : razão entre a constante da velocidade de absorção e dessorção de CO_2
n: ordem da reação
 r_x : taxa de formação de células ($mg.L^{-1}.h^{-1}$)
 P_x : produtividade volumétrica de biomassa (g/L.dia)
 X_m : concentração celular em $t=n$ ($g.L^{-1}$)
 X_0 : concentração celular em $t=0$ ($g.L^{-1}$)
 t_f : tempo de residência celular em $t=n$ (h)
CE: Capacidade de eliminação ($g/m^3.min$)
ER: Eficiência de remoção (%)
 C_T : concentração de dióxido de carbono na entrada do sistema (g/m^3)
 C_e : concentração de dióxido de carbono na saída do sistema (g/m^3)
Q: fluxo gasoso (m^3/min)
 V_R : volume do reator (m^3)
 V_T : volume do somatório entre o tanque de armazenamento e o reator (m^3)
r: velocidade de consumo de dióxido de carbono ($g/m^3.min$)
 $d(CO_2)/dt$: velocidade de consumo de CO_2 no tanque de armazenamento ($g/m^3.min$)

RESUMO

A conversão fotossintética de dióxido de carbono em fotobiorreatores foi investigada com o propósito do desenvolvimento de um sistema biológico para o seqüestro de carbono. O processo utilizado consiste na transferência de dióxido de carbono gasoso para a fase líquida de um reator, no qual este composto é convertido em produtos do metabolismo fotossintético pela atividade de microalgas. Em face disto, o trabalho teve por objetivos: (1) avaliar o cultivo fotossintético da microalga *Aphanothece microscopica Nägeli* em diferentes condições de temperatura, intensidade luminosa e concentração de dióxido de carbono; (2) avaliar a cinética de absorção/dessorção de dióxido de carbono em fotobiorreatores; (3) definir as condições operacionais apropriadas para a remoção biológica de carbono; (4) avaliar os efeitos dos ciclos de luminosidade na fixação de dióxido de carbono e (5) estudar diferentes configurações e modos de operação de fotobiorreatores para remoção de CO₂. A capacidade de seqüestro de carbono do sistema foi considerada através de análises dos perfis de CO₂ livre na fase líquida do sistema, medidas das concentrações da fase gasosa e conversão estequiométrica em biomassa. Os resultados obtidos demonstraram a importância dos parâmetros operacionais avaliados na fixação de carbono em biomassa, bem como na remoção de global de CO₂. O uso da metodologia de superfície de resposta foi adequada na otimização do processo, a qual resultou em um acréscimo superior a 58% nas densidades celulares máximas. O efeito da duração do ciclo de luz foi determinante no desempenho do processo, resultando em reduções de eficiências máximas de até 99,69%. As configurações de reatores estudadas demonstraram o melhor desempenho dos sistemas air-lift, quando comparados aos reatores de coluna de bolhas. Quanto ao modo de operação, os sistemas com recirculação do ar contaminado demonstraram-se eficientes para o abatimento de reduzidas quantidades de dióxido de carbono, embora as séries de dois reatores ligados em série tenham maior eficiência e capacidade de eliminação de dióxido de carbono. O atual estágio de desenvolvimento deste trabalho evidenciou o potencial da aplicação deste tipo de reator em processos de seqüestro de carbono, devido às elevadas taxas de eliminação obtidas. Entretanto, apenas a caracterização parcial das rotas de conversão fotossintética de CO₂ foi considerada.

Palavras chave: aquecimento global, seqüestro de dióxido de carbono, fotobiorreatores, fotossíntese, microalgas/cianobactérias.

ABSTRACT

The photosynthetic conversion of carbon dioxide in photobioreactors was investigated with the objective of developing a biological carbon sequestering system. The process used consisted of transferring gaseous carbon dioxide to the liquid phase of a reactor, in which this compound was converted into photosynthetic metabolism products by the activity of microalgae. Considering this, the objectives of the present work were: (1) evaluate the photosynthetic culture of the microalgae *Aphanothece microscopica Nägeli* under different conditions of temperature, light intensity and carbon dioxide concentration; (2) evaluate the absorption/desorption kinetics of carbon dioxide in photobioreactors; (3) define the appropriate operational conditions for the biological removal of carbon; (4) evaluate the effects of light cycles on the fixation of carbon dioxide and (5) study different configurations and operational modes of photobioreactors for the removal of CO₂. The carbon sequestering capacity of the system was considered from an analysis of the free CO₂ profiles in the liquid phase of the system, measurements of the gas phase concentration and the stoichiometric conversion into biomass. The results obtained demonstrated the importance of the operational parameters evaluated in the fixation of carbon in biomass, as also in the overall removal of CO₂. The use of response surface methodology was adequate to optimise the process, and resulted in an increase greater than 58% in the maximum cell density. The effect of the duration of the light cycle was determinant in process performance, resulting in reductions in maximum efficiency of up to 99.69%. The configurations of the reactors studied demonstrated the superior performance of airlift systems, as compared to bubble-column reactors. With respect to operational mode, the systems involving the recirculation of contaminated air were shown to be efficient in decreasing reduced amounts of carbon dioxide, although two reactors connected in series were more efficient and showed greater capacity in eliminating carbon dioxide. The current stage of development of this work is evidence of the potential for the application of this type of reactor in carbon sequestering processes, due to the elevated elimination rates. However, only the partial characterisation of the photosynthetic CO₂ conversion routes was considered.

Keywords: global warming, carbon dioxide sequestration, photobioreactor, photosynthesis, microalgae/cyanobacteria.

Capítulo 1

Introdução geral

1 Introdução

O desenvolvimento de tecnologias para o seqüestro de dióxido de carbono de grandes fontes emissoras é considerado um fator determinante para evitar os sérios impactos das alterações antropogênicas introduzidas no clima das diversas regiões do planeta (Mathews, 2007).

Os inúmeros desafios científicos e econômicos que ainda existem, evidenciam a necessidade do desenvolvimento e análise de projetos capazes de captar e armazenar as substanciais quantidades de dióxido de carbono emitidas para a atmosfera (Russ & Criqui, 2007).

As estratégias para reduzir as emissões de CO₂ vêm sendo abordadas em três direções principais: reduzir a quantidade de energia utilizada, através de mudanças comportamentais; ampliar e desenvolver fontes de energia que não adicionem dióxido de carbono a atmosfera e mitigar as emissões deste composto em áreas de grande geração de ar contaminado, em processos conhecidos como seqüestro de carbono (IPCC, 2007).

A análise destas estratégias evidencia que nenhuma das opções citadas está em condições de aplicação em grande escala. O sistema energético do mundo é demasiadamente amplo. O desenvolvimento urbano, agrícola e industrial requer uma crescente demanda de energia para impulsionar as atividades. Além disso, a dependência por combustíveis fósseis como o petróleo e o carvão, resulta em emissões cada vez mais crescentes de dióxido de carbono para a atmosfera. O uso massivo de biocombustíveis, que resultam em nenhum ou reduzidos níveis de emissões de gases de efeito estufa teria que transformar a atual matriz energética do planeta até estar em condições de aplicação na escala necessária. O desenvolvimento das duas primeiras estratégias é essencial, mas sem dúvida nenhuma o trabalho adicional deve ser conduzido na direção do desenvolvimento de sistemas para o seqüestro de CO₂, que resultaria em menores alterações sociais, passíveis de aplicação em médio prazo (Schrag, 2007).

Desta forma, o domínio destas tecnologias em condições de uso na escala requerida é o desafio a ser ultrapassado, no momento que as sociedades decidirem solucionar estes efeitos. Em face disto, o trabalho teve por objetivo avaliar o seqüestro de dióxido de carbono em fotobiorreatores por microalgas.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o desempenho de fotobiorreatores no seqüestro de dióxido de carbono utilizando a cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli*.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar o cultivo fotossintético da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli* em diferentes condições de temperatura, intensidade luminosa e concentração de CO₂;

Avaliar a cinética de absorção/dessorção de dióxido de carbono em fotobiorreatores;

Definir as condições operacionais apropriadas para a fixação biológica de carbono;

Avaliar os efeitos dos ciclos de luminosidade na fixação de dióxido de carbono em fotobiorreatores;

Avaliar diferentes configurações e modos de operação de fotobiorreatores para remoção de CO₂.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 O potencial biotecnológico das microalgas

As características metabólicas das microalgas fazem com que estes microrganismos apresentem uma importante fonte de recursos a serem explorados. Associado ao metabolismo fotossintético, a respiração e a fixação de nitrogênio constituem importantes rotas metabólicas, passíveis de serem exploradas biotecnologicamente para diversos propósitos (Subramanian & Thajuddin, 2005).

Uma vez que a produtividade por unidade de área destes organismos é muito elevada, quando comparada a processos convencionais de produção de nutrientes, estes microrganismos constituem uma importante reserva de proteínas e outras substâncias celulares que podem ser utilizadas, desde que bem exploradas tecnologicamente (Jacob-Lopes et al., 2006).

Por outro lado, as microalgas apresentam um importante potencial de aplicação em biotecnologia ambiental, como resultado de suas habilidades em assimilar nutrientes como matéria orgânica, NO_3^- , PO_4^{3-} , NH_4^+ , CO_2 e metais pesados (Zepka et al., 2007; Ono & Cuello, 2007; Peña-Castro et al., 2004).

Neste sentido, a possibilidade de associar o tratamento de resíduos com a produção de insumos, vêm sendo explorada em trabalhos, que visam a estabilização dos compostos poluentes, com produção paralela de biomoléculas de interesse comercial, como por exemplo, pigmentos, ácidos graxos, fertilizantes e biocombustíveis como H_2 , CH_4 e biodiesel (Jacob-Lopes et al., 2007; Chisti, 2007).

Entretanto, a falta de um conhecimento fundamental dos bioprocessos relacionados a estes organismos tem limitado a sua utilização com propósitos de biorremediação. Um conhecimento mais detalhado da utilização de microalgas em sistemas de tratamento de resíduos tem sido relatado em tratamento de efluentes em lagoas de alta taxa (Oswald, 1988), com algumas pesquisas relacionadas à utilização no tratamento de efluentes industriais e urbanos (Martínez et al., 2000; Tam & Wong, 2000).

Desta forma, existe a necessidade de uma maior exploração do potencial biotecnológico de microalgas, em processos de engenharia ambiental, visando à estabilização dos poluentes, com utilização paralela dos compostos formados.

3.2 Aplicação de microalgas no tratamento de resíduos

Tratamento de efluentes utilizando microalgas possuem menores custos e são mais eficientes que os processos convencionais de estabilização biológica. Estes sistemas permitem a remoção simultânea de compostos carbonatados, nitrogenados e fosforados que são removidos em diferentes etapas nos sistemas convencionais de tratamento de efluentes (Queiroz et al., 2007).

A assimilação das diferentes formas de carbono inorgânico como, por exemplo, CO_2 , HCO_3^- e CO_3^{2-} é favorecida em detrimento das formas orgânicas de carbono, uma vez que a fotossíntese é o metabolismo energético preferencial das microalgas. No entanto, as células quando submetidas a regimes de ausência de luminosidade passam imediatamente a utilizar o metabolismo respiratório, a partir da assimilação de diferentes formas de carbono orgânico para a manutenção de suas estruturas (Fay, 1983).

O acoplamento da remoção de nutrientes inorgânicos em processos de uma simples etapa caracteriza-se como uma vantagem adicional na utilização destes organismos. Desta forma, a remoção de nutrientes inorgânicos por microalgas, envolve diferentes mecanismos biológicos e físico-químicos (Lei et al., 2007; Bich et al., 1999; Talbot & De la Noüe, 1993). Estes organismos são eficientes em utilizar nitrogênio para a formação de proteínas (que constituem entre 45 a 70% do peso seco) e fósforo, para a síntese de ácidos nucleicos e fosfolipídeos (Borowitzka, 1988). Em adição a assimilação metabólica, mecanismos físico-químicos como volatilização de amônia, precipitação de fósforo e adsorção celular, contribuem para as elevadas taxas de remoção dos compostos presentes nos meios de cultivo.

Além destes compostos, as microalgas vêm sendo aplicadas satisfatoriamente na remoção de metais pesados, já que possuem uma elevada afinidade com cátions polivalentes. Em processos fotossintéticos, em que ocorre a elevação do pH, a precipitação dos metais é favorecida, contribuindo substancialmente para a detoxificação dos efluentes (Chojnacka et al., 2005). Por outro lado, Oswald (1995) e Schumacher et al., (2003) relatam que a elevação do pH e da concentração de oxigênio dissolvido durante a fotossíntese contribui para a redução de patógenos de águas residuárias.

Além da mitigação de poluentes líquidos, nos últimos anos, houve um crescente interesse na aplicação de microalgas para o tratamento de ar poluído. Estes estudos, estão sendo focados na remoção biológica de dióxido de carbono e outros gases como NO_x e SO_x produzidos por processos de combustão de energia fóssil (Berberoglu et al.,

2007; Ono & Cuello, 2006; Kajiwara et al., 1997; Brown, 1996). Estes processos, no entanto, necessitam do acesso da energia luminosa, que deve ser provida a partir de fontes naturais, para que os sistemas não gerem poluentes secundários, de forma que a indisponibilidade da energia solar em períodos integrais de tempo é um fator limitante na conversão biológica de dióxido de carbono. Por outro lado, esta limitação pode ser suprida através da utilização de microalgas para o tratamento simultâneo de efluentes líquidos e gasosos, no qual os metabolismos fotossintéticos e respiratório poderiam ser utilizados em função da disponibilidade da energia luminosa (Yun et al., 1997).

3.3 Fotobiorreatores

Fotobiorreatores podem ser definidos como sistemas utilizados para o desenvolvimento de reações fotossintéticas. Estes equipamentos podem ser classificados de acordo com o modo de alimentação da mistura reagente (descontínuo ou contínuo), através do tipo de escoamento (mistura completa ou pistonado), pelo tipo de cultivo empregado (células livres ou imobilizadas) e através da configuração do biorreator (reatores abertos ou fechados) (Muñoz, 2005).

Os processos que utilizam reatores contínuos consistem na adição contínua do meio reacional a uma determinada taxa ao reator, sendo retirado paralelamente na mesma proporção os produtos da reação, juntamente com o meio tratado. Este é o método de operação mais largamente difundido para o tratamento de grandes quantidades de compostos poluentes. Por outro lado, as operações descontínuas são realizadas através de um processo de pelo menos quatro etapas, que consistem na alimentação do reator, na reação propriamente dita, na separação de parte da biomassa e na descarga do reator, sendo parte da biomassa produzida, utilizado como inóculo no próximo ciclo. Estes sistemas permitem um melhor controle operacional, estando limitado a aplicações em pequena escala (Merchuk et al., 1994).

Durante o tratamento biológico contínuo de poluentes, a eficiência do processo, a estabilidade e os custos são significativamente influenciados pela hidrodinâmica do meio reacional. Os reatores de mistura completa são caracterizados pela intensa homogeneização da cultura. A concentração do composto poluente é a mesma em qualquer parte do sistema, bem como na saída do reator. Por outro lado, nos reatores de fluxo pistonado, o meio reacional move-se através do reator sem que ocorra a mistura radial dos poluentes, de forma que a estabilização ocorre através de gradientes de concentração na direção longitudinal do sistema (Nielsen et al., 2003). Desta forma, os

reatores de mistura completa são utilizados preferencialmente quando os compostos poluentes provocam a inibição celular, uma vez que permitem a diluição das concentrações. Quando não há problemas de inibição, os reatores tubulares são preferidos, por permitirem o cultivo de microrganismos em elevadas concentrações de nutrientes, favorecendo a taxa de crescimento (Tchobanoglous et al., 2003). Os reatores de fluxo pistonado, entretanto, não são comumente utilizados em sistemas com microalgas, devido à necessidade de agitação intensa associado a elevadas áreas de exposição à energia luminosa, características facilmente obtidas em sistemas de tanques agitados (Grobblelaar, 1994). As configurações mais comuns utilizadas em fotobiorreatores são os reatores tubulares (coluna de bolhas e air-lift), reatores do tipo flat-plate e sistemas tubulares arranjados em espiral (Merchuk & Wu, 2004; Molina Grima et al., 1999).

Quanto à mobilidade celular, culturas de microalgas suspensas são amplamente utilizadas na produção de proteínas unicelulares e em sistemas com propósito de tratamento de resíduos. Estes sistemas oferecem um melhor controle do processo, homogeneização da mistura reacional e utilização da energia luminosa. Entretanto, processos com células imobilizadas em matrizes poliméricas como carragena, quitosana e alginato têm sido frequentemente empregados visando facilitar os problemas relacionados à separação das células ao final do processo, bem como a manutenção do fluxo pistonado em reatores tubulares (Lin et al., 2003; Chevalier & De la Nöue, 1985).

Em termos de configuração, fotobiorreatores para o cultivo de organismos fotossintéticos, são classificados em sistemas abertos, no qual os sistemas de cultivos estão expostos em contato direto com a atmosfera e sistemas fechados em que o contato com a atmosfera é significativamente reduzido ou inexistente. Os fotobiorreatores abertos têm sido extensivamente utilizados para o cultivo em massa de microalgas e para o tratamento de efluentes domésticos. As principais configurações destes sistemas referem-se a tanques retangulares, tanques circulares e tanques do tipo raceway (Lee & Lee, 2003; Pulz, 2001). A limitação destes sistemas está fundamentada nas elevadas taxas de evaporação de água, requerimento de amplas áreas para a construção, dificuldade de controle operacional, baixa produtividade e elevados riscos de contaminação (Racault & Boutin, 2005). Uma alternativa aos fotobiorreatores abertos, são sistemas fechados, que possibilitam uma grande variedade de configurações e incrementam significativamente o desempenho dos cultivos. Segundo Borowitzka (1999) fotobiorreatores para o cultivo em massa de microalgas e para a bioremediação de compostos poluentes devem ser dimensionados a partir dos seguintes critérios: elevada eficiência de utilização da energia

luminosa, possuir eficiente sistema de mistura e controle das condições da reação, baixo estresse hidrodinâmico das células e facilidade de escalonamento.

Neste sentido, o potencial da aplicação de fotobiorreatores em processos de engenharia ambiental tem sido tradicionalmente subestimado, devido à baixa produtividade dos sistemas abertos de cultivo, associado a sistemas fechados dimensionados inadequadamente. Entretanto, altas produtividades e taxas de remoção de compostos podem ser esperadas através da adequação dos sistemas a espécie de microalga e aos compostos poluentes a serem degradados.

3.4 Fatores operacionais do processo

Uma importante limitação inerente a todos os processos biológicos é a sensibilidade dos sistemas a fatores ambientais (pH, luminosidade, temperatura, concentração de O_2), fatores bióticos (predação e contaminação) ou fatores operacionais (agitação e mistura, tempo de residência hidráulica, recirculação de células, concentração dos poluentes). Desta forma, um profundo conhecimento da influência destes fatores nos processos de bioconversão é requerido para o sucesso do processo (Muñoz & Guieysse, 2006).

O efeito do pH em reatores para o cultivo de microalgas é complexo, uma vez que existe dificuldades em dissociar os efeitos diretos do crescimento microbiano, dos efeitos colaterais expressos em termos de modificações no sistema $CO_2/HCO_3^-/CO_3^{2-}$, bem como no equilíbrio NH_3/NH_4^+ (Berenguel et al., 2004). O consumo das diferentes formas inorgânicas de carbono por microalgas causa a elevação do pH, uma vez que o aparato fotossintético destes organismos é capaz de transportar os íons hidróxido para o exterior da célula, através da reação catalisada pela enzima anidrase carbônica, associado à captação de íons H^+ para o interior das membranas tilacóides (Cuaresma et al., 2006). Além disso, a elevação do pH a valores que variam entre 8-11 auxilia na desinfecção de patógenos das águas residuárias, já que em valores de pH superiores a 10 é verificada uma completa inibição bacteriana em lagoas de estabilização (Oswald, 1988). Por outro lado, o pH influencia ainda as eficiências de remoção de nitrogênio e fósforo através da volatilização da amônia e precipitação de ortofosfato (Nurdogan & Oswald, 1995). Embora haja diversas interações do pH neste tipo de sistema, a relativa facilidade de controle é considerada um benefício adicional em processos biológicos de tratamento.

A temperatura é outro fator ambiental de importância no desempenho de fotobiorreatores. A eficiência de sistemas que utilizam microalgas normalmente decresce em temperaturas excessivas e reduzidas. De acordo com Grossman et al., (1994), a temperatura ótima para o desenvolvimento de microalgas situa-se na faixa de 25 a 35°C. Entretanto, Chevalier et al., (2002) reportam a possibilidade da pré-adaptação das culturas a valores de temperaturas fora da faixa considerada ideal, visando à otimização de biorreatores para aplicação em escala industrial. Por outro lado, o controle de temperatura nos valores definidos como ideal para um determinado sistema pode ser obtido através da instalação de sistemas para a troca térmica, que embora elevem a eficiência de tratamento, possuem como principal desvantagem o elevado custo (Tredice, 1999).

A intensidade luminosa é um fator que determina a atividade microbiana em fotobiorreatores. O aumento deste parâmetro ocasiona a melhoria da eficiência fotossintética das células, até determinados níveis, em que o aparato fotossintético torna-se saturado, com subsequente redução do metabolismo celular, em um fenômeno conhecido por fotoinibição (Kajiwara et al., 1997). Esta relação é válida principalmente em períodos em que os reatores possuem baixas densidades celulares no qual as células recebem grandes quantidades de energia, como por exemplo, durante o start-up dos processos (Göksan et al., 2003). Além da intensidade luminosa, a duração dos ciclos de luz no sistema (fotoperíodos), é um fator a ser considerado no projeto de fotobiorreatores, uma vez que alterações na duração das fases clara/escuro ocasionam profundas mudanças na eficiência fotossintética dos sistemas (Janssen et al., 2001).

A concentração de oxigênio dissolvido é outro fator a ser considerado em cultivos fotossintéticos. Similar ao que ocorre com o pH, existe uma dificuldade de analisar os efeitos provocados pela solubilização do oxigênio, proveniente da agitação fornecida pela corrente de ar, do oxigênio gerado fotossinteticamente, através das reações de Hill, no qual ocorre liberação O_2 (Fay, 1983). Segundo Oswald (1988) níveis extremos de O_2 dissolvido podem gerar danos foto-oxidativos nas células com redução paralela da eficiência de tratamento. Entretanto, como o oxigênio é um produto do metabolismo fotossintético, sua formação e solubilização em fotobiorreatores é um indicativo de elevadas taxas de consumo de carbono inorgânico (Muñoz et al., 2004).

No que se refere aos fatores bióticos, expressos em termos de predação e contaminação em fotobiorreatores, existe a possibilidade de contaminação dos sistemas por fungos e bactérias, além da formação de cadeias alimentares, que ocasionam em uma última análise a interrupção dos processos (Munõz, 2005). No entanto, de acordo

com este autor as condições extremas de operação de fotobiorreatores para o tratamento de poluentes, reduz em grande parte o crescimento de microrganismos indesejáveis, devendo-se considerar em casos mais complexos as questões referentes à configuração (reatores abertos) e modo de alimentação da mistura reagente (operação contínua), que favorecem a contaminação dos sistemas.

Quanto aos fatores operacionais de importância em fotobiorreatores, os sistemas de agitação e mistura desde que dimensionados adequadamente, previnem uma série de problemas operacionais, como por exemplo: (1) sedimentação celular, que pode levar ao acúmulo e decomposição anaeróbica da biomassa dentro do reator; (2) gradientes de temperatura e concentração de nutrientes; (3) melhoria na transferência de massa, em casos de compostos de baixa solubilidade e (4) movimento das células através das zonas de claro/escuro do reator (Grobbelaar, 2000). Além disso, devido à sensibilidade celular da maioria das espécies de microalgas, um sistema de agitação e mistura inadequado pode causar danos nas células (estresse hidrodinâmico), com subsequente redução do desempenho microbiano na depleção dos compostos poluentes (Merchuk & Wu, 2004).

O tempo de retenção hidráulica é por definição o período médio de tempo em que o líquido permanece dentro do reator, correspondente ao tempo utilizado no tratamento biológico. Este parâmetro determina o tamanho do reator a ser utilizado, a concentração de biomassa no sistema, bem como a eficiência de remoção de um determinado composto (Muñoz et al., 2004).

Os aspectos relacionados com a densidade celular presente nos fotobiorreatores, expressas em termos de concentração celular inicial, recirculação e separação de células determinam o desempenho dos sistemas de tratamento de poluentes. A quantidade de células presentes inicialmente no reator está relacionada com a disponibilidade de energia luminosa, bem como com as taxas de remoção dos compostos (Janseen et al., 2003). Desta forma, ocorre o estabelecimento de valores de concentração celular críticos, uma vez que existe a necessidade das células captarem eficientemente a energia luminosa, associado a problemas relativos à agregação e formação de flocos celulares em sistemas muito densos (Richardson & Jackson, 2007). O reciclo de células é considerado a estratégia mais comum para a retenção de biomassa nos reatores, visando obter elevadas concentrações de microalgas, podendo-se obter estas condições também por imobilização celular (Chevalier & De La Nöue, 1985). Finalmente, ao final dos processos de tratamento, a separação da biomassa da fase líquida dos fotobiorreatores faz-se

necessária, com o objetivo de obter efluentes com baixas concentrações de sólidos suspensos e recuperar a biomassa a fim de reutilizá-la (Molina Grima et al., 2003).

Outro fator a ser considerado na análise de fotobiorreatores é a concentração dos poluentes, uma vez que as diferentes formas de compostos carbonatados, nitrogenados e fosforados influenciam no crescimento e assimilação destas substâncias. Neste sentido, Xing et al., (2000) e Queiroz et al., (2007) relatam a importância das razões C/N e N/P no crescimento e consumo de nutrientes em cultivos de microalgas. Estas considerações tornam-se relevantes em fotobiorreatores para o seqüestro de CO₂, no qual a concentração deste composto não deverá ser excessivamente baixa, de modo a limitar a disponibilidade da fonte carbono às células, e também não deverá exceder limites que ocasionem problemas de inibição do crescimento (Cheng et al., 2006). Desta forma, espécies capazes de suportar concentrações de CO₂ entre 12-15% teriam melhor desempenho nestes processos, uma vez que esta é a faixa de concentração de dióxido de carbono obtido durante a queima de combustíveis fósseis (Lee et al., 2002).

3.5 Considerações Finais

O potencial da aplicação de fotobiorreatores utilizando microalgas para o seqüestro de dióxido de carbono foi avaliado durante o curso desta tese de doutorado. Inicialmente, uma detalhada revisão de literatura foi realizada, com o propósito de investigar o atual estágio da tecnologia a ser desenvolvida (Capítulo 1). Este artigo está sendo submetido ao periódico *Chemosphere*.

Experimentalmente, avaliou-se em uma primeira etapa três dos principais fatores operacionais de fotobiorreatores, expressos em termos de temperatura, concentração de dióxido de carbono e luminosidade, com o objetivo de obter elevadas produtividades celulares, com incorporação paralela de carbono na biomassa (Capítulo 2). Este artigo está publicado no periódico *Biochemical Engineering Journal* (*disponível on-line, novembro de 2007*).

Uma vez que a conversão biológica de CO₂ não ocorre exclusivamente em biomassa, as taxas de remoção de dióxido de carbono foram avaliadas na fase líquida do sistema, visando determinar a cinética de eliminação de gás carbônico em fotobiorreatores tubulares de coluna de bolhas (Capítulo 3). Este artigo está publicado no periódico *Chemical Engineering and Processing* (*disponível on-line, junho de 2007*).

Estrategicamente, optou-se por realizar a variação dos parâmetros operacionais através da metodologia de planejamentos experimentais, visando otimizar o sistema idealizado. O uso da metodologia de superfície de resposta proporcionou um significativo aumento nas taxas de carbono incorporado à biomassa, indicando a adequabilidade do método usado para o desenvolvimento do processo (Capítulo 4). Este artigo está sendo submetido ao periódico Brazilian Journal of Chemical Engineering.

O emprego de reações fotossintéticas para seqüestrar CO₂ depende de uma primeira fase do acesso à energia luminosa, que deve ser provida a partir da energia solar, a fim de desenvolver processos de tecnologia limpa. Desta forma, como a energia luminosa natural não está disponível em períodos integrais de tempo, avaliou-se o efeito da duração dos ciclos de luminosidade (claro:escuro) na incorporação celular de carbono (Capítulo 5), demonstrando a redução da eficiência do sistema a medida que se eleva dos períodos de exposição das células ao escuro. Este artigo foi aceito para publicação em fevereiro de 2008 no periódico Chemical Engineering and Processing.

Finalmente, avaliou-se o desenvolvimento de estratégias operacionais para a remoção de dióxido de carbono, no qual duas configurações de reatores (coluna de bolhas e air-lift), operando em três distintos modos (operação simples, com recirculação do ar e em série de dois reatores), foram comparadas com o propósito de determinar o sistema mais adequado a uma dada situação (Capítulo 6). Nesta etapa, os perfis de concentração de dióxido de carbono foram analisados na fase gasosa do reator, visando confirmar as elevadas taxas de remoção obtidas nas medidas da fase líquida do sistema. Este artigo está sendo submetido ao periódico Chemical Engineering Science.

A complexa e dinâmica química do dióxido de carbono capaz de induzir a substanciais variações na concentração de CO₂ nas fases líquidas e gasosas dos fotobiorreatores, dificultou a elucidação das transformações deste composto nas diferentes formas possíveis, situação que possibilitou a identificação parcial das rotas de conversão do dióxido de carbono, que visam em uma última análise o estabelecimento de um balanço de massa do sistema.

Como perspectivas futuras desta tecnologia, faz-se necessário considerar além da conversão de CO₂ em biomassa, exopolímeros, precipitados de espécies químicas e a formação de compostos orgânicos voláteis (VOCs), que são substâncias caracteristicamente produzidas por microalgas em ambientes abertos, havendo poucas informações relacionadas a formação destes compostos em reatores. Além disso, a viabilidade do uso da luz solar como fonte de energia, bem como um adequado

escalonamento do sistema, primeiramente a uma escala piloto torna-se fundamental ao sucesso desta tecnologia, já que existe uma falta de experiência e dados de literatura obtidos a partir de reatores de escala ampliada em condições reais para o tratamento de resíduos por microalgas.

4 Referências Bibliográficas

BERENGUEL, M.; RODRIGUEZ, F.; ACIÉN, F.G.; GARCIA, J.L. Model predictive control of pH in tubular photobioreactors. *Journal of Process Control*.n.14.p.377-387, 2004.

BERBEROGLU, H.; YIN, H.; PILON, L. Light transfer in bubble sparged photobioreactors for H₂ production and CO₂ mitigation. *International Journal of Hydrogen Energy*. *In Press*, 2007.

BICH, N.N.; YAZIZ, M.I.; KAKTI,N. Combination of *Chlorella vulgaris* *Andeichhornia crassipes* for wastewater nitrogen removal. *Water. Research*.v.33.n.10.p.2357-2362, 1999.

BOROWITZKA, M. Micro-algae and wastewater treatment. In: Borowitzka, M. & Borowitzka, L. *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge University Press, 477 pp., 1988.

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

BROWN, L.M. Uptake of carbon dioxide from flue gas by microalgae. *Energy Convers. Mgmt*.v.37.p.1363-1367, 1996.

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

CHENG, L.; ZHANG, L.; CHEN, H.; GAO, C. Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. *Separation and Purification Technology*.n.50.p.324-329, 2006.

CHEVALIER, P.; DE LA NÖUE, J. Efficiency of immobilized hiperconcentrated algae for ammonium and ortho-phosphate removal from wastewaters. *Biotechnology Letters*.n.7.p.395-400, 1985.

CHEVALIER, P.; PROULX, D.; LESSARD, P.; VINCENT, W.F.; DE LA NÖUE, J. Nitrogen and phosphorus removal by high latitude mat-forming cyanobacteria for potential use in tertiary wastewater treatment. *J. Appl. Phycol*.n.12(2).p.105-112, 2002.

CHOJNACKA, K.; CHOJNACKI, A.; GÓRECKA, H. Biosorption of Cr³⁺, Cd²⁺ and Cu²⁺ ions by blue-green algae *Spirulina* sp.: kinetics, equilibrium and the mechanism of the process. *Chemosphere*.v.59.p.75-84, 2005.

CUARESMA, M.; GARBAYO, I.; VEGA, J.M.; VÍLCHEZ, C. Growth and photosynthetic utilization of inorganic carbon of the microalga *Chlamydomonas acidophila* isolated from Tinto river. *Enzyme and Microbial Technology*.n.40.p.158-162, 2006.

FAY, P. The blue greens (cyanophyta – cyanobacteria), 5^o Ed. London, Ed. Edward Arnold, 88pp, 1983.

GÖKSAN, T.; DUMAS, Y.; GOKPINAR, S. Effect of light paths lengths and initial culture density on the cultivation of *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898). *Aquaculture*.n.217.p.431-436, 2003.

GROBBELAAR, J.U. Turbulence in mass algal cultures and the role of light-dark fluctuations. *Journal Appl. Phycol*.n.6.p.331-335, 1994.

GROBBELAAR, J.U. Physiological and technological considerations for optimizing mass algal cultures. *Journal Appl. Phycol*.n.12.p.201-206, 2000.

GROSSMAN, A.R.; SCHAEFER, M.R.; CHIANG, G.G.; COLLIER, J.L. The Responses of cyanobacteria to environmental conditions: light and nutrients. In: Bryant, D. A. *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers.p. 641-668, 1994.

IPCC, Intergovernmental Panel on Climate Change. Carbon dioxide capture and storage. <http://www.ipcc.ch/>, 2007.

JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; NETTO, F. M.; QUEIROZ, M. I. Caracterização da fração protéica da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli* cultivada no efluente da parboilização do arroz. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*.v.26.p.482-488, 2006.

JACOB-LOPES, E., ZEPKA, L. Q., PINTO, L. A. A., QUEIROZ, M. I. Characteristics of thin-layer drying of the cyanobacterium *Aphanothece microscopica Nägeli*. *Chemical Engineering and Processing*.v.46.p.63 – 69, 2007.

JANSSEN, M.; SLENDERS, P.; WINTER, M.; TRAMPER, J.; MUR, L.R.; WIJFFELS, R.H. Photosynthetic efficiency of *Dunaliella tertiolecta* under short light/dark cycles. *Enzyme and Microbial Technology*.n.29.p.298–305, 2001.

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*.n.81.p.193-210, 2003.

KAJIWARA, S.; YAMADA, H.; NARUMASA, O. Design of the bioreactor for carbon dioxide fixation by *Synechococcus* PCC7942. *Energy Convers. Mgmt*.v.38.p.529-532, 1997.

LEE, J.S.; KIM, D.K.; LEE, J.P.; PARK, S.C.; KOH, J.H.; CHO, H.S.; KIM, S.W. Effects of SO₂ and NO on growth of *Chlorella* sp. KR-1. *Bioresource Technology*.n.8.p.1–4, 2002.

LEE, J.S.; LEE, J.P. Review of advances in biological CO₂ mitigation technology. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*.n.8.p.354-359, 2003.

LEI, A.P.; HU, Z.L.; WONG, Y.S.; TAM, N.F.Y. Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species. *Bioresource Technology*.n.98.p.273-280, 2007.

LIN, H.Y.; LEU, J.Y.; LAN, C.R.; LIN,P.; CHANG, F. Kinetics of inorganic carbon utilization by microalgal biofilm in a flat plate photoreactor. *Chemosphere*.n.53.p.779-787, 2003.

MARTÍNEZ, M.E.; SÁNCHEZ, S.; JÍMENEZ, J.M.; YOUSFIS, F.E.; MUÑOZ, L. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*.n.73.p.263-272, 2000.

MATHEWS, J. Seven steps to curb global warming. *Energy Policy*.n.35.p.4247–4259, 2007.

MERCHUK, J.C.; BEN-ZVI, S.; NIRANJAN, K. Why use bubble-column bioreactors? *Trends in Biotechnology*.v.12.p.501-511,1994.

MERCHUK, J.C.; WU, X. Simulation of algae growth in a bench scale internal loop airlift reactor. *Chemical Engineering Science*.n.59.p.2899–2912, 2004.

MOLINA GRIMA, E.; FERNANDÉZ, F.G.A.; CAMACHO, F.G.; CHISTI, Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scale up. *Journal of Biotechnology*.n.70.p.231-247, 1999.

MOLINA GRIMA, E.; BELARBI, E. H.; ACIÉN-FERNANDEZ, F.G.; ROBLES, M. A.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process option and economics. *Biotechnology Advances*.n.20.p.491-515, 2003.

MUÑOZ, R.T. Algal-bacterial photobioreactors for the degradation of toxic organic pollutants. Doctoral Dissertation. Lund University, Sweden, 2005.

MUÑOZ, R.T.; KÖLLNER, C.; GUIEYSSE, B.; MATTIASSON, B. Photosynthetically oxygenated salicylate biodegradation in a continuous stirred tank photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*.n.87.p.797-803, 2004.

MUÑOZ, R.; GUIEYSSE, B. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Research*.n.40.p.2799-2815, 2006.

NIELSEN, J.; VILLADSEN, J.; LIDÉN, G. Scale-up of bioprocesses. In: *Bioreaction Engineering Principles*. Kluwer Academic Publishers, 2003.

NURDOGAN, Y.; OSWALD, W.J. Enhanced nutrient removal in high rate ponds. *Water Science Technology*.n.31.p.31-43, 1995.

ONO, E.; CUELLO, J.L. Carbon dioxide mitigation using thermophilic cyanobacteria. *Biosystems Engineering*.n.96.p.129-134, 2007.

ONO, E.; CUELLO, J.L. Feasibility assessment of microalgal carbon dioxide sequestration technology with photobioreactor and solar collector. *Biosystems Engineering*.v.95.p.597-606, 2006.

OSWALD, W.J. Micro-algae and wastewater treatment. In: Borowitzka, M. & Borowitzka, L. *Micro-algal Biotechnology*. 2th Ed., Sydney, 477 pp., 1988.

OSWALD, W.J. Ponds in the twenty-first century. *Water Science Technology*.n.31.p.1-8, 1995.

PEÑA-CASTRO, J. M.; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F.; ESPARZA-GARCÍA, F.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R.O. Heavy metals removal by the microalga *Scenedesmus incrassatulus* in continuous cultures. *Bioresource Technology*.v.94.p.219-222, 2004.

PULZ, O. Photobioreactors production systems for phototropic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnology*.n.57.p.287-293, 2001.

QUEIROZ, M.I.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L.Q, BASTOS, R.; GOLDBECK, R. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. *Bioresource Technology*.v.98.p.2163-2169, 2007.

RACAULT, Y.; BOUTIN , C. Waste stabilization ponds in France: state of the art and recent trends. *Water Science Technology*.n.12.p.1-9, 2005.

RICHARDSON, T.L.; JACKSON, G.A. Small phytoplankton and carbon export from the surface ocean. *Science*.v.315.p.838-840, 2007.

RUSS, P.; CRIQUI, P. Post-Kyoto CO₂ emission reduction: The soft landing scenario analyzed with POLES and other world models. *Energy Policy*.n.35.p.786–796, 2007.

SCHUMACHER, G.; BLUME, T; SEKOULOV, I. Bacteria reduction and nutrient removal in small wastewater treatment plants by an algal biofilm. *Water Science Technology*. n.47.p.195-202, 2003.

SCHRAG, D.P. Preparing to capture carbon. *Science*.n.315.p.812-813, 2007.

SUBRAMANIAN, G.; THAJUDDIN, N. Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Current Science*.v.89.n.1.p.47-57, 2005.

TALBOT, P.; DE LA NOUE, J. Tertiary treatment of wastewater with *Phormidium bonheri* (Schmidle) under various light and temperature conditions. *Water Research*.n.27.p.153-159, 1993.

TAM, N.F.Y.; WONG, Y.S. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. *Environmental Pollution*. n.107. p.145-151, 2000.

TCHOBANOGLIOUS, G.; BURTON, F.L.; METCALF, D.H, EDDY, A. *Wastewater Engineering: Treatment and reuse*. Mc Graw Hill, 2003.

TREDICE, M.R. Bioreactors. In: *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*. John Wiley & Sons, 1999.

XING, X.H.; JUN, B.M.; YANAGIDA, M.; TANJI, Y.; UNNO, H., 2000. Effect of C/N values on microbial simultaneous removal of carbonaceous and nitrogenous substances in wastewater by single continuous-flow fluidized-bed bioreactor containing porous carrier particles. *Biochemical Engineering Journal*.n.5.p.29-37.

YUN, Y.S.; LEE, S.B.; PARK, J.M.; LEE, C.; YANG, J. Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients. *Journal Chemical Technology and Biotechnology*. N.69.p.451-455, 1997.

ZEPKA, L.Q.; JACOB-LOPES, E.; GOLDBECK, R.; QUEIROZ, M.I. Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica Nägeli* submitted to different drying conditions. *Chemical Engineering and Processing*. *In press*, 2007.

Capítulo 2

A alternativa fotossintética para a mitigação de dióxido de carbono: uma revisão

RESUMO

O incremento das emissões de dióxido de carbono na atmosfera devido ao desenvolvimento industrial, agrícola e urbano é considerado um dos principais problemas ambientais da atualidade. Esta situação vem despertando o interesse científico no desenvolvimento de tecnologias visando reduzir as emissões deste gás. A fixação biológica de gás carbônico a partir de organismos fotossintéticos como as microalgas em fotobiorreatores é considerada uma alternativa frente aos processos convencionais de tratamento, devido à elevada capacidade de remoção de dióxido de carbono destes sistemas. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho é discutir o conceito da conversão fotossintética de CO₂ utilizando fotobiorreatores.

Sumário

1. Introdução
2. Emissões de dióxido de carbono
3. Protocolo de Kyoto
4. Microalgas
 - 4.1 Metabolismo fotossintético
5. Mecanismos de concentração de carbono em microalgas
6. Fotobiorreatores
 - 6.1 Transferência de dióxido de carbono em fotobiorreatores
 - 6.2 Condições operacionais
7. Remoção de CO₂ a partir do cultivo de microalgas
8. Usos potenciais da biomassa
9. Aplicabilidade do processo
10. Perspectivas futuras
11. Referências

1 Introdução

As numerosas evidências que as alterações climáticas globais ocorrem como resultado do aumento das concentrações atmosféricas de gases de efeito estufa tem pressionado o desenvolvimento de estratégias com o propósito de reduzir estas mudanças (IPCC, 2001). O dióxido de carbono é considerado o principal gás de efeito estufa tanto em termos de emissão quanto em relação ao seu potencial de alteração climática. No ano de 1997, os países signatários do Protocolo de Kyoto comprometeram-se em reduzir as emissões de CO₂, em um acordo que estabeleceu a necessidade de

desenvolvimento de processos para o seqüestro de dióxido carbono, de forma que as diversas tecnologias disponíveis para a captação e estocagem de carbono devem ser avaliadas sob o ponto de vista da obtenção de créditos de carbono, visando à estabilização das emissões deste poluente (UNFCCC, 1997). Além das tecnologias disponíveis para uso imediato, outros métodos de captura de CO₂ estão sendo desenvolvidos com aplicação em um futuro próximo. A escolha destas metodologias irá depender de fatores como custo, capacidade de captura, impacto ambiental, velocidade em que a tecnologia possa ser introduzida, além de fatores sociais como, por exemplo, a aceitação pública (IPCC, 2007). Neste sentido, o uso de processos biotecnológicos para a biofixação de dióxido de carbono tem sido considerado como uma possibilidade viável para abater as emissões deste poluente. Estes processos são baseados em reatores usados para o desenvolvimento de reações fotossintéticas, no qual microalgas são utilizadas como biocatalisadores de uma série de reações bioquímicas responsáveis pela conversão de CO₂ em produtos do metabolismo fotossintético (Ono & Cuello, 2007). Em face disto, o objetivo do presente trabalho é discutir um método em potencial para seqüestrar dióxido de carbono, bem como descrever o atual estágio da conversão biológica de CO₂ em fotobiorreatores. Este trabalho foi escrito para facilitar o avanço do conhecimento nesta área de pesquisa.

2 Emissões de dióxido de carbono

Alguns autores reportam que as emissões de dióxido de carbono podem ser responsáveis por aproximadamente 70% do efeito estufa, que é fenômeno atmosférico que possui direta relação com as alterações do clima terrestre (Stewart & Hessami, 2005).

Globalmente, estima-se que mais de 20 bilhões de toneladas de CO₂ são emitidos anualmente a partir da queima de combustíveis fósseis. A magnitude dos ciclos biológicos do carbono influenciado pelas atividades humanas sugere maiores níveis de gerenciamento e mitigação das emissões deste composto para a atmosfera (IPCC, 2007).

Segundo Benetto et al., (2004) a elevação média de 0,6°C na temperatura atmosférica associado à elevação do volume dos oceanos em 10 cm no último século, devido principalmente às elevadas emissões de CO₂ para a atmosfera tem motivado o interesse em pesquisas de maneira a minimizar estes efeitos. Neste sentido, a redução das emissões de CO₂ irá representar nos próximos anos uma relevante contribuição para o desenvolvimento sustentável das atividades humanas.

As fontes de emissões de dióxido de carbono podem ser classificadas em estacionárias, móveis e naturais. Industrialmente, os processos de maior contribuição para a elevação das concentrações atmosféricas de CO₂, consistem em plantas para a

geração de energia elétrica, produção de hidrogênio, amônia, cimento, processos fermentativos e processos de oxidação química. Além do dióxido de carbono emitido industrialmente, contribuem para as emissões estacionárias o CO₂ gerado em residências, edifícios e complexos comerciais e a queimada de florestas e áreas agrícolas. As fontes de emissão móveis são constituídas principalmente pelo dióxido de carbono gerado pelos sistemas de transporte de passageiros e cargas, os quais incluem carros, caminhões, ônibus, aviões, trens e navios. O metabolismo humano e animal, a degradação de plantas e animais e as atividades vulcânicas e oceânicas são as principais fontes naturais de dióxido de carbono. As emissões antropogênicas incluem as fontes estacionárias e móveis, excluindo as fontes naturais (Song, 2006).

Monitoramentos da concentração atmosférica global de CO₂ durante o último século indicam uma elevação da concentração de dióxido de carbono de 295 ppm no ano de 1900 para 377 ppm no ano de 2004, o que representa uma elevação na concentração de CO₂ de 27,8% (Thitakamol et al., 2007).

Deve-se mencionar, entretanto, que o dióxido de carbono atmosférico possui efeitos positivos nos sistemas ecológicos da terra, uma vez que a base da cadeia de produção de alimentos, fundamentada em processos fotossintéticos, depende deste composto como fonte de carbono. No entanto, as análises das emissões de CO₂ têm demonstrado que as taxas atuais de emissões são conclusivamente nocivas aos sistemas ambientais da terra (Pfanzen et al., 2007).

3 Protocolo de Kyoto

A intensa atividade humana, responsável pelo aumento das quantidades atmosféricas de compostos poluentes, faz com que gases como o dióxido de carbono, metano, óxido nitroso, hidrofluorcarbonos, perfluorcarbonos e hexafluoreto de enxofre sejam considerados como os principais responsáveis pelo chamado efeito estufa, um fenômeno natural que ocasiona severas alterações no clima do planeta (Petit, 2003). De acordo com Wuebbles & Jain, (2001) as previsões para o aquecimento global até o ano de 2100 são de 1 a 5°C, o que poderá ocasionar profundas alterações ambientais.

A preocupação internacional em relação ao aumento das emissões dos gases de efeito estufa levou a criação, em 1992, da Convenção das Nações Unidas sobre Mudança do Clima (United Nations Framework Convention on Climate Change). O objetivo desta convenção era fazer com que as emissões dos gases estufa fossem estabilizadas em determinados níveis, de forma a não gerar interferências nos sistemas climáticos da terra. Esta ação, entretanto, não foi considerada suficientemente eficaz para o controle das

alterações climáticas, sendo lançado às bases para um acordo mais efetivo e detalhado para os países industrializados, o chamado Protocolo de Kyoto (Begg, 2002).

Em dezembro de 1997 foi assinado no Japão o Protocolo de Kyoto, onde os vários grupos de países signatários do protocolo se comprometeram em diminuir as emissões de gases estufa. De maneira geral o compromisso firmado prevê uma diminuição em 5% das emissões dos países acordados (em relação aos dados de 1990), no período compreendido entre 2008 a 2012 (UNFCCC, 1997).

Segundo Dagoumas et al., (2006), o acordo estabelece três mecanismos de mercado para que os países alcancem seus compromissos de redução nas emissões: o primeiro referente ao comércio internacional de emissões, que permite o câmbio de emissões entre os países, onde um país com emissões abaixo do seu compromisso firmado pode vender a parte restante (artigo 17), o segundo, referente à implementação em comum, que permite que alguns países possam receber créditos de emissões ao investirem em projetos localizados em outros países que também tenham compromissos de emissões (artigo 6), e ainda o chamado mecanismo de desenvolvimento limpo, que permite que algumas nações recebam créditos por redução de emissões ao investir em projetos localizados em países em desenvolvimento sob condições específicas (artigo 12).

Os países signatários, de uma maneira geral, têm criado políticas para cumprir as exigências estabelecidas pelo acordo. O Protocolo de Kyoto, no entanto, proporciona a liberdade para que cada nação conduza a sua própria política de mudança climática levando em conta as particularidades de cada país. Para atingir os compromissos adquiridos os países têm desenvolvido políticas de mudanças climáticas e criado métodos para a medida da eficiência. Os objetivos mais comuns dessas políticas são o uso eficiente da energia, a diversificação das fontes energéticas, a diminuição das emissões, o aumento da eficiência dos processos industriais e agrícolas, o gerenciamento dos congestionamentos de veículos, a proteção das florestas, a conservação da biodiversidade, a redução do lixo, a reciclagem e o uso racional da energia doméstica. Os instrumentos utilizados para atingir estes objetivos são normalmente fiscais e econômicos (Miguez et al., 2006; Simeonova & Diaz-Bone, 2005).

Desta forma, diversos tipos de análise estão sendo propostas para a previsão das possíveis conseqüências das situações que envolvem as condições sobre as quais o protocolo foi firmado. Estas análises sugerem, entretanto que as medidas políticas e ambientais considerem não somente as emissões de dióxido de carbono, mas todos os gases de efeito estufa, de forma a tornar as ações mais efetivas e econômicas no futuro (Sarofim et al., 2005).

4 Microalgas

Os atuais conceitos e padrões de taxonomia classificam os organismos procariotos em cianofitas e bactérias. Fazem parte do grupo das microalgas, as diatomáceas, as clorofíceas e as cianobactérias (Anand, 1998).

As microalgas apresentam como principal modelo metabólico a fotossíntese, processo que durante a evolução da biosfera atual, teve o papel central na elevação do nível de oxigênio da atmosfera terrestre (Jeon et al., 2005; Schmetterer, 1994). Alguns destes microrganismos possuem, no entanto, uma versatilidade no que se refere à manutenção de suas estruturas, usufruindo diferentes metabolismos energéticos, como a respiração e fixação de nitrogênio (Grossman et al., 1994; Demeyer et al., 1982).

Alguns gêneros de microalgas apresentam alta concentração de pigmentos, entre eles cita-se a clorofila *a* que é considerado essencial para a fotossíntese. Outras duas classes de pigmentos envolvidas na captação de energia luminosa são os carotenóides e as ficolibinas. Os carotenóides são pigmentos lipossolúveis de cor vermelha, alaranjada ou amarela, encontrados em associação com a clorofila *a*. A terceira classe de pigmentos acessórios são as ficolibinas, a ficocianina, pigmento azul presente nas microalgas e a ficoeritrina de cor vermelha, às vezes ausente (Fay, 1983). Além desses pigmentos esses microrganismos possuem um sistema intracitoplasmático altamente desenvolvido, indicando a fotossíntese como rota metabólica preferencial.

As microalgas são capazes de utilizar como fonte de carbono inorgânico na fotossíntese o CO₂ livre e íons bicarbonato os quais são transportados através da fina membrana plasmática, sendo então acumulados na célula, como um reservatório de carbono inorgânico para a fotossíntese. O bicarbonato é convertido a CO₂ pela ação da enzima anidrase carbônica (Badger & Price, 2003; Zak et al., 2001).

A principal característica da fotossíntese, originalmente elucidada para algas verdes e plantas superiores, pode também se aplicar para as microalgas. Entretanto há aspectos que são particulares para algumas microalgas. A característica espectral da absorção da luz nas microalgas é diferente dos outros organismos fotossintéticos, já que altas taxas de atividade fotossintética são medidas não somente na região espectral entre 665-680nm de comprimento de onda, onde a luz é melhor absorvida pela clorofila, mas também em torno de 620nm a 560nm, onde a ficocianina e ficoeritrina, respectivamente absorvem luz efetivamente. Isto mostra que a luz absorvida pelas ficobiliproteínas é usada por estas microalgas tão eficientemente quanto à luz absorvida pela clorofila, o que sugere a elevada capacidade fotossintética destes microrganismos (Campbell et al., 1998).

4.1 Metabolismo fotossintético

A fotossíntese caracteriza-se por um mecanismo de duas etapas: uma reação fotoquímica e uma reação de fixação de carbono. Desta forma, ocorre a incorporação do dióxido de carbono na ribulose 1,5 bisfosfato (rubisco) requerendo energia durante a reação catalítica da enzima primária rubisco carboxilase. O produto da reação é quebrado em duas moléculas de três carbonos, ácido fosfoglicérico (PGA), e a redução do PGA, provocado pelo transportador de elétrons NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) que conduz a uma série de açúcares fosforados intermediários e finalmente a glicose. Esta seqüência de transformações metabólicas é conhecida como ciclo de Calvin-Benson (Calvin & Benson, 1948).

A fixação de CO₂ não é diretamente dependente da luz e o processo é por isso chamado de reação do escuro da fotossíntese. As exigências de energia na forma de ATP e NADPH, traduzem as transformações do ciclo de Calvin-Benson, inteiramente dependente da reação fotoquímica, as quais ocorrem na membrana tilacóide ou intracitoplasmática (Campbell et al., 1998). Nesta etapa a energia luminosa é absorvida pelas estruturas altamente organizadas dos pigmentos fotossintéticos e transportadores de elétrons, chamados fotossistema I e II, excitando a molécula de clorofila a. Isto conduz a explosão de elétrons excitados e seu fluxo determinará um potencial redox gradiente, o qual resulta na formação dos transportadores fortemente eletronegativos de elétrons, como a ferredoxina e o NADPH. Parte da energia liberada é incorporada durante este transporte de elétrons em ATP no processo de fosforilação (Fromme et al., 2006; Fay, 1983). A última fonte de elétrons para a fotossíntese é a H₂O, o qual cede no processo de fotólise, ou reação de Hill, átomos de hidrogênio, elétrons e libera O₂, produto da fotossíntese das microalgas e das plantas verdes (Fay, 1983).

Embora a carboxilação da rubisco seja a principal rota de incorporação do CO₂ em microalgas sob condições fotossintetizantes ótimas, ela não é a única rota para fixação do dióxido de carbono. A carboxilação do fosfenol piruvato, catalizada pela enzima fosfenol piruvato carboxilase, representa outra rota para fixação de CO₂. O oxalacetato é facilmente convertido a C₄-ácidos dicarboxílicos, por exemplo, para malato ou citrato, e subseqüentemente a aminoácidos, como aspartato ou glutamato. Esta rota, remanescente do C₄-ácido dicarboxílico em plantas superiores, complementa a rota redutora da pentose fosfato em microalgas. A presença de dois sistemas de carboxilação, operando paralelamente, pode representar uma importante adaptação das microalgas para mudanças ambientais bruscas. Sob condições de luz limitadas a assimilação do carbono é canalizada preferencialmente em direção da síntese de aminoácidos e outros constituintes celulares essenciais, mas sob condições saturadas de luz, açúcares e amido

são formados via rota redutora da pentose fosfato. Isto indica que a altas luminosidades, a taxa de fixação de CO₂ pode exceder a taxa de assimilação do nitrogênio e, desta forma, o excesso de carbono e energia derivada da fotossíntese é estocada na forma de glicogênio (Zak et al., 2001; Campbell et al., 1998).

O metabolismo endógeno escuro serve principalmente como agente dos mecanismos fotossintéticos e biossintético para o subsequente período luminoso ativo. O glicogênio é o principal produto de reserva, o qual suporta um limitado metabolismo escuro e prove manutenção de energia requerida para os processos celulares essenciais no escuro. Inicia-se convertendo-se em glicose-6-fosfato e metabolizado via rotas respiratórias (Fay, 1983). Embora enzimas da rota glicolítica sejam identificadas em várias microalgas, suas atividades são extremamente baixas. O metabolismo energético no metabolismo escuro das microalgas é distintamente dependente de O₂ e sua principal rota é o ciclo oxidativo da pentose-6-fosfato (Schmetterer, 1994).

5 Mecanismos de concentração de carbono em microalgas

A forma com que as diferentes espécies de microalgas se adaptam a uma ampla faixa de concentração de dióxido de carbono está relacionada com um mecanismo biofísico essencial denominado de mecanismo de concentração de carbono (CCM), que concentra o dióxido de carbono nos sítios de carboxilação fotossintéticos. Estes mecanismos correspondem a vias metabólicas complexas, uma vez que diferentes formas de carbono inorgânico estão envolvidas nestes processos biológicos (Jaiswal & Kashyap, 2002).

A função dos mecanismos de concentração de carbono é elevar os níveis de carbono inorgânico intracelular, compensando a limitação do suprimento de dióxido de carbono, que pode reduzir as taxas fotossintéticas. Estes mecanismos são responsáveis por bombear CO₂ até os sítios de carboxilação (Falkowski, 1997).

As células das microalgas são capazes de utilizar três diferentes vias de assimilação de carbono inorgânico: (1) assimilação direta do dióxido de carbono através da membrana plasmática; (2) utilização de bicarbonato através da indução da enzima anidrase carbônica, que converte os íons HCO₃⁻ em CO₂; (3) transporte de bicarbonato diretamente através da membrana plasmática. As enzimas anidrase carbônica e ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase/desidrogenase são as responsáveis pela biocatálise destas reações, no qual a enzima anidrase carbônica supre a rubisco através da conversão de bicarbonato em dióxido de carbono, que usa este composto como substrato gerando fosfoglicerato. A velocidade desta reação pode ser lenta devido à limitação de dióxido de carbono. Desta forma, a elevada eficiência da enzima anidrase carbônica, capaz de

e elevar os níveis intracelulares de dióxido de carbono em concentrações superiores a 1000 vezes a concentração do fluido externo, faz com que a reação de fixação de carbono ocorra eficientemente nestes organismos. Estes mecanismos são consistentes com diversos resultados da literatura para microalgas, com altos requerimentos de dióxido de carbono, capazes de acumular elevados níveis de carbono inorgânico interno (Cuaresma et al., 2006; Badger & Price, 2003; Marcus, 1997; Tchernov et al., 1997; Fridlyand et al., 1996).

6 Fotobiorreatores

Os processos biotecnológicos vêm sendo conduzidos a partir da avaliação dos fenômenos de transferência de massa e energia, no dimensionamento e na construção dos equipamentos onde se processam as biotransformações e na operação de sistemas de controle e aplicação de instrumentação, que permita o acompanhamento da cinética das transformações (Merchuk & Wu, 2004).

Fotobiorreatores utilizando microalgas para o tratamento de compostos poluentes e produção de biomassa são baseados em 5 critérios básicos: elevada eficiência de utilização da energia luminosa, adequado sistema de mistura, facilidade de controle das condições da reação, reduzido estresse hidrodinâmico das células e facilidade no aumento de escala (Muñoz & Guieysse, 2006).

Segundo Merchuk & Whu, (2001) fotobiorreatores utilizando algas, microalgas e bactérias fotossintéticas têm recebido considerável atenção nos processos de engenharia bioquímica. Este fato está associado ao desenvolvimento de novos produtos e determinados componentes naturais de interesse industrial como corantes, ácidos graxos e polissacarídeos.

Sistemas que utilizam fotobiorreatores são baseados em processos naturais em que o metabolismo fotossintético dos microrganismos converte energia luminosa, calor e CO_2 em produtos como oxigênio, hidrogênio, carboidratos e proteínas (Contreras et al., 1999). A utilização de fotobiorreatores para o cultivo de microalgas requer a presença de luz, dióxido de carbono e nutrientes dissolvidos para o crescimento do microrganismo. Conseqüentemente, estes processos necessitam de sistemas de iluminação, trocadores de gases (adição de CO_2 e remoção de O_2), adição de nutrientes e controle de temperatura (Rorrer & Cheney, 2004).

Microrganismos fotossintéticos podem ser cultivados em fotobiorreatores abertos ou fechados. Os sistemas fechados são caracterizados por elevadas eficiências fotossintéticas associados a um preciso controle das variáveis operacionais, com destaque para um menor risco de contaminação e minimização das perdas de água por

evaporação, que são muito significantes em sistemas abertos. Por outro lado, a construção dos sistemas fechados possui custo mais elevado, uma vez que necessitam de materiais transparentes, são mais complexos operacionalmente e são de difícil escalonamento. A razão entre o volume por unidade de área é outro critério a ser considerado na escolha dos sistemas, uma vez que a implementação de sistemas abertos requer grandes áreas disponíveis para elevados volumes reacionais (Borowitzka, 1999; Molina Grima et al., 1999).

Além dos critérios relatados anteriormente, Garcia-González et al., (2005) citam que a otimização dos sistemas deve ser feita em função da espécie em particular do microrganismo, uma vez que as características fisiológicas e de crescimento irão determinar o desempenho dos sistemas.

Neste sentido, variadas configurações de fotobiorreatores vêm sendo propostas, o que inclui geometria retangular, tubular, cônica e esférica (Stewart & Hessami, 2005). Estes autores relatam ainda que a etapa inicial para o desenvolvimento destes processos em larga escala é definida como o levantamento cinético em fotobiorreatores em escala de bancada. Os requerimentos energéticos do reator irão depender primariamente da geometria, já que uma configuração adequada é considerada fundamental na dispersão de luminosidade na superfície do equipamento.

6.1 Transferência de dióxido de carbono em fotobiorreatores

O dióxido de carbono é usualmente a principal fonte de carbono para o cultivo fotossintético de microalgas. O gás carbônico pode ser transferido continuamente ou intermitentemente da fase gasosa para a fase líquida do meio de cultura (Molina Grima et al., 1999).

A reatividade do gás carbônico em soluções aquosas estabelece vários equilíbrios em seu contato com a água. O primeiro equilíbrio refere-se à dissolução do gás na água formando ácido carbônico. O ácido carbônico sofre dissociação quase instantânea em íons bicarbonato e carbonato, sendo a concentração de carbono inorgânico total dada pelo somatório das espécies CO_3^{2-} , HCO_3^- e CO_2 (Rorrer & Mullikin, 1999).

Em termos de solubilidade, o dióxido de carbono é aproximadamente 10 vezes mais solúvel em água que o gás oxigênio. Entretanto, devido à baixa solubilidade de ambos os gases em soluções aquosas, ocorre a necessidade de se fornecer estes elementos ao longo de todo o processo (Klasson et al., 1991).

Neste sentido, um eficiente sistema de transferência de dióxido de carbono é necessário em fotobiorreatores. A eficiência na transferência de dióxido de carbono é necessária para elevar os coeficientes volumétricos de transferência de massa $K_L a$ (CO_2)

permitindo um melhor desempenho na transferência do gás para a fase líquida (Baquerisse et al., 1999). De acordo com estes autores, os coeficientes volumétricos de transferência de massa dependem principalmente das propriedades físicas do fluido, do escoamento do fluido e ainda do sistema e geometria do injetor de gases.

Desta forma, a transferência de dióxido de carbono em biorreatores torna-se um fator limitante dos processos, uma vez que a concentração de dióxido de carbono dissolvido diminui com o aumento da temperatura, assim como diminui com o aumento da concentração de sais dissolvidos. Estes fatores tornam-se relevantes para processos de transferência e remoção de CO₂ por microalgas, considerando a necessidade de se ter valores da concentração na saturação mais elevados (Rorrer & Cheney, 2004).

6.2 Condições operacionais

As microalgas são um grupo extremamente diverso de microrganismos, as quais são encontradas em praticamente todos os nichos terrestres, inclusive em localidades que apresentem grande variação de parâmetros físico-químicos de desenvolvimento. A diversidade cultural destes organismos representa uma importante característica tecnológica, possibilitando o cultivo de diferentes gêneros e espécies em uma ampla faixa de condições operacionais (Subramanian & Thajuddin, 2005).

As condições limitantes para o cultivo em metabolismo fotossintético, em fotobiorreatores, estão relacionadas principalmente as características de fornecimento da energia luminosa as células, em quantidade, qualidade e duração dos ciclos, a disponibilidade de gases como oxigênio e dióxido de carbono, aos fatores relacionados à agitação e mistura, controle de pH, temperatura e composição do meio de cultivo (Kitaya et al., 2005; Bereguel et al., 2004; Molina Grima et al., 1999).

A disponibilidade e intensidade da luz, bem como a duração dos ciclos são um dos principais fatores que controlam a produtividade de cultivos fotossintéticos (Sicko-Goad & Andresen, 1991; Lee & Low, 1992). Pulz & Scheinbenbogen (1998) reportam que a atividade fotossintética se eleva com o aumento da irradiação até determinados valores em que começa a ocorrer inibição do crescimento celular, através de um fenômeno conhecido por fotoinibição. Segundo estes autores, este fato está relacionado à saturação do aparato fotossintético dos microrganismos. A fotoinibição tem sido observada nas horas centrais dos períodos luminosos em cultivos abertos, e ainda em cultivos fechados e com controle da luminosidade, em situações em que as concentrações celulares são baixas, como é o caso de start-up dos processos (Göksan et al., 2003; Reboloso-Fuentes et al., 1999). Além destas características, o fotoperíodo, ou seja, a relação entre a duração dos ciclos de luz e escuro causa severas alterações nas taxas fotossintéticas.

Este fato torna-se relevante à medida que o uso destas rotas metabólicas em processos de engenharia ambiental requer a utilização da energia solar, a fim de desenvolver processos de tecnologia limpa. Desta forma, as células utilizariam a energia luminosa através de reações exergônicas, as quais seriam utilizadas na síntese de compostos a partir da fixação de dióxido de carbono através de reações endergônicas. Um dos problemas operacionais deste tipo de tecnologia refere-se à indisponibilidade da energia luminosa em períodos integrais de tempo. Por outro lado, algumas linhagens quando submetidas a condições de ausência de luminosidade, podem imediatamente utilizar o metabolismo heterotrófico para a manutenção de suas estruturas, no qual há a liberação de dióxido de carbono em detrimento a assimilação, o que é altamente desfavorável do ponto de vista do seqüestro de carbono (Acién-Fernández et al., 2005).

A disponibilidade de CO₂ é um fator determinante para o desempenho de fotobiorreatores, já que o dióxido de carbono é usualmente a principal fonte de carbono em cultivos fotossintéticos. De acordo com Cheng et al., (2006), a concentração de dióxido de carbono na corrente de ar do fotobiorreator é um parâmetro determinante, já que a concentração deste composto não deverá ser excessivamente baixa, de modo a limitar a disponibilidade de carbono às células, e também não deverá exceder um limite superior, evitando perdas de CO₂ que não são utilizadas pelo microrganismo e são liberadas para a atmosfera, resultando em uma poluição ambiental desnecessária. Além disso, Kitaya et al., (2005), demonstram o efeito adverso causado por elevadas concentração de dióxido de carbono no desenvolvimento celular.

Os fenômenos de transferência de quantidade de movimento em fotobiorreatores vêm sendo amplamente considerados em diversos trabalhos (Vunjak-Novakovic, 2005; Molina Grima et al., 1999; Contreras et al., 1999; Merchuk & Wu, 2001). A avaliação de diferentes tipos de agitação pneumática e mecânica são considerados em função dos danos causados as células, os quais determinam o desempenho fotossintético do microrganismo.

Em adição a temperatura, o pH é certamente o fator que mais afeta a distribuição de microalgas. Muitas espécies crescem em ambiente que variam de neutro a alcalino (Holm-Hansen, 1968). A faixa de pH considerada ótima para a fotossíntese situa-se entre 7,5 e 10, estando os limites mínimos entre 6,5 e 7,0 (Valiente & Leganes, 1989). A dissolução do dióxido de carbono na fase aquosa de fotobiorreatores contribui para o controle do pH das culturas (Berenguel et al., 2004). Em cultivos fotossintéticos, o crescimento celular associado à assimilação de dióxido de carbono do meio coincide com o aumento dos valores de pH. O incremento do pH em cultivos fotossintéticos ocorre devido à atividade biológica das células que produz uma redução no conteúdo de carbono

inorgânico dissolvido através do consumo necessário ao crescimento celular, forçando um deslocamento do equilíbrio carbonato-bicarbonato no sistema tampão. Além disso, o pH do meio de cultivo irá determinar as formas de carbono inorgânico (CO_2 , CO_3^{2-} ou HCO_3^-) dissolvida na fase líquida (Cuaresma et al., 2006). Segundo Lee, Apel & Walton (2006), a elevação do pH em cultivos fotossintéticos é um indicador do consumo de carbono inorgânico devido ao crescimento celular. Estes autores relatam à potencialidade da utilização de microalgas como biocatalisadores de reações de precipitações de CaCO_3 , através da obtenção de condições favoráveis de pH.

A temperatura ótima para o crescimento de microalgas e cianobactérias, situa-se geralmente entre 25°C a 35°C (Grossmam et al., 1994). Entretanto, o isolamento de espécies tolerantes a elevadas temperaturas (40-60°C) vêm sendo considerado um importante critério na seleção do microrganismo, uma vez que possibilitaria a injeção direta de dióxido de carbono oriundo de processos térmicos (Ono & Cuello, 2007; Weissmam et al., 1998). Além do efeito nas características fisiológicas de cada espécie, a temperatura possui relação inversamente proporcional com a dissolução do dióxido de carbono, representando uma limitação aos processos de transferência de massa nestes sistemas.

Meios de cultura sintéticos são os mais amplamente utilizados no cultivo de microalgas. Alguns estudos propõem, no entanto, o cultivo em efluentes líquidos de indústrias geradoras de CO_2 , de forma a associar o tratamento dos poluentes líquidos e gasosos (Muñoz & Guieysse, 2006; Yun et al., 1997).

7 Remoção de dióxido de carbônico a partir do cultivo de microalgas

As microalgas são microrganismos que vem sendo aplicados na redução das emissões de dióxido de carbono da atmosfera, onde este composto é fixado na presença de energia luminosa. As evidências de um desenvolvido sistema fotossintético sugerem o uso de microalgas no tratamento de efluentes gasosos com elevadas concentrações de CO_2 gerados por descargas industriais (Hsueh et al., 2007).

Numerosas pesquisas foram desenvolvidas especialmente no Japão, na década de 90, a partir de processos de biofixação de dióxido de carbono utilizando microalgas. Estes estudos estão sendo intensificados, visando projetar sistemas que operem de maneira eficiente e econômica, com o objetivo de desenvolver tecnologias para a redução de poluentes gasosos (Ono & Cuello, 2007; Cheng et al., 2006; Watanabe & Hall, 1996; Watanabe & Saiki, 1997).

O uso de microalgas em processos de fixação de dióxido de carbono é considerado uma alternativa promissora, uma vez que o elemento carbono pode ser

fixado por diferentes mecanismos. Em uma primeira etapa, o dióxido de carbono quando dissolvido na fase aquosa do sistema, pode ser seqüestrado por precipitação química através da reação dos íons bicarbonato e carbonato com elementos presentes no meio de cultivo, como cálcio e magnésio. Estas reações são catalisadas pelo crescimento e fisiologia das microalgas (Lee, Apel & Walton, 2004; Marcus, 1997). Uma outra rota de fixação de carbono está relacionada com o ciclo de Calvin-Benson, onde enzimas especializadas presentes nestes organismos catalisam reações que incorporam átomos de carbono, oriundos do CO₂ envolvido na fotossíntese (Falkowski, 1997). A conversão biológica do dióxido de carbono resulta em produtos do metabolismo fotossintético como células, oxigênio e biopolímeros solúveis no meio de cultivo (Acién-Fernández et al., 2005; Reboloso-Fuentes, 1999).

Neste sentido, diversas espécies de microalgas estão sendo avaliadas quanto a seu potencial na aplicação em processos de fixação de carbono. Estes estudos estão sendo focados na determinação de condições operacionais dos fotobiorreatores, bem como na avaliação da cinética de consumo de dióxido de carbono, formação de células e produtos do metabolismo fotossintético (Muñoz & Guieysse, 2006; Stewart & Hessami, 2005).

Na Tabela 1 estão expressos alguns trabalhos realizados com microalgas em fotobiorreatores, visando à fixação biológica de CO₂.

Tabela 1: Utilização de microalgas em processos de seqüestro de CO₂.

Espécie	Comentários	Referência
<i>Chlorella</i> sp.	Isolamento e caracterização morfológica e fisiológica de espécies tolerantes a elevadas temperaturas e concentrações de CO ₂ .	Sakai et al., (1995)
<i>Synechococcus elongatus</i>	Estudo da capacidade de assimilação de CO ₂ e caracterização bioquímica da biomassa formada.	Miyairi (1995)
<i>Monoruphidium minutum</i> NREL Monor02	Estudo da potencialidade de uso de microalgas para assimilação de dióxido de carbono em usinas termelétricas.	Zeiler et al., (1995)
<i>Chlorella</i> sp. T1	Testes conduzidos com dióxido de carbono oriundo da queima de carvão mineral, demonstrando a tolerância do microrganismo ao CO ₂ , NO _x e SO _x .	Maeda et al., (1995)
<i>Chroococcidiopsis</i> sp. TS-821	Estudo do efeito de diferentes concentrações de CO ₂ na atividade da enzima rubisco e no crescimento celular.	Hayashi et al., (1995)
<i>Scenedesmus bicellularis</i>	Avaliação do enriquecimento com dióxido de carbono de efluentes urbanos visando à aceleração da remoção de compostos dissolvidos nas águas residuárias.	Kaya et al., (1996)
<i>Chlorella</i> sp. UK001	Cultivos em atmosferas contendo entre 3 a 40% de CO ₂ , obtendo taxas de fixação de 0,00133g _{CO2} /L.h.	Hirata et al., (1996)

Tabela 1: Continuação

<i>Nannochloris</i> sp. NOA-113	Avaliação da eliminação biológica de óxido nítrico e dióxido de carbono em fotobiorreatores tubulares. As máximas taxas de eliminação de CO ₂ obtidas foram na ordem de 0,036g _{CO2} /L.h.	Yoshihara et al., (1996)
<i>Monoraphidium minutum</i> MONOR02	Avaliação da tolerância de microalgas a gases enriquecidos com CO ₂ , SO _x e NO _x .	Brown (1996)
<i>Spirulina platensis</i> SP-G	Avaliação da conversão de dióxido de carbono em biomassa em fotobiorreatores de geometria cônica.	Watanabe & Hall (1997)
<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7942	Bioconversão de dióxido de carbono em etileno através de espécies recombinantes. Os resultados demonstram eficiências de conversão de 5,84%.	Ogawa et al., (1997)
<i>Synechococcus leopoliensis</i> ,	Estudo da bioconversão de dióxido de carbono em biocombustíveis. Resultados indicam taxas de incorporação de dióxido de carbono na biomassa na ordem de 0,0354g _{CO2} /L.h.	Ohtaguchi et al., (1997)
<i>Anacystis nidulans</i> R2	Avaliação da conversão biológica de dióxido de carbono em reatores air-lift. Os resultados demonstraram taxas máximas de incorporação de carbono na biomassa de 0,0168g _{CO2} /L.h.	Yamada et al., (1997)
<i>Synechococcus</i> sp. WH7803	Avaliação do efeito dos mecanismos de concentração de carbono nos fluxos de CO ₂ e HCO ₃ ⁻ intracelular.	Tchernov et al., (1997)
<i>Nannochloropsis</i> sp.		
<i>Choococciopsis</i> sp. TS-821	Avaliação do ajuste da concentração de dióxido de carbono enriquecido ao logo dos cultivos. Os resultados obtidos indicaram a possibilidade da formação de carboidratos exocelulares, excretados para o meio de cultivo associados ao aumento da massa celular.	Ishida et al., (1997)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cultivos realizados a partir dos efluentes líquidos de indústria de produção de aço visando o tratamento simultâneo de NH ₃ e CO ₂ , obtendo-se taxas de fixação de 0,026g _{CO2} /L.h.	Yun et al., (1997)
<i>Chlorella</i> sp. HA-1	Avaliação do desempenho de fotobiorreatores de geometria cônica indicou eficiências de consumo de CO ₂ de 21,9%.	Watanabe & Saiki, (1997)
<i>Synechococcus</i> PCC 7942	A eficiência de remoção de CO ₂ foi avaliada em reatores air-lift, obtendo taxas de remoção de 0,025g _{CO2} /L.h em concentrações celulares de 0,286g/L. O scale-up do processo a partir de um biorreator de 4000 m ³ indicou uma taxa de média de remoção de 1 tonelada de CO ₂ /h.	Kajiwara et al., (1997)
<i>Synechocystis aquatilis</i> SI-2	Seleção de microalgas com elevada capacidade de incorporação de CO ₂ , obtendo máximas taxas de fixação de 0,0625g _{CO2} /L.h, para a espécie <i>S. aquatilis</i> .	Murakami & Ikenouchi, (1997)
<i>Botryococcus</i> sp SI-30		
<i>Chlorella vulgaris</i>	Avaliação da fixação biológica de CO ₂ em nove configurações diferentes de fotobiorreatores. Taxas de fixação na ordem de 0,0054g _{CO2} /L.h foram obtidas.	Usui & Ikenouchi, (1997)
<i>Chlorococcum littorale</i>		
<i>Dunaliella tertiolecta</i> ATCC30929	Otimização do desempenho de diferentes fotobiorreatores supridos com CO ₂ e NO _x .	Nagase et al., (1998)

Tabela 1: *Continuação*

<i>Synechococcus</i> PCC 7942	Isolamento e caracterização de espécies mutantes tolerantes a elevadas concentrações de carbono inorgânico.	Bonfil et al., (1998)
<i>Fischerella</i> (113, 4L)	Cultivo de espécies termofílicas com foco em processos de mitigação de CO ₂ em usinas termelétricas.	Weissmam et al., (1998)
<i>Porphyridium cruentum</i> UTEX 161	Modelagem da dispersão axial dos perfis de concentração de CO ₂ em fotobiorreatores tubulares.	Camacho Rubio et al., (1998)
<i>Porphyridium tricornutum</i>	Modelagem e simulação dos perfis de distribuição de luz em fotobiorreatores.	Csögor et al., (1999)
<i>Chlorella</i> KR-1	Isolamento de espécies altamente tolerantes ao dióxido de carbono.	Sung et al., (1999)
<i>Porphyridium purpureum</i> 1380-1A	Determinação dos coeficientes volumétricos de transferência de CO ₂ em fotobiorreatores contínuos em escala piloto para a produção de microalgas.	Baquerisse et al., (1999)
<i>Porphyridium cruentum</i>	Avaliação do efeito das variações diárias em fotobiorreatores abertos nas taxas de consumo de dióxido de carbono.	Reboloso-Fuentes et al., (1999)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> UTEX 640	Avaliação da capacidade de consumo de dióxido de carbono em reatores airlift. Eficiências máximas de consumo de 63% foram registradas.	Sobczuk et al., (1999)
<i>Porphyridium</i> sp.	Avaliação dos requerimentos de dióxido de carbono em diferentes configurações de fotobiorreatores.	Merchuk et al., (2000)
<i>Chlorella</i> sp.	Estudo do desempenho de tanques abertos na fixação biológica de CO ₂ proveniente de estações de liquefação de gás natural. Os resultados obtidos estimam a possibilidade de taxas de fixação na ordem de 50 g _{CO2} /m ² /dia.	Otsuki (2001)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	Avaliação de diferentes sistemas de transferência de dióxido de carbono em fotobiorreatores.	Carvalho & Malcata (2001)
<i>Synechocystis aquatilis</i> SI-2	Uso de fotobiorreatores abertos do tipo flat-plate para a biofixação de dióxido de carbono. Taxas médias de fixação na ordem de 50g _{CO2} /m ² .dia foram obtidas.	Zhang et al., (2001)
<i>Anabaena</i> sp. ARM 629	Isolamento e caracterização de espécies mutantes de cianobactérias tolerantes a elevadas concentrações de carbono inorgânico.	Jaiswal & Kashyap, (2002)
<i>Nostoc calcicola</i>		
<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	Aplicação de fotobiorreatores em processos de seqüestro de carbono e produção de hidrogênio. As máximas taxas específicas de CO ₂ obtidas foram superiores a 0,13g _{CO2} /g _{biomassa} .h.	Yoon (2002)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Estudo dos perfis de concentração de CO ₂ em fotobiorreatores medidos nas fases líquida e gasosa do sistema. Taxas de 63,9 g _{CO2} /m ³ .h foram obtidas.	Keffer & Kleinheinz (2002)
<i>Dunaliella tertiolecta</i> CCAP 19/6B	Avaliação de métodos de cultivo dinâmico na produção de microalgas em fotobiorreatores.	Barbosa et al., (2003)
Culturas mistas	Determinação dos perfis de concentração das diferentes espécies de carbono inorgânico em fotobiorreatores.	Lin et al., (2003)

Tabela 1: *Continuação*

<i>Phaeodactylum tricornutum</i> UTEX 640	Modelagem e otimização da transferência de dióxido de carbono em fotobiorreatores visando à redução das perdas de CO ₂ nos gases de exaustão.	Berenguel et al., (2004)
<i>Synechococcus</i> (PCC8806, PCC7339, ATCC 29152, ATCC 27266)	Seleção de espécies com elevado potencial de catálise na formação de precipitados de CaCO ₃ .	Lee, Apel & Walton (2004)
<i>Synechocystis</i> (PCC 7338, PCC 8807, PCC 7336, ATCC 27265)		
<i>Chlorococum littorale</i> <i>Chaetoceros calcitrans</i>	Dimensionamento e análise de novas configurações de fotobiorreatores.	Sato et al., (2006)
<i>Nannochloopsis oculata</i>	Avaliação dos balanços de carbono na biofixação de CO ₂ em fotobiorreatores.	Hsueh et al., (2007)
<i>Scenedesmus obliquus</i> <i>Spirulina</i> sp.	Biofixação de CO ₂ em reatores em série de três estágios. Os resultados demonstram taxas de fixação média de 37,9% em cultivos conduzidos com pulsos de 15min/hora a 6% de CO ₂ na vazão de 0,3VVM.	Morais & Costa (2007)
<i>Scenedesmus obliquus</i> <i>Chlorella kessleri</i>	Seleção e isolamento de espécies para remoção biológica de CO ₂ oriundas de estações de geração de energia termelétrica.	Morais & Costa (2007)
<i>Anabaena variabilis</i>	Estudo da transferência de luz em fotobiorreatores para a produção de H ₂ com remoção simultânea de CO ₂ .	Berberoglu et al., (2007)
<i>Aphanothece microscopica</i> Nägeli (RSMAN92)	Modelagem cinética da remoção de dióxido de carbono em fotobiorreatores tubulares e otimização do processo. Os dados cinéticos indicam taxas máximas de remoção de 108,56mg _{CO2} /L.min.	Jacob-Lopes et al., (2007)

A análise da tabela demonstra um significativo número de trabalhos realizados até o momento, visando o seqüestro de dióxido de carbono a partir de processos biotecnológicos. Neste sentido, torna-se evidente a capacidade da assimilação de dióxido de carbono por microalgas. Entretanto, pesquisas relacionadas com reatores que operam econômica e eficientemente, estudo de processos em grande escala e operação de fotobiorreatores em condições reais ainda não estão adequadamente bem elucidados, indicando a necessidade da continuidade do desenvolvimento de processos com microalgas visando à remoção de CO₂ associado à obtenção de componentes celulares de interesse industrial.

8 Usos potenciais da biomassa

As principais vantagens para de produção biomassa de organismos fotossintéticos estão relacionadas à rápida reprodução e a utilização de fontes baratas de energia e de

nutrientes para a sua multiplicação. Evidentemente que isto se faz às custas do meio em que os microrganismos se desenvolvem, podendo ser constituído de substratos dos mais variados, alguns de baixo custo, incluindo resíduos industriais, os quais resolveriam problemas de ordem ambiental, servindo ainda para a produção de insumos (Anupama & Ravindra, 2000).

A composição bioquímica das células de microalgas possui características de interesse comercial, uma vez que possuem significativas proporções de proteínas, lipídeos, carboidratos, pigmentos e ácidos nucleicos, podendo desta forma, serem utilizadas como ingrediente de alimentos destinados ao consumo humano, alimentação animal, extração de biomoléculas e produção de biocombustíveis (Dufossé et al., 2005; Yen & Brune, 2007). Desta forma, a utilização destes microrganismos em processos de seqüestro de carbono associa o tratamento dos compostos poluentes, com a geração de insumos que podem ser reciclados de diferentes formas.

A Tabela 2 apresenta alguns dos usos potenciais da biomassa formada a partir da conversão biológica de dióxido de carbono em fotobiorreatores.

Tabela 2: Usos potenciais da biomassa

Aplicação	Exemplos	Referência
Alimentação humana	Fonte de proteína unicelular e uso na suplementação de produtos como massas, sopas e bebidas.	Guill-Guerreiro et al., (2004)
Alimentação animal	Algumas espécies são frequentemente empregadas na alimentação de peixes e crustáceos.	Olvera-Novoa et al., (1999)
Biomoléculas	Fonte de clorofila <i>a</i> , ficocianina, β -caroteno, ácido γ -linolênico e ácido eicosapentanóico.	Jacob-Lopes et al., (2007); Spolaore et al., (2006)
Fertilizante	Uso da biomassa como fonte de nitrogênio e fósforo em terras agriculturáveis.	Chae et al., (2006)
Produção de biogás	Produção de CH ₄ em fermentadores a partir da digestão da biomassa.	Yen & Brune, (2007)
Biocombustíveis	Produção de biodiesel através da fração lipídica das células.	Miao & Wu, (2006); Xu et al., (2006)

Neste sentido, a análise da Tabela 2 demonstra a ampla variedade de usos possíveis para a biomassa de microalgas. Segundo Spolaore et al., (2006), atualmente a indústria de biomassa de microalgas produz mais de 5000 ton de massa seca/ano, gerando uma renda superior a US\$ 1,25×10⁹/ano, não incluindo os produtos processados, o que demonstra o potencial de exploração deste tipo de processo biotecnológico.

9 Aplicabilidade do processo

A aplicabilidade do processo é um fator de suma importância no desenvolvimento de tecnologias de controle ambiental. A avaliação é realizada normalmente com base em experiências passadas, resultados obtidos através de plantas industriais, resultados publicados na literatura e estudos em escala piloto (Tchobanoglous et al., 2003).

A análise de patentes é utilizada amplamente na verificação do potencial de mercado e tendências de uma determinada tecnologia (Wu & Lee, 2007). Segundo Pilkington et al., (2002) a análise de patentes é fundamental na avaliação da evolução de uma tecnologia, bem como na definição das tecnologias emergentes. Neste sentido, a Tabela 3 apresenta algumas das patentes envolvendo fotobiorreatores que utilizam microalgas para o seqüestro de dióxido de carbono. Um significativo número de patentes foi depositado ao longo de aproximadamente 15 anos de desenvolvimento da tecnologia, com destaque ao massivo número de processos desenvolvidos no Japão.

Comercialmente, apenas três sistemas comerciais que utilizam fotobiorreatores fechados com propósitos de tratamento de resíduos foram reportados: os reatores tubulares da BioFence (Applied Photosynthetic Limited, Inglaterra), os reatores helicoidais da Biocoil (Biotechna-Graesser A.P. Ltda, Austrália), e os sistemas da Greenfuel (Greenfuel Technologies Corporation, USA). Estes sistemas, entretanto, possuem pouca experiência operacional e dados de dimensionamento.

Desta forma, o uso de microalgas em sistemas para o controle de gases poluentes encontra-se ainda em fase embrionária, com experiências baseadas em alguns anos de pesquisas em escala laboratorial e piloto (Hsueh et al., 2007; Chae et al., 2006; Kitaya et al., 2005; Yamada et al., 1997; Yoshihara et al., 1996; Maeda et al., 1995).

Tabela 3: Patentes relacionadas a processos de seqüestro de carbono em fotobiorreatores por microalgas.

Número	Título	Referência
JP 04370087	Carbon dioxide fixation by microalgae.	Fujita et al., (1992)
JP 05023541	Treatment of flue gases containing carbon dioxide with microalgae in global warming prevention.	Tatezawa et al., (1993)
JP 07051051	Novel micro-algae and method for fixing high concentration carbon dioxide.	Kurano (1995)
JP 07204463	Waste gas for culture of microalgae.	Hirata et al., (1995)
JP 07313141	Microalgae for fixation of carbon dioxide.	Sakamoto et al., (1995)
JP 08009963	Galdieria for carbon dioxide fixation.	Hasegawa & Kurano (1996)

Tabela 3: *Continuação*

JP 08038158	Apparatus for carbon dioxide fixation with microalgae in a closed system.	Tsutsumi & Kawachi (1996)
DE 4444191	Removal of carbon dioxide from flue gases.	Melkonian-Ezekian & Prause (1996)
JP 09057058	Transparent carbon dioxide fixing apparatus for waste gas treatment.	Tsutsumi & Kaneko (1997)
JP 09276648	Recovery and recycling of carbon dioxide in waste gases by photosynthetic fixation by microalgae and utilization of microalgae as fuels.	Matsumoto et al., (1997)
JP 10248553	Carbon dioxide fixation with microalgae.	Kawata et al., (1998)
JP 11332552	Tetraselmis for carbon dioxide fixation.	Hirayama & Ueda (1999)
JP 11318431	Carbon dioxide fixation microalgae and application of the microalgae.	Choi et al., (1999)
JP 11089555	Apparatus for decreasing carbon dioxide in polluted air by photosynthetic microalgae.	Sumi (1999)
JP 2001161347	Microalgae <i>Chlorella</i> for carbon dioxide fixation.	Morita & Watabe (2001)
KR 2002074029	Biological fixation of carbon dioxide by <i>Chlorella</i> sp. HA-1 using semi continuous cultivation method in photobioreactor.	Kang et al., (2002a)
KR 2002074030	Internally illuminated photobioreactor for biological carbon dioxide fixation.	Kang et al., (2002b)
WO 2003094598	Photobioreactor and process for biomass production and mitigation of pollutants in flue gas.	Berzin (2003)
US 2005239182	Synthetic and biologically-derived products produced using biomass produced by photobioreactors.	Berzin (2005a)
US 2005064577	Hydrogen production with photosynthetic organisms and from biomass derived therefrom.	Berzin (2005b)
KR 2005081766	Continuous photo bioreactor for carbon dioxide removal to inhibit global warming and mass-production of microalgae.	Shin & Chae (2005)
AU 2006100045	Photobioreactor for mitigation of greenhouse gases.	Davey (2006)
WO 2006100667	A method for the enhanced production of algal biomass by sequestration of gaseous carbon dioxide.	Eyal & Raz (2006)
WO 20070111343	Photobioreactor for biomass production and mitigation of pollutants in flue gases.	Berzin & Wu (2007)

10 Perspectivas Futuras

A viabilidade técnica do desenvolvimento de fotobiorreatores utilizando microalgas para o seqüestro de dióxido de carbono e produção de biomassa está sendo amplamente avaliada em função de 6 linhas de pesquisa principais: (1) seleção de espécies tolerantes ao dióxido de carbono e outros gases tóxicos, bem como microrganismos capazes de

suportar elevadas temperaturas, os quais seriam aplicados em sistemas com injeção direta de CO₂ industrial, (2) dimensionamento e construção de fotobiorreatores de configurações variadas, visando a melhoria do desempenho celular quanto a produção de biomassa e fixação de dióxido de carbono, (3) avaliação das condições operacionais dos biorreatores, representadas principalmente pela energia luminosa incidente, concentração de O₂ e CO₂ nos gases de entrada, agitação, controle de pH, temperatura, formulação do meio de cultivo e duração dos ciclos de luz, (4) modelagem cinética de crescimento celular e consumo de carbono inorgânico, (5) escalonamento de processos e (6) estudo das perspectivas econômicas.

Analiticamente, o dióxido de carbono sequestrado é avaliado por estequiometria elementar, no qual é realizada uma estimativa do carbono fixado na biomassa produzida e do carbono fixado na fase líquida do sistema. Associado a este método, são determinadas as taxas de remoção de dióxido de carbono da fase líquida do sistema através de sensores polarográficos e por métodos de titulação clássica, bem como através de técnicas de cromatografia gasosa e medidas de CO₂ por infravermelho, no qual as medidas são realizadas na fase gasosa do sistema. Normalmente, estas metodologias são avaliadas isoladamente, o que dificulta a predição dos valores globais da quantidade de carbono sequestrado.

Estudos relacionados com cinética de remoção de dióxido de carbono são ainda muito escassos, estando a grande maioria das pesquisas relacionadas com as variáveis cinéticas de crescimento celular, no qual as taxas de consumo de carbono são estimadas indiretamente, sugerindo a necessidade de pesquisas com foco na determinação das taxas reais de sequestro de carbono.

Projetos destes sistemas em escalas piloto e semi-industrial já estão sendo considerados, o que representa um importante passo na consolidação da tecnologia da fixação biológica de dióxido de carbono por organismos fotossintéticos.

As projeções econômicas e financeiras destes sistemas estão relacionadas à obtenção de créditos de carbono, com produção paralela de matéria prima rica em proteínas, carboidratos, pigmentos e gorduras, representando um importante potencial para a extração de óleos e processamento de biosiesel, uso como suplemento alimentar e fracionamento de biomoléculas. Além disso, uma tendência em sistemas de tratamento de resíduos é a utilização de compostos poluentes como carbono em pelo menos duas etapas, de forma a prolongar os ciclos biogeoquímicos destes compostos. Neste sentido, o carbono presente nos efluentes gasosos, após passar pelos processos biológicos de remoção, no qual uma fração é convertida em produtos do metabolismo fotossintético,

será novamente utilizado na produção de energia e nutrientes, de forma a melhorar a sustentabilidade ambiental das atividades industriais.

Esperançosamente, em poucos anos, a ciência possa desenvolver estratégias eficazes para auxiliar na resolução dos problemas cada vez mais urgentes dos efeitos nocivos do CO₂ no clima da terra.

11 Referências

ACIÉN-FERNANDEZ, F.G.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J.M.; ALÍAS, C.B.; LÓPEZ, M.C.G.M.; GONZÁLEZ, M.J.I.; GÓMEZ, R.N.; MOLINA GRIMA, E. Assessment of the production of ¹³C labeled compounds from phototrophic microalgae at laboratory scale. *Biomolecular Engineering*.n.20.p.149-162, 2003.

ACIÉN-FERNANDEZ, F.G.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J.M.; EGOROVA-ZACHERNYUK, T.A.; MOLINA GRIMA, E. Cost-effective production of ¹³C, ¹⁵N stable isotope-labelled biomass from phototrophic microalgae for various biotechnological applications. *Biomolecular Engineering*.n.22.p.193-200, 2005.

ANAND, N. Cyanobacterial taxonomic, classical concepts and modern trends. *Cyanobacterial biotechnology*.p.337-340, 1998.

ANUPAMA, P. RAVINDRA, L. Value-added food: single cell protein. *Biotechnology Advances*.n.18.p.459-479, 2000.

BADGER, M.R.; PRICE, G.D. CO₂ concentration mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *Journal of experimental Botany*.v.54.n.383.p.609-622, 2003.

BAQUERISSE, D.; NOUALS, S.; ISAMBERT, A.; SANTOS, P.F.; DURAND, G. Modeling of a continuous pilot photobioreactor for microalgae production. *Journal of Biotechnology*.n.70.p.335-342, 1999.

BARBOSA, M.; HOOGAKKER, J.; WIJFFELS, G. Optimization of cultivation parameters in photobioreactors for microalgae cultivation using the A-stat technique. *Biomolecular Engineering*.n. 20.p.115-123, 2003.

BEGG, K.G. Implementing the Kyoto protocol on climate change: environmental integrity, sinks and mechanisms. *Global Environmental Change*.n.12.p.331–336, 2002.

BENETTO, E.; POPOVICI, E.; ROUSSEAU, P. Life cycle assessment of fossil CO₂ emissions reduction scenarios in coal-biomass based electricity production. *Energy Conversion and Management*.n.45.p.3053–3074, 2004.

BENEMAN, J.; HUGHES, E. Biological fossil CO₂ mitigation. *Energy Convers. Mgmt*.v. 36.p.5467-5473, 1997.

BERBEROGLU, H.; YIN, J.; PILON, L. Light transfer in bubble sparged photobioreactors for H₂ production and CO₂ mitigation. *International Journal of Hydrogen Energy*. *In Press*, 2007.

BERENGUEL, M.; RODRIGUEZ, F.; ACIÉN, F.G.; GARCIA, J.L. Model predictive control of pH in tubular photobioreactors. *Journal of Process Control*.n.14.p.377-387, 2004.

BERZIN, I. Photobioreactor and process for biomass production and mitigation of pollutants in flue gas. WO Patent 2003094598, 2003.

BERZIN, I. Synthetic and biologically-derived products produced using biomass produced by photobioreactors. US Patent 2005239182, 2005a.

BERZIN, I. Hydrogen production with photosynthetic organisms and from biomass derived therefrom. US Patent 2005064577, 2005b.

BERZIN, I.; WU, X. Photobioreactor for biomass production and mitigation of pollutants in flue gases. WO Patent 20070111343, 2007.

BONFIL, D.J.; TARAZI, M.; SÜLTEMEYER, D.; HURWITZ, J.L.; SCHATZ, D.; KAPLAN, A. A putative HCO₃⁻ transporter in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942. *FEBS Letters*.n.430.p.236-240, 1998.

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

BROWN, L.M. Uptake of carbon dioxide from flue gas by microalgae. *Energy Convers. Mgmt*.v.37.p.1363-1367, 1996.

CALVIN, M., BENSON, A.A. The path of carbon in photosynthesis. *Science*.n.107.p.476-480, 1948.

CAMACHO RUBIO, F. ; ACIÉN FERNÁNDEZ, F.G. ; SANCHEZ PERES, J.A. ; GARCIA CAMACHO, F. ; MOLINA GRIMA, E. Prediction of dissolved oxygen and carbon dioxide concentration profiles in tubular photobioreactors for microalgal culture. *Biotechnology and Bioengineering*.v.62.p.71-876, 1998.

CAMIRO-VARGAS, T.K. ; AYÓN, M.H. ; ESPINOZA, E.V. ; HINOJOSA, F.D. ; MEDRANO, R.C. Dissolved inorganic carbon uptake by *Rhodomonas* sp. and *Isochrysis aff. Galbana* determined by potentiometric technique. *Aquacultural Engineering*.n.33.p.83-95, 2005.

CAMPBELL, D.; HURRY, V.; CLARKE, A.K.; GUSTAFSSON, P.; ÖQUIST, G. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*.n.30.p.667-680, 1998.

CARVALHO, A.P.; MALCATA, F.X. Transfer of carbon dioxide within cultures of microalgae: plain bubbling versus hollow-fiber modules. *Biotechnology Progress*.n.17.p.265-272, 2001.

CHAE, S.R; HWANG, E. J, SHIN, H.S. Single cell protein production of *Euglena gracilis* and carbon dioxide fixation in an innovative photo-bioreactor. *Bioresource Technology*.n.97.p.322-329, 2006.

CHENG, L.; ZHANG, L.; CHEN, H.; GAO, C. Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. *Separation and Purification Technology*.n.50.p.324-329, 2006.

CHOI, M.; LEE, K.; LEE, J.; SUNG, K.; LEE, J.; PARK, S. Carbon dioxide fixation microalgae and application of the microalgae. JP Patent 11318431, 1999.

CONTRERAS, A.; GARCIA, F.; MOLINA GRIMA, E.; MERCHUK, J.C. Influence of sparger on energy dissipation, shear rate, and mass transfer to sea water in a concentric-tube airlift bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*.n.25.p.820–830, 1999.

CSÖGÖR, Z.; HERRENBAUER, M.; PERNER, I.; SCHMIDT, K.; POSTEN, C. Design of a photo-bioreactor for modeling purposes. *Chemical Engineering and Processing*.n.38.p.517–523, 1999.

CUARESMA, M.; GARBAYO, I.; VEGA, J.M.; VÍLCHEZ, C. Growth and photosynthetic utilization of inorganic carbon of the microalga *Chlamydomonas acidophila* isolated from Tinto river. *Enzyme and Microbial Technology*.n.40.p.158-162, 2006.

DAGOUMAS, A.S.; PAPAGIANNIS, G.K.; DOKOPOULOS, P.S. An economic assessment of the Kyoto Protocol application. *Energy Policy*.n.34.p.26–39, 2006.

DAVEY, M.J. Photobioreactor for mitigation of greenhouse gases. AU 2006100045, 2006.

DEMEYER, A.; JACOB, F.; DAY, M.; MENGUY, G.; PERRIER, J. La Conversion bioenergetique-Durayonnement solaire et le biotechnologies. Cap.2, Paris: Ed. Lavoisier.p.276-301, 1982.

DUFOSSÉ, L.; GALAUP, L.; YARON, A.; ARAD, S.M.; BLANC, P.; MURTHY, K.C.; RAVISANKAR, G. Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: A scientific oddity or an industrial reality. *Trends in Food Science & Technology*.n.16.p.389–406, 2005.

EYAL, A.; RAZ, C. A method for the enhanced production of algal biomass by sequestration of gaseous carbon dioxide. WO Patent 2006100667, 2006.

FALKOWSKI, P.G. Photosynthesis: The paradox of carbon dioxide efflux. *Current Biology*.n.7.p.637-639, 1997.

FAY, P. The blue greens (cyanophyta – cyanobacteria), 5^o Ed. London, Ed. Edward Arnold, 88p, 1983.

FRIDLAND, L.; KAPLAN, A.; REINHOLD, L. Quantitative evaluation of the role of a putative CO₂-scavenging entity in the cyanobacterial CO₂-concentrating mechanism. *BioSystems*.n.37.p.229-238, 1996.

FROMME, P.Y.H.; DERUYTER, Y.S.; JOLLEY, C.; CHAUHAN, D.K.; MELKOZERNOV, A.; GROTHJOHANN, I. Structure of photosystems I and II. *Comptes Rendus Chimie*.n.9.p.188-200, 2006.

FUJITA, H.; KINOMOTO, T.; SUWA, M. Carbon dioxide fixation by microalgae. JP Patent 04370087, 1992.

GARCIA-GONZALEZ, A.; MORENO, J.; MANZANO, C.; FLORENCIO, J.; GUERRERO, M. Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis-β-carotene and lutein in closed tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*.n.115.p.81-90, 2005.

GÖKSAN, T.; DUMAZ, Y.; GOKPINAR, S. Effect of light paths lengths and initial culture density on the cultivation of *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898). *Aquaculture*.n.217.p.431-436, 2003.

GROSSMAN, A.R.; SCHAEFER, M.R.; CHIANG, G.G.; COLLIER, J.L. The Responses of cyanobacteria to environmental conditions: light and nutrients. In: Bryant, D. A. *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers. p. 641-668, 1994.

GUIL-GUERRERO, J. L., NAVARRO - JUAREZ, LÓPEZ - MARTINEZ, J. C., CAMPRAMADRID, P., REBOLLOSO-FUENTES, M.M. Functional properties of the biomass of three microalgal species. *Journal of Food Engineering*.n.30.p.312-318, 2004.

HASEGAWA, T.; KURANO, N. *Galdieria* for carbon dioxide fixation. JP Patent 08009963, 1996.

HAYASHI, N.R.; ISHIDA, T.; PEERAPORNPISAL, Y. IGARASHI, Y.; KODAMA, T. Effect of carbon dioxide concentration on the growth and RubisCO activity of a thermophilic cyanobacterium *Chroococcidiopsis* sp. strain TS-821. Journal of Fermentation and Bioengineering. n.80(5),p.507-509, 1995.

HIRATA, S.; MIZUKAMI, H.; HAYASHIDANI, M. Waste gas for culture of microalgae. JP Patent 07204463, 1995.

HIRATA, S.; HAYASHITANI, M.; TONES, S. Carbon dioxide fixation in batch culture of *Chlorella* sp. using a photobioreactor with a sunlight-collection device. Journal of Fermentation and Bioengineering.v.81.n.5.p.470-472, 1996.

HIRAYAMA, N.; UEDA, R. Tetraselmis for carbon dioxide fixation. JP Patent 11332552, 1999.

HOLM-HANSEN, O. Ecology, physiology, and biochemistry of blue-green algae. Ann. Rev. Microbiol.n.22.p.47-70, 1968.

HSUEH, H.T.; CHU, H.; YU, S.T. A batch study on the bio-fixation of carbon dioxide in the absorbed solution from a chemical wet scrubber by hot springs and marine algae. Chemosphere.n.66.p.878-886, 2007.

ISHIDA, T.; HASEGAWA, N.; HAYASHI, N.R.; PEERAPORNPISAL, Y.; ISHII, M.; IGARASHI, Y.; KODAMA, T. Growth Characteristics and dense culture of a thermophilic cyanobacterium *Chroococcidiopsis* sp. strain TS-821. Journal of Fermentation and Bioengineering.v.83.n.6.p.571-576, 1997.

IPCC, Intergovernmental Panel on Climate Change. Carbon dioxide capture and storage. <http://www.ipcc.ch/>, 2007.

IPCC, Intergovernmental Panel on Climate Change. The scientific basis. <http://www.ipcc.ch/>, 2001.

JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L.Q.; PINTO, L.A.A.; QUEIROZ, M.I. Characteristics of thin-layer drying of the cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli. Chemical Engineering and Processing.n.46.p.63-69, 2007.

JACOB-LOPES, E.; SCOPARO, C.H.G; FRANCO, T.T. Rates of CO₂ removal by *Aphanothece microscopica* Nägeli in tubular photobioreactors. Chemical Engineering and Processing, *In Press*, 2007.

JAISWAL, P.; KASHYAP, A. Isolation and characterization of mutants of two diazotrophic cyanobacteria tolerant to high concentrations of inorganic carbon. *Microbiological Research*.n.157.p.83-91, 2002.

JANCZYK, P.; FRANKE, H.; SOUFFRANT, W.B. Nutritional value of *Chlorella vulgaris*: Effects of ultrasonication and electroporation on digestibility in rats. *Animal Feed Science and Technology*.v.132.p.163-169, 2007.

JEON, Y. C.; CHO, C. W.; YUN, Y. S. Measurement of microalgal photosynthetic activity depending on light intensity and quality *Biochemical Engineering Journal*.n.27.p.127-131, 2005.

JIN, H.F.; LIM, B.; LEE, K. Influence of nitrate feeding on carbon dioxide fixation by microalgae. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. v.41.n.12.p.2813-2824, 2006.

KAJIWARA, S.; YAMADA, H.; NARUMASA, O. Design of the bioreactor for carbon dioxide fixation by *Synechococcus* PCC7942. *Energy Convers. Mgmt.* v.38.p.529-532, 1997.

KANG, H.; KWON, T.S.; LEE, J.Y.; MIN, G.S.; NAM, G.U.; YANG, J.W. Biological fixation of carbon dioxide by *Chlorella* sp. HA-1 using semi continuous cultivation method in photobioreactor. KR Patent 2002074029, 2002a.

KANG, H.; KWON, T.S.; LEE, J.Y.; MIN, G.S.; NAM, G.U.; YANG, J.W. Internally illuminated photobioreactor for biological carbon dioxide fixation. KR Patent 2002074030, 2002b.

KAYA, V.M. ; GOULET, J. ; DE LA NOÛE, J. ; PICARD, G. Effect of intermittent CO₂ enrichment during nutrient starvation on tertiary treatment of wastewater by alginate-immobilized *Scenedesmus bicellularis*. *Enzyme and Microbial Technology*.n.18.p.550-554, 1996.

KAWATA, M.; NANBA, M.; SHISHITO, Y.; SAKAI, N.; KARUBE, M. Carbon dioxide fixation with microalgae. JP Patent 10248553, 1998.

KEFLER, J.E. ; KLEINHEINZ, G.T. Use of *Chlorella vulgaris* for CO₂ mitigation in a photobioreactor. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*.n.29.p.275-280, 2002.

KITAYA, Y.; AZUMA, H. ; KIYOTA, M. Effects of temperature, CO₂/O₂ concentrations and light intensity on cellular multiplication of microalgae, *Euglena gracilis*. *Advances in Space Research*.n.35.p.1584-1588, 2005.

KLASSON, K.T.; ACKERSON, M.D.; CLAUSEN, E.C.; GADDY, J.L. Bioreactor design for synthesis gas fermentations. *Fuel*.n.70.p.605-614, 1991.

KURANO, N. Novel micro-algae and method for fixing high concentration carbon dioxide. JP Patent 07051051, 1995.

LAFARGA-DE LA CRUZ, F.; ESPINOZA, E.V.; NÚÑEZ, R.M.; TREES, C.C.; ÁNGEL, E.S.; CEBRERO, F.N. Nutrient uptake, chlorophyll a and carbon fixation by *Rhodomonas* sp. (Cryptophyceae) cultured at different irradiance and nutrient concentrations. *Aquacultural engineering*.n.35.p.51-60, 2006.

LEE, Y.K.; LOW, C.S. Productivity of outdoor algal cultures in enclosed tubular photobioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*.n.40.p.1119-1122, 1992.

LEE, B.D.; APEL, W.A.; WALTON, M.R. Screening of cyanobacterial species for calcification. *Biotechnology Progress*.n.20.p.1345-1351, 2004.

LEE, B.D.; APEL, W.A.; WALTON, M.R. Calcium carbonate formation by *Synechococcus* sp. strain PCC 8806 and *Synechococcus* sp. strain PCC 8807. *Bioresource Technology*.n.97.p.2427-2434, 2006.

LIN, H.Y.; LEU, J.Y.; LAN, C.R.; LIN, P.; CHANG, F. Kinetics of inorganic carbon utilization by microalgal biofilm in a flat plate photoreactor. *Chemosphere*.n.53.p.779-787, 2003.

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

MARCUS, Y. Distribution of inorganic carbon among its component species in cyanobacteria: do cyanobacteria in fact actively accumulate inorganic carbon? *Journal of Theoretical Biology*.n.185.p.31-45, 1997.

MATSUMOTO, H. HAMAZAKI, A.; TSUJI, T. Recovery and recycling of carbon dioxide in waste gases by photosynthetic fixation by microalgae and utilization of microalgae as fuels. JP Patent 09276648, 1997.

MELKONIAN-EZEKIAN, M.; PRAUSE, S. Removal of carbon dioxide from flue gases. DE Patent 4444191, 1996.

MERCHUK, J.C.; GLUZ, M.; MUKMENEV, I. Comparison of photobioreactors for cultivation of the red microalga *Porphyridium* sp. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*.n.75.p.1119-1126, 2000.

MERCHUK, J.C.; WU, X. A model integrating fluid dynamics in photosynthesis and photoinhibition processes. *Chemical Engineering Science*.n.56.p. 3527–3538, 2001.

MERCHUK, J.C.; WU, X. Simulation of algae growth in a bench scale internal loop airlift reactor. *Chemical Engineering Science*.n.59.p.2899 – 2912, 2004.

MIAO, X.; WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresource Technology*.n.97.p.841–846, 2006.

MÍGUEZ, J.L.; PORTEIRO, J.; LÓPEZ-GONZÁLEZ, L.M.; VICUÑA, J.E.; MURILO, S.; MORAN, J.C.; GRANADA, E. Review of the energy rating of dwellings in the European Union as a mechanism for sustainable energy. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.n.10.p.24-45, 2006.

MIYAIRI, S. CO₂ assimilation in a thermophilic cyanobacterium. *Energy Convers. Mgmt*.v.36.n.6-9.p.763-766, 1995.

MOLINA GRIMA, E.; FERNANDÉZ, F.G.A.; CAMACHO, F.G.; CHISTI, Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scale up. *Journal of Biotechnology*.n.70.p.231-247, 1999.

MORAIS, M.; COSTA, J. 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.

MORAIS, M.; COSTA, J. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide *Energy Conversion and Management*.v.48.p.2169-2173, 2007.

MORITA, M.; WATABE, Y. Microalgae *Chlorella* for carbon dioxide fixation. JP Patent 2001161347, 2001.

MUÑOZ, R.; GUIEYSSE, B. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Research*.n.40.p.2799-2815, 2006.

MURAKAMI, M.; IKENOUCHI, M. The biological fixation and utilization project by rite (2)-screening and breeding of micro algae with high capability in fixing CO₂. *Energy Convers. Mgmt*.v.38.p.493-497, 1997.

NAGASE, H.; EGUCHI, K.; YOSHIHARA, K.; HIRATA, K.; MIYAMOTO, K. Improvement of microalgal NO_x removal in bubble column and air-lift reactors . *Journal of fermentation and Bioengineering*.n.86.p.421-423, 1998.

OGAWA, T.; SAKAI, M.; MATSUOKA, M.; FUKUDA, H. Photosynthetic conversion of carbon dioxide to ethylene by the recombinant cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942, which harbors a gene for the ethylene-forming enzyme of *Pseudomonas syringae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*.v.84.n.5.p.434-443, 1997.

OHTAGUCHI, K.; KAJIWARA, S.; MUSTAQIM, D.;TAKAHASHI, N. Cyanobacterial bioconversion of carbon dioxide for fuel productions. *Energy Convers. Mgmt*.v.38.p.523-528, 1997.

OLVERA-NOVOA, M.A.; DOMÍNGUEZ, L.J.; OLVIRA-CASTILLO, L.; MARTÍNEZ-PALACIOS, C.A. Effect of the use of the microalgae *Spirulina maxima* as fish meal replacement in diets for tilapia, *Oreochromis mossambicus* P. fry. *Aquacult. Res*.n.71.p.219-225, 1999.

ONO, E.; CUELLO, J.L. Carbon dioxide mitigation using thermophilic cyanobacteria. *Biosystems Engineering*.n.96.p.129-134, 2007.

OTSUKI, T. A study for the biological CO₂ fixation and utilization system. *The Science of the Total Environment*. n.277.p.21-25, 2001.

PETIT, M. The greenhouse effect, impacts and possible solutions: overall credibility. *Geoscience* n.335.p.497-501, 2003.

PILKINGTON, A.; DYERSON, R.; TISSIER, O. The electric vehicle: patent data as indicators of technological development. *World Patent Information*.n.24.p.5–12, 2002.

PFANZ, H.; VODNIK, D.; WITTMANN, C.; ASCHAN, G.; BATIC, F.; TURK, B.; MACEK, I. Photosynthetic performance (CO₂-compensation point, carboxylation efficiency, and net photosynthesis) of timothy grass (*Phleum pratense* L.) is affected by elevated carbon dioxide in post-volcanic mofette areas. *Environmental and Experimental Botany*. *In Press*, 2007.

PULZ, O. ; SCHEINBENBOGEN, K. Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. *Advances Biochemical Engenieering and Biotechnology*.n.59.p.123-152, 1998.

REBOLLOSO FUENTES, M.M.; GÁRCIA SANCHEZ, J.L.; FERNANDEZ SEVILLA, J.M.; ACIEN FERNANDEZ, F.G.; SANCHEZ PEREZ, J.A.; MOLINA GRIMA, E. Outdoor continuous culture of *Porphyridium cruentum* in a tubular photobioreactor: quantitative analysis of the daily cyclic variation of culture parameters. *Journal of Biotechnology*.n.70.p.271-288, 1999.

RONEN-TARAZI, M.; SHINDER, V.; KAPLAN, A. A mutant of *Synechococcus* PCC 7942 impaired in HCO_3^- uptake. *FEMS Microbiology Letters*.n.159p.317-324, 1998.

RORRER, G., CHENEY, D. Bioprocess engineering of cell and tissue cultures for marine seaweeds. *Aquacultural Engineering*.n.32.p.11–41, 2004.

RORRER, G.L.; MULLIKIN, R.K. Modeling and simulation of a tubular recycle photobioreactor for macroalgal cell suspensions cultures. *Chemical engineering Science*.n.54.p.3153-3162, 1999.

SATO, T.; USUI, S.; TSUCHIYA, Y.; KONDO, Y. Invention of outdoor closed type photobioreactor for microalgae. *Energy Conversion and Management*.n.47p.791–799, 2006.

SAKAI, N.; SAKAMOTO, Y.; KISHIMOTO, N; CHIHARA, M.; KARUBE, I. *Chlorella* strains from hot springs tolerant to high temperature and high CO_2 . *Energy Cowers. Mgmt*.v.36.n.6-9.p.693-696, 1995.

SAKAMOTO, Y.; KARUBE, M.; SAKAI, N.; KISHIMOTO, N. Microalgae for fixation of carbon dioxide. JP Patent 07313141, 1995.

SAROFIM, M.C.; FOREST, C.E.; REINER, D.M.; REILLY, J.M. Stabilization and global climate policy. *Global and Planetary Change*.n.47.p.266– 272, 2005.

SCHMETTERER, G. Cyanobacterial Respiration. In: Bryant, D.A. *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Plubishers.p.409-435, 1994.

SCHRAG, D. Preparing to Capture Carbon. *Science*.n.315.p.811-813, 2007.

SHIN, H.; CHAE, S.R. Continuous photo bioreactor for carbon dioxide removal to inhibit global warming and mass-production of microalgae. KR Patent 2005081766, 2005.

SICKO-GOAD, L.; ANDRESEN, N.A. Effect of growth and light/dark cycles on diatom lipid content and composition. *J. Phycol*.n.27.p.710– 718, 1991.

SIMEONOVA, K.; DIAZ-BONE, H. Integrated climate-change strategies of industrialized countries. *Energy*.n.30.p.2537–2557, 2005.

SOBCZUK, T.M.; GARCIA CAMACHO, F.; CAMACHO RUBIO, F.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F.G.; MOLINA GRIMA, E. Carbon dioxide uptake efficiency by outdoor microalgal cultures in tubular airlift photobioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*.v.67.p.465-475, 1999.

SONG, C. Global challenges and strategies for control, conversion and utilization of CO₂ for sustainable development involving energy, catalysis, adsorption and chemical processing. *Catalysis Today*.n.115.p.2-32, 2006.

SPOLAORE, P.; CASSAN, C.J.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*.v.101.n.2.p.87-96, 2006.

STEWART, C.; HESSAMI, M. A study of methods of carbon dioxide capture and sequestration: the sustainability of a photosynthetic bioreactor approach. *Energy Conversion and Management*.n.46.p.403–420, 2005.

SUBRAMANIAN, G.; THAJUDDIN, N. Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Current Science*.v.89.n.1.p.47-57, 2005.

SUMI, Y. Apparatus for decreasing carbon dioxide in polluted air by photosynthetic microalgae. JP Patent 11089555, 1999.

SUNG, K.D.; LEE, J.S.; SHIN, C.S.; PARK, S.C. Isolation of a new highly CO₂ tolerant fresh water microalga chlorella sp. KR-1. *Renewable Energy*.n.16.p.1019-1022, 1999.

TATEZAWA, H.; TADASHI, A.; ETSUKO, T. Treatment of flue gases containing carbon dioxide with microalgae in global warming prevention. JP Patent 05023541, 1993.

TCHERNOV, D.; HASSIDIM, M.; LUZ, B.; SUKENIK, A.; REINHOLD, L.; KAPLAN, A. Sustained net CO₂ evolution during photosynthesis by marine microorganisms. *Current Biology*.n.7.p.723-728, 1997.

THITAKAMOL, B.;VEAWAB, A.; AROONWILAS, A. Environmental impacts of absorption-based CO₂ capture unit for post-combustion treatment of flue gas from coal-fired power plant. *International Journal of Greenhouse Gas Control*. *In Press*, 2007.

TSUTSUMI, M.; KAWACHI, K. Apparatus for carbon dioxide fixation with microalgae in a closed system. JP Patent 08038158, 1996.

TSUTSUMI, M.; KANEKO, M. Transparent carbon dioxide fixing apparatus for waste gas treatment. JP Patent 09057058, 1997.

UNFCCC. Kyoto Protocol to the United Nations Framework Convention on Climate Change (UNFCCC). <http://unfccc.int/resource/docs/convkp/kpeng.pdf>, 1997.

USUI, N.; IKENOUCI, M. The biological CO₂ fixation and utilization Project RITE(1) – highly effective photobioreactor system. *Energy Convers. Mgmt.* v.38.p.487-492, 1997.

VALIENTE, E.F.; LEGANES, F. Regulatory effect of pH and incident irradiance on the levels of nitrogenase activity in cyanobacterium *Nostoc* UAM 205. J. Plant Physiol.n.135.p.623-627, 1989.

VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; KIM, Y.; WU, W.; BERZIN, B.; MERCHUK, J.C. Air-lift bioreactors for algal growth on flue gas: mathematical modeling and pilot-plant studies. Ind. Eng. Chem. Res.n.44.p.6154-6163, 2005.

WATANABE, Y.; HALL, D. Photosynthetic CO₂ conversion technologies using a photobioreactor incorporating microalgae - energy and material balances. Energy Convers. Mgmt.v.37.n.6-8.p.1321-1326, 1996.

WATANABE, Y.; SAIKI, H. Development of a photobioreactor incorporating *Chlorella* sp. for removal of CO₂ in stack gas. Energy Conversion and Management.n.38.p.499-503, 1997.

WEISSMAN, J. C.; RADWAY, J. C.; WILDEH, E. W.; BENEMANN, J. R. Growth and production of thermophilic cyanobacteria in a simulated thermal mitigation process. Bioresource Technology.n.65 p.87-95, 1998.

WU, Y.C.J.; LEE, P.J. The use of patent analysis in assessing ITS innovations: US, Europe and Japan. Transportation Research Part A.n.41.p.568-586, 2007.

WUEBBLES, D.J.; JAIN, A.K. Concerns about climate change and the role of fossil fuel use. Fuel Processing Technology.n.71.p.99-119, 2001.

XU, H.; MIAO, X.; WU, Q. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. Journal of Biotechnology.n.126.p.499-507, 2006.

YAMADA, H.; OHKUNI, N.; KAJIWARA, S.;OHTAGUCHI, K. CO₂-removal characteristics of *Anacystis nidulans* R2 in airlift bioreactors. Energy.v.22.n.2/3.p.349-352, 1997.

YEN, H.W.; BRUNE, D.E. Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane. Bioresource Technology.n.98.p.130-134, 2007.

YOON, J.H. High cell density culture of *Anabaena variabilis* using repeated injections of carbon dioxide for the production of hydrogen. International Journal of Hydrogen Energy.v.27.p.1265-1270, 2002.

YOSHIHARA, K.I.; NAGASE, H.; EGUCHI, K.; HIRATA, K.; MIYAMOTO, K. Biological elimination of nitric oxide and carbon dioxide from flue gas by marine microalga NOA-113

cultivated in a long tubular photobioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*.n.82.p.351-354, 1996.

YUE, L.; CHEN, W. Isolation and determination of cultural characteristics of a new highly CO₂ tolerant fresh water microalgae. *Energy Convers. Mgmt.*v.46.p.1896-1846, 2005.

YUN, Y.S.; LEE, S.B.; PARK, J.M.; LEE, C.; YANG, J. Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients. *Journal Chemical Technology and Biotechnology*.n.69.p.451-455, 1997.

ZAK, E.; NORLING, B.; MAINTRA, R.; HUANG, F.; ANDERSSON, B.; PAKRASI, B. The initial steps of biogenesis of cyanobacterial photosystems occurs in plasma membranes. *Plant Biology*.n.32.v.98.p.13443-13448, 2001.

ZHANG, K.; MIYACHI, S.; KURANO, N. Evaluation of a vertical flat-plate photobioreactor for outdoor biomass production and carbon dioxide bio-fixation: effects of reactor dimensions, irradiation and cell concentration on the biomass productivity and irradiation utilization efficiency. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*v.55.p.428-433, 2001.

ZEILER, K.; HEACOX, D.; TOON, S.; KADAM, K.; BROWN, L. The use of microalgae for assimilation and utilization of carbon dioxide from fossil fuel-fired power plant flue gas. *Energy Convers. Mgmt.*v.36.n.6-9.p.707-712, 1995.

Capítulo 3

Produção de biomassa e fixação de dióxido de carbono em fotobiorreatores tubulares por *Aphanothece microscopica* Nägeli

RESUMO

O modelo metabólico preferencial das cianobactérias é a fotossíntese, processo no qual estes organismos crescem as expensas de carbono inorgânico. Atualmente, é sugerido o uso de cianobactérias no seqüestro de dióxido de carbono oriundo de resíduos industriais, de forma a associar a remoção de carbono com a produção de biomoléculas. Em face disto, o trabalho teve por objetivos avaliar a cinética de crescimento da *Aphanothece microscopica Nägeli* em diferentes condições de temperatura, intensidade luminosa e concentração de CO₂. As condições experimentais foram temperaturas de 21,5, 25, 30, 35 e 38,5°C, luminosidades de 960, 3000, 6000, 9000 e 11000lux e concentrações de ar enriquecido com dióxido de carbono nas proporções de 3, 15, 25, 50 e 62%. Os resultados demonstram a potencialidade da aplicação da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli* em processos de seqüestro de carbono.

Palavras Chave: Cianobactéria, dióxido de carbono, fotobiorreator.

1 Introdução

A fotossíntese é o principal processo biológico da natureza para a fixação de dióxido de carbono. Além das plantas superiores e algas, as cianobactérias são organismos capazes de utilizar estas rotas metabólicas, para a obtenção de energia. A capacidade de realizar fotossíntese associada à faculdade de fixar nitrogênio atmosférico, confere a estes microrganismos às necessidades nutricionais mais simples de todos os seres conhecidos, já que podem proliferar em ambientes que proporcionem além de nitrogênio molecular, dióxido de carbono, água, luz e sais minerais (Jeon et al., 2005; Lin et al., 2003; Ardelean & Zarnea, 1998).

As características da fotossíntese, originalmente elucidadas para as algas verdes e plantas superiores são aplicáveis também para as cianobactérias. Estes microrganismos, no entanto, possuem aspectos particulares no que se refere ao metabolismo, já que elevadas atividades fotossintéticas são medidas não somente na região espectral entre 665-680nm, onde a luz é melhor absorvida pela clorofila, mas também na faixa de comprimento de onda entre 560 a 620nm, onde a ficoeritrina e a ficocianina absorvem luz efetivamente. Este maior espectro de absorção sugere a eficiência fotossintética destes microorganismos quando comparado aos demais organismos fotossintetizantes (Campbell et al., 1998).

Fotobiorreatores para o cultivo de microalgas e cianobactérias são sistemas baseados em processos naturais em que o metabolismo fotossintético dos microrganismos converte energia luminosa, calor, nutrientes dissolvidos e CO₂ em

produtos como o oxigênio e biomassa (Contreras et al., 1999). Estes organismos podem utilizar substratos de baixo custo como fonte de energia e nutrientes, como por exemplo, a energia solar e o dióxido de carbono. Nos últimos anos, estes processos têm recebido considerável atenção, motivados pela associação do tratamento de resíduos com o desenvolvimento de novos produtos e determinados componentes naturais de interesse industrial como corantes, ácidos graxos, polissacarídeos e proteínas (Merchuk & Wu, 2001; Muñoz & Guieysse, 2006). Em face disto, o trabalho teve por objetivos avaliar a cinética de crescimento da *Aphanothece microscopica Nægeli* em diferentes condições de temperatura, intensidade luminosa e concentração de CO₂.

2 Considerações Cinéticas

A velocidade específica de crescimento, μ , é a medida de quão rápido uma população microbiana cresce. Altos valores de μ são indicativos de elevadas taxas de crescimento microbiano. As taxas específicas de crescimento para diferentes tempos de residência são determinadas numericamente através do ajuste da concentração celular (X) a uma função polinomial, de acordo com Equação 1 (Bailey & Ollis, 1985):

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

A determinação da fase exponencial de crescimento é realizada através do gráfico ($\ln X$) vs (t), para diferentes limites iniciais e finais de tempo, determinado-se através do melhor coeficiente de correlação, o início e a duração da fase exponencial de crescimento. O coeficiente angular da melhor correlação fornecerá o valor de μ_{\max} , ou seja, a velocidade específica máxima de crescimento.

Ao lado das velocidades específicas de crescimento, a fase exponencial é frequentemente caracterizada pelo tempo de geração, t_g , que é o intervalo de tempo necessário para dobrar o valor da concentração celular, considerando-se que a velocidade específica de crescimento é constante e máxima. Aplicando-se esta definição a Equação 1, separando as variáveis e realizando a integração, obtém-se:

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_{\max}} \quad (2)$$

Estes modelos são frequentemente utilizados para avaliar os parâmetros cinéticos de diversos cultivos microbianos (Kitaya et al., 2005; Ahmad & Holland, 1995; Gaden, 1955).

3 Material e Métodos

3.1 Microrganismo e meio de cultura

As culturas de *Aphanothece microscopica Nægeli* (RSMAN92) foram propagadas e mantidas em meio sintético BGN (Rippka et al., 1979), com a seguinte composição: $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ($0,040g \cdot L^{-1}$), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ($0,075g \cdot L^{-1}$), EDTA ($0,001g \cdot L^{-1}$), H_3BO_3 ($2,860g \cdot L^{-1}$), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ($1,810g \cdot L^{-1}$), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ($0,222g \cdot L^{-1}$), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ($0,390g \cdot L^{-1}$), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ($0,079g \cdot L^{-1}$), $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ ($0,040g \cdot L^{-1}$), $NaNO_3$ ($150g \cdot L^{-1}$), $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ($0,006g \cdot L^{-1}$), citrato de amônio e ferro ($0,006g \cdot L^{-1}$), pH 8,0. As condições utilizadas foram 25°C, 1klux de luminosidade e fotoperíodo de 12h.

3.2 Fotobiorreator

Os experimentos foram realizados em um fotobiorreator de coluna de bolhas. O sistema foi construído em vidro de 4mm de espessura, com um diâmetro interno de 7,5cm e uma altura de 75cm, perfazendo um volume nominal de trabalho de 3,0L. O sistema de dispersão de ar consiste em um difusor de 1,5cm de diâmetro, localizado no centro da coluna. O reator foi continuamente iluminado com 16 lâmpadas fluorescentes de 20W, conectadas em paralelo, localizadas em uma câmara de fotoperíodo. Diferentes números de lâmpadas foram combinados em cada lado da câmara para a obtenção da intensidade luminosa desejada. A alimentação dos gases foi provida através de ar comprimido e um cilindro de CO_2 industrial. A mistura ar/ CO_2 foi controlada por 3 rotâmetros que medem a vazão de dióxido de carbono, ar e a mistura entre os gases respectivamente. A Figura 1 apresenta o diagrama experimental.

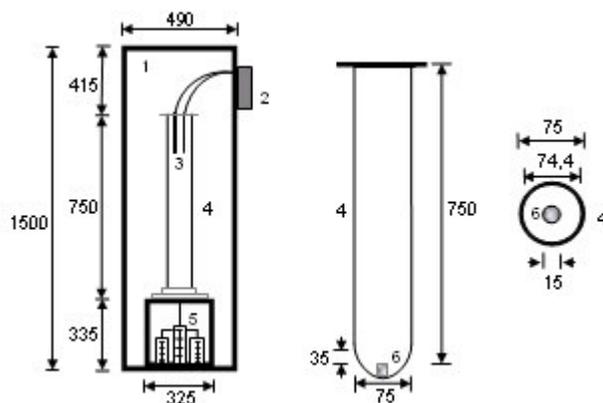


Figura 1: Diagrama experimental. 1: Câmara de fotoperíodo; 2: Analisador de pH, temperatura e CO_2 ; 3: Sensores de pH, temperatura e CO_2 ; 4: Fotobiorreator; 5: Sistema para controle da vazão e mistura de gases; 6: Difusor de gases. Dimensões em mm.

3.3 Obtenção e análise dos dados cinéticos em reator de bancada

Os experimentos foram realizados em biorreatores, operando em regime intermitente, alimentados com 3,0L de meio sintético BGN. As condições dos experimentos foram: concentração celular inicial de 100 mg.L⁻¹, reator isotérmico, operando em diferentes temperaturas, intensidades luminosas e aeração contínua de 1 VVM com injeção de ar enriquecido com dióxido de carbono. A concentração celular foi monitorada a cada 12 horas durante as fases de crescimento de microrganismo.

A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para determinar as condições ótimas de incorporação de carbono, em função de três fatores experimentais (temperatura, luminosidade e concentração de ar enriquecido com dióxido de carbono). Um planejamento composto central com 5 níveis foi utilizado para avaliar a relação entre as condições de cultivo (variáveis independentes) com a taxa de carbono incorporado a biomassa (variável dependente). O planejamento experimental e as análises estatísticas foram realizados utilizando o software Statistica 7.0 (Statsoft, USA). Os níveis das variáveis experimentais utilizadas são expressos na Tabela 1:

Tabela 1: Valores das variáveis independentes para os diferentes níveis do planejamento.

Variável Independente	Símbolo	Nível				
		-1,68	-1	0	1	+1,68
Temperatura (°C)	X ₁	21,5	25	30	35	38,5
Luminosidade (klux)	X ₂	0,96	3	6	9	11
Concentração CO ₂ (%)	X ₃	3	15	25	50	62

Para um sistema de 3 fatores, o modelo estatístico é definido pela Equação 3:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (3)$$

A taxa de carbono incorporada à biomassa (CB) foi calculada através da análise elementar da biomassa, conforme a Equação 4 (Kajiwara et al., 1997):

$$CB = C_c \cdot \left(\frac{dX}{dt} \right) \left(\frac{M_{CO_2}}{M_c} \right) \quad (4)$$

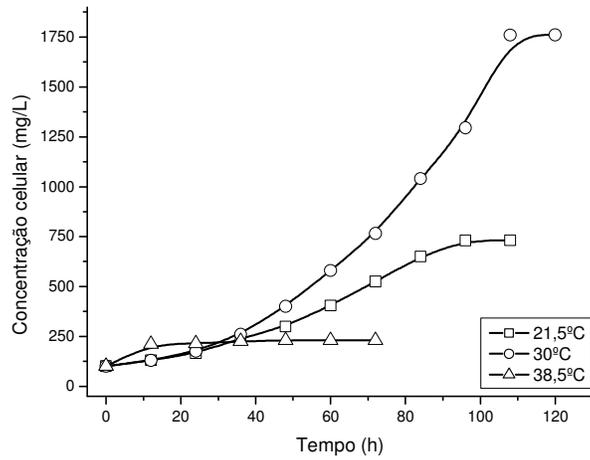
3.4 Métodos Analíticos

A concentração celular foi avaliada gravimetricamente, através da filtração de um volume conhecido de meio de cultura em filtro de diâmetro 0,45µm, seco a 60°C por 24 horas (APHA, 1998). A intensidade luminosa foi determinada a partir de um luxímetro digital (Minipa MLM 1010, precisão de ± 4%). A temperatura foi controlada por termostatos, e medida através de um sensor polarográfico (Metler Toledo InPro5000 Series). A vazão de dióxido de carbono, ar e ar enriquecido com CO₂ foram determinadas

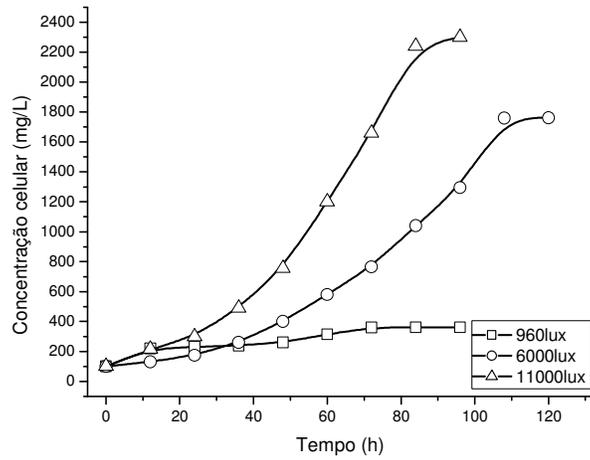
a partir de rotômetros (AFSG 100 Key Instruments, precisão de $\pm 5\%$). A composição elementar das células da *Aphanothece microscopica Nägeli* foi determinada através de um analisador elementar CHNS/O (2400-Perkin Elmer). Amostras de 2mg de biomassa foram oxidadas a 1000°C, e os gases resultantes foram determinados a partir de um sensor de condutividade térmica para carbono. O padrão utilizado foi a acetanilida, com composição de 71,09% de carbono, 11,84% de oxigênio, 6,71% de hidrogênio e 10,36% de nitrogênio.

4 Resultados e Discussão

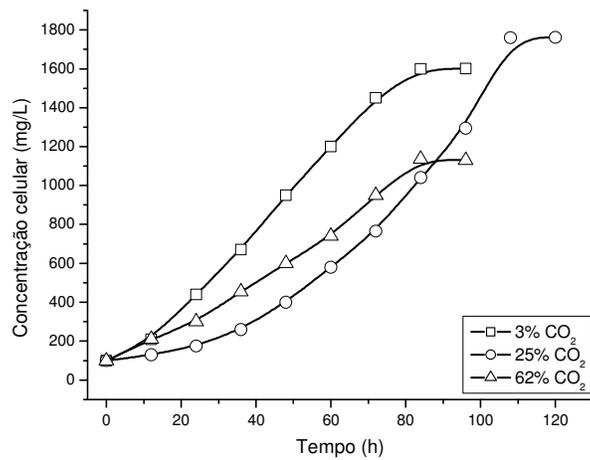
As curvas de crescimento representativas da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli* a partir das diferentes condições de cultivo fotossintético estão expressas na Figura 2. Comparando-se as curvas de crescimento entre si, observa-se a ausência de fase de adaptação do microrganismo, atingindo-se a fase logarítmica de crescimento a partir das 12h cultivo, seguida por uma fase estacionária e em algumas condições por uma fase de declínio. De acordo com Guerrero et al., (1999) a ausência da fase de adaptação em curvas de crescimento de microalgas é característica de meios de cultura com elevadas disponibilidades de carbono e nutrientes inorgânicos. Para todos os cultivos, após um tempo de residência máximo de 5 dias as curvas de crescimento já indicavam as características da fase estacionária, obtendo-se as máximas densidades celulares neste período. Resultados similares foram obtidos por Yue & Chen (2005) e Hsueh et al., (2007) no cultivo fotossintético das microalgas *Chlorella ZY-1* e *Nannochloopsis oculata*, obtendo taxas positivas de crescimento em tempos de residência inferiores a 120h.



(A)



(B)



(C)

Figura 2: Curvas de crescimento representativas em função da temperatura, luminosidade e concentração de CO₂. (A) Efeito da temperatura (6000lux e 25% de CO₂). (B) Efeito da luminosidade (30°C e 25% de CO₂). (C) Efeito da concentração de CO₂ (30°C e 6000lux).

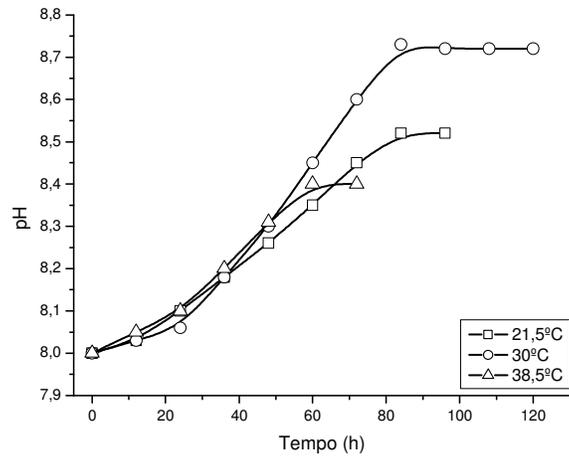
A Tabela 2 apresenta a caracterização da cinética de crescimento da *Aphanothece microscopica Nägeli*, em termos das velocidades máximas específicas de crescimento (μ_{max}), coeficiente de determinação (R^2), tempo de geração (tg), tempo de duração da fase logarítmica de crescimento (t_{log}) e concentrações celulares máximas (X_{max}). A partir da análise destes resultados, observa-se que as máximas velocidades específicas de crescimento são obtidas em cultivos conduzidos a 35°C, 9klux e 15% CO₂, não diferindo significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) dos cultivos realizados a 30°C, 11klux e 25% CO₂. Os máximos valores de μ_{max} são similares às obtidas por outros autores para espécies *Euglena gracilis* e *Anabaena variabilis* cultivadas em metabolismo fotossintético (Kitaya et al., 2005; Yoon, 2002). Estes cultivos, no entanto, foram conduzidos com enriquecimento de dióxido de carbono em concentrações máximas de 13% (v/v), sugerindo a tolerância da *Aphanothece microscopica Nägeli* a gases enriquecidos com elevadas concentrações de CO₂, uma vez que elevadas taxas de crescimento foram obtidas com até 62% de dióxido de carbono. Em relação aos tempos de geração, observou-se variação entre 23,1 a 231,1h, em função das diferentes condições de cultivo, indicando a dependência do crescimento celular em função das condições de temperatura, luminosidade e concentração de ar enriquecido com dióxido de carbono na operação do fotorreator. As fases logarítmicas de crescimento, determinadas por regressão linear dos dados, indicaram crescimentos exponenciais entre 36-108h. A máxima densidade celular obtida foi de 3,0 g.L⁻¹, em cultivos com ar enriquecido com 15% de dióxido de carbono, 35°C e 9klux. Estes resultados sugerem esta condição experimental como a mais adequada para a produção de biomassa pela cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli* nas condições avaliadas.

Tabela 2: Parâmetros cinéticos para a *Aphanothece microscopica* Nägeli.

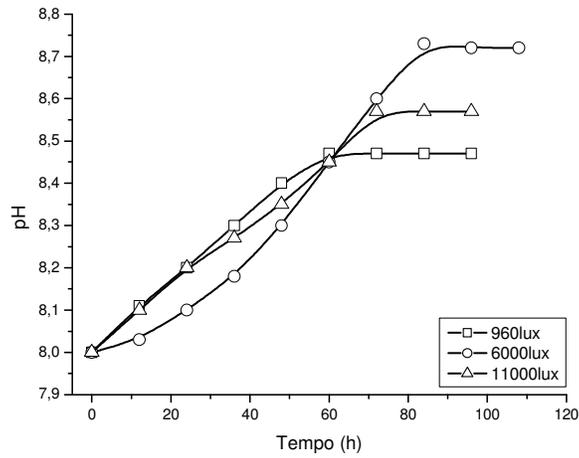
Condição			Parâmetro cinético				
X ₁ (°C)	X ₂ (klux)	X ₃ (%)	μ _{max} (h ⁻¹)	R ²	tg (h)	t _{log} (h)	X _{max} (mg/L)
35,0	3	15	0,027	0,99	25,67	60	1672
35,0	9	15	0,034	0,94	20,38	72	3000
35,0	3	50	0,022	0,99	31,50	72	500
35,0	9	50	0,025	0,97	27,72	72	600
25,0	3	15	0,010	0,97	69,31	36	270
25,0	9	15	0,013	0,90	53,31	108	455
25,0	3	50	0,023	0,98	30,13	108	600
25,0	9	50	0,023	0,98	30,13	96	905
30,0	6	25	0,028	0,99	24,75	108	1760
30,0	6	3	0,021	0,97	33,01	48	1600
21,5	6	25	0,024	0,99	28,88	84	730
30,0	11	25	0,030	0,98	23,10	72	2300
38,5	6	25	0,003	0,98	231,1	36	230
30,0	0,96	25	0,008	0,94	86,64	72	360
30,0	6	62	0,023	0,98	30,13	72	1135

O crescimento celular associado à assimilação de dióxido de carbono do meio coincidiu com o aumento dos valores de pH. A Figura 3 apresenta as curvas representativas da variação do pH no meio de cultivo em função do tempo de residência. A faixa de pH observada variou entre 6,0 a 9,9, indicando que a espécie HCO₃⁻ foi a forma de carbono predominante.

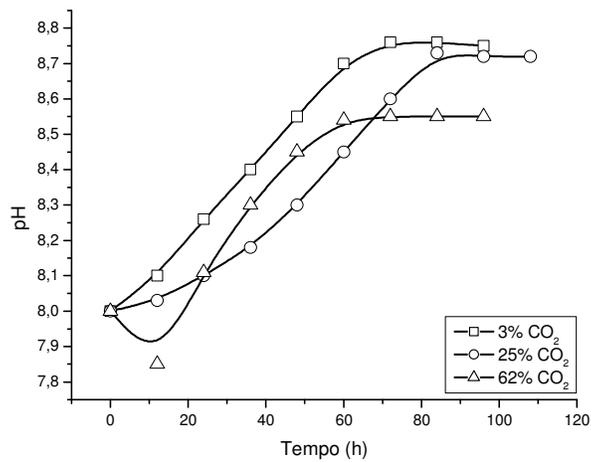
A elevação gradativa do pH no meio de cultura, independente da condição considerada, indica que os cultivos ocorreram na faixa de pH alcalino. Reduções no valor inicial do pH do meio de cultivo são observadas apenas em cultivos com concentrações de dióxido de carbono iguais ou superiores a 50%. Por outro lado, os valores mais elevados de pH são verificados em cultivos com altas densidades celulares, sugerindo a predominância do metabolismo fotossintético do microrganismo, nas condições experimentais. Este comportamento é evidenciado por Yue & Chen, (2005), que reportam que máximas taxas de crescimento são obtidas em valores mais elevados de pH do meio de cultivo. De acordo com Berenguel et al., (2004), o incremento do pH em cultivos fotossintéticos ocorre devido à atividade biológica das células que produz uma redução no conteúdo de carbono inorgânico dissolvido através do consumo necessário ao crescimento celular, forçando um deslocamento do equilíbrio carbonato-bicarbonato no sistema tampão.



(A)



(B)



(C)

Figura 3: Curvas representativas da variação do pH em função da temperatura, luminosidade e concentração de CO₂. (A) Efeito da temperatura (6000lux e 25% de CO₂). (B) Efeito da luminosidade (30°C e 25% de CO₂). (C) Efeito da concentração de CO₂ (30°C e 6000lux).

O crescimento microbiano inclui uma seqüência de reações bioquímicas que levam a síntese de biomassa, obedecendo ao princípio da conservação da matéria. Neste sentido, os nutrientes do meio de cultura se conservam na forma de biomassa (Leveau & Bouix, 1985). Considerando-se o metabolismo fotossintético das cianobactérias, no qual a energia luminosa e o dióxido de carbono são convertidos em oxigênio, biomassa e outros produtos, uma fração do CO₂ adicionado no fotobiorreator é transformada em biomassa, em um processo denominado de fixação biológica de carbono (Stewart & Hessami, 2005). Desta forma, a Tabela 3 apresenta os valores da taxa de carbono incorporado à biomassa para as diferentes condições experimentais.

Tabela 3: Matriz codificada do efeito da temperatura, luminosidade e concentração de CO₂ na taxa de carbono incorporado à biomassa.

Experimento	Temperatura (X ₁)	Luminosidade (X ₂)	CO ₂ (X ₃)	CB (mg/L.h)
1	+1	-1	-1	24,80
2	+1	+1	-1	45,78
3	+1	+1	+1	11,84
4	+1	-1	+1	11,36
5	-1	-1	-1	3,45
6	-1	+1	-1	6,30
7	-1	-1	+1	8,88
8	-1	+1	+1	16,30
9	-1,68	0	0	12,78
10	+1,68	0	0	4,61
11	0	+1,68	0	39,07
12	0	-1,68	0	6,15
13	0	0	-1,68	30,44
14	0	0	+1,68	21,01
15	0	0	0	26,20
16	0	0	0	25,96
17	0	0	0	26,04

O resultado dos efeitos e interações entre os fatores temperatura, luminosidade e concentração de dióxido de carbono, bem como os coeficientes do modelo estão expressos na Tabela 4. A partir da análise dos dados, observa-se que na faixa avaliada, a taxa de carbono incorporada à biomassa é controlada pelos fatores luminosidade(L), temperatura(Q), interação entre a temperatura(L) com a concentração de dióxido de carbono(L) e pela concentração de dióxido de carbono(L), nesta ordem de importância. Os demais fatores e interações possuem significância estatística em menor proporção.

Tabela 4: Coeficientes do modelo estimados por regressão linear.

Fator	Efeitos	Erro Padrão	t(2)	p	Coeficientes	Estimativas por intervalo	
						-95%	+95%
Média	26,22	0,07	372,47	0,00000	26,22	25,92	26,53
X ₁ (L)	6,60	0,06	99,88	0,00010	3,30	3,16	3,44
X ₁ (Q)	-13,39	0,07	-183,95	0,00003	-6,69	-6,85	-6,53
X ₂ (L)	12,75	0,06	192,85	0,00002	6,37	6,23	6,51
X ₂ (Q)	-3,55	0,07	-48,78	0,00042	-1,77	-1,93	-1,61
X ₃ (L)	-7,00	0,06	-105,86	0,00008	-3,50	-3,64	-3,35
X ₃ (Q)	-1,34	0,07	-18,52	0,00290	-0,67	-0,83	-0,51
X ₁ (L) × X ₂ (L)	2,79	0,08	32,37	0,00095	1,39	1,21	1,58
X ₁ (L) × X ₃ (L)	-15,70	0,08	-181,72	0,00003	-7,85	-8,03	-7,66
X ₂ (L) × X ₃ (L)	-3,98	0,08	-46,08	0,00047	-1,99	-2,17	-1,80

Desta forma, o modelo estatístico para a variável resposta taxa de carbono incorporada a biomassa é apresentado pela Equação 5:

$$Y = 26,2 + 3,3X_1 - 6,7X_1^2 + 6,4X_2 - 1,77X_2^2 - 3,5X_3 - 0,67X_3^2 + 1,4X_1X_2 - 7,85X_1X_3 - 2,0X_2X_3 \quad (6)$$

Os diagramas de contorno (Figura 4) apresentam a variação da taxa de carbono incorporado à biomassa em função dos fatores de estudo. Neste sentido, o aumento da incorporação de carbono na biomassa é obtido não apenas fixando o fator luminosidade em seu nível superior, isto é, conduzir os cultivos em elevadas intensidades luminosas, mas também fixar a temperatura na região central e a concentração de dióxido de carbono no nível inferior (reduzidas proporções de enriquecimento de CO₂ no ar de entrada).

As taxas de carbono incorporadas à biomassa variaram entre 3,45 a 45,78 mg/L.h para as diferentes condições de cultivo. Estes resultados são superiores aos obtidos por Kajiwara et al., (1997), no cultivo da cianobactéria *Synechococcus* PCC7942, em fotobiorreatores, nas condições de 30°C, 8klux e ar enriquecido com dióxido de carbono em 5%, que verificaram taxas máximas de incorporação na ordem de 25mg/L.h, o que reflete a adaptação do microrganismo em estudo as condições experimentais, sugerindo a importância da otimização das condições de operação do fotoreator, para a obtenção de elevadas taxas de fixação biológica de carbono.

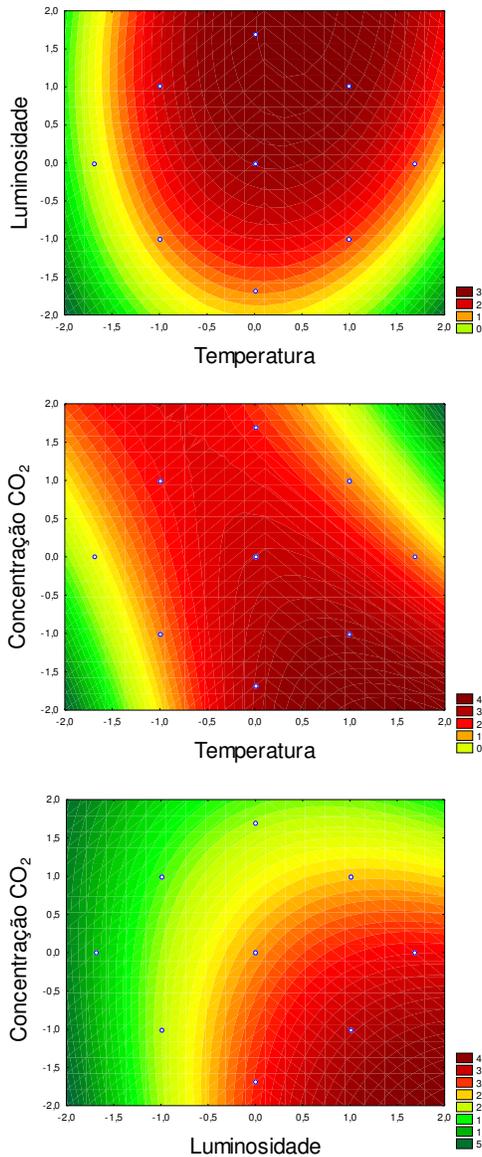


Figura 4: Diagramas de contorno para a variável taxa de carbono incorporado a biomassa.

Diferentes autores relatam à importância das condições ambientais no crescimento de cianobactérias. Parâmetros como temperatura, intensidade luminosa, pH e concentração de dióxido de carbono têm sido indicados como de fundamental importância para o desenvolvimento destes microrganismos (Subramanian & Thajuddin, 2005). Desta forma, verificou-se que os cultivos conduzidos na faixa de 30-35°C, 9-11klux e 15-25% de CO₂, favorecem o crescimento celular, associado à incorporação de carbono as células. Estes resultados estão de acordo com Muñoz & Guieysse, (2006), que reportam que a eficiência de sistemas utilizando microalgas, normalmente decresce em temperaturas reduzidas e temperaturas excessivas, o que justificaria o baixo desempenho celular dos cultivos conduzidos a 21,5 e 38,5°C quando comparados ao cultivo realizado a 30°C nas mesmas condições de intensidade luminosa e concentração de CO₂. De acordo com

Grossman et al., (1994), a temperatura ótima para o desenvolvimento de cianobactérias situa-se na faixa de 25 a 35°C.

Em relação às intensidades luminosas avaliadas, verificou-se que a máxima irradiância utilizada foi insuficiente para promover o fenômeno de fotoinibição celular, já que em condições de 11000 lux, registraram-se elevadas taxas de crescimento. Por outro lado, observou-se que quando os cultivos foram conduzidos a 960 lux, houve redução pronunciada do crescimento celular, sugerindo que nestas condições há limitação da energia necessária para a seqüência da reação fotossintética, que irá ocasionar na fixação de carbono. Diversos trabalhos (Kitaya et al., 2005; Molina Grima et al., 1999; Pulz & Scheinbenbogen, 1998; Lee & Low, 1992) demonstram o efeito inibidor de luminosidades inadequadas. De acordo com estes autores, a atividade fotossintética se eleva com o aumento da irradiação até determinados valores em que começa a ocorrer inibição do crescimento celular.

O efeito de diferentes concentrações de dióxido de carbono nos gases de entrada do fotobiorreator é analisado por Yue & Chen (2005), que indicam atividades fotossintéticas em concentrações de até 70% (v/v) de ar enriquecido com CO₂, que é usualmente a principal fonte de carbono em cultivos fotossintéticos de cianobactérias. De acordo com Cuaresma et al., (2006), a forma com que as cianobactérias se adaptam para utilizar CO₂ como fonte de carbono está relacionado com os mecanismos de concentração de carbono (CCM). O desenvolvido mecanismo fotossintético destes organismos permite o transporte do CO₂ livre e dos íons bicarbonato através de uma fina membrana plasmática, sendo acumulados na célula como um reservatório de carbono, possibilitando a assimilação de carbono inorgânico na forma de bicarbonato e dióxido de carbono livre (Badger & Price, 2003; Zak et al., 2001). Os melhores resultados em relação ao crescimento celular e incorporação de carbono na biomassa foram obtidos em concentrações de ar enriquecido com CO₂ na proporção de 15%, sendo observado uma redução na eficiência do fotobiorreator em vazões inferiores ou superiores a 0,45L_{CO2}/min. De acordo Cheng et al., (2006), a concentração de dióxido de carbono na corrente de ar do fotobiorreator é um parâmetro determinante no cultivo fotossintético de microalgas, já que a concentração deste composto não deverá ser excessivamente baixa, de modo a limitar a disponibilidade de carbono às células, e também não deverá exceder um limite superior, evitando perdas de CO₂ que não são utilizadas pelo microrganismo e são liberadas para a atmosfera.

A validação do modelo estatístico, definido pela Eq. 6 é confirmada através da Tabela 5, que apresenta a análise de variância para ajuste dos dados ao modelo quadrático.

Tabela 5: Análise de variância para o ajuste do modelo

Fonte Variação	Soma Quadrática	Graus Liberdade	Média quadrática	F _{calculado}
Regressão	1938,8	9	215,42	2,83 ^a
Resíduos	532,66	7	76,09	
Falta Ajuste	532,63	5	106,52	
Erro Puro	0,03	2	0,015	
Total	2741,44	16		

^aSignificância estatística ($p < 0,1$)

A validação do modelo é verificada a partir da distribuição F, que sugere a existência de uma relação quadrática entre as variáveis, indicando que o modelo proposto se ajusta aos dados experimentais. O modelo estatístico obtido apresenta um percentual máximo de variação explicada de 99,99%.

5 Conclusão

Os parâmetros cinéticos de crescimento da *Aphanothece microscopica Nägeli* demonstraram a tolerância do microrganismo a elevadas concentrações de dióxido de carbono, sugerindo a sua potencialidade na aplicação em processos de remoção biológica de CO₂. Os valores dos parâmetros cinéticos obtidos situaram-se entre 0,003-0,034h⁻¹ e 3,45-45,78 mg.L⁻¹.h⁻¹ para as velocidades máximas específicas de crescimento e taxa de carbono incorporado a biomassa respectivamente.

Nomenclatura

μ : velocidade específica de crescimento (h⁻¹)
X: concentração celular (mg.L⁻¹)
t: tempo de residência (h)
 μ_{max} : velocidade máxima específica de crescimento (h⁻¹)
Y: variável resposta
tg: tempo de geração (h)
R²: coeficiente de determinação
X_{max}: concentração celular máxima (mg.L⁻¹)
t_{log}: tempo de duração da fase logarítmica de crescimento (h)
CB: taxa de carbono incorporado a biomassa (mg.L⁻¹.h⁻¹)
C_c: Percentual de carbono da biomassa (%)
M_{CO2}: peso molecular do CO₂
M_C: peso molecular do carbono
Y: Variável resposta
X₁, X₂, X₃: variáveis independentes do modelo estatístico
 β : parâmetros do modelo estatístico

6 Referências Bibliográficas

AHMAD, M.N.; HOLLAND, C.R. Growth kinetics of single-cell protein in batch fermenters. *Journal of Food Engineering*.n.26.p.443–452, 1995.

APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 20^o ed. American Public Health Association, D.C,1998.

ARDELEAN, I.; ZARNEA, G. Photosynthesis respiration interplay in cyanobacteria, fundamentals and application. *Cyanobacterial biotechnology*.p.103-107, 1998.

BADGER, M.R.; PRICE, G.D. CO₂ concentration mechanisms in Cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *Journal of experimental Botany*.v.54.n.383.p.609-622, 2003.

BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. *Biochemical engineering fundamentals*.2nd ed. McGraw-Hill, 1986.

BERENGUEL, M.; RODRIGUEZ, F.; ACIÉN, F.G.; GARCIA, J.L. Model predictive control of pH in tubular photobioreactors. *Journal of Process Control*.n.14.p.377-387, 2004.

CAMPBELL, D.; HURRY, V.; CLARKE, A.K.; GUSTAFSSON, P.; ÖQUIST, G. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*.n.30.p.667-680, 1998.

CHENG, L.; ZHANG, L.; CHEN, H.; GAO, C. Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. *Separation and Purification Technology*.n.50.p.324-329, 2006.

CONTRERAS, A.; GARCIA, F.; MOLINA GRIMA, E.; MERCHUK, J.C. Influence of sparger on energy dissipation, shear rate, and mass transfer to sea water in a concentric-tube airlift bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*.n.25.p.820–830, 1999.

CUARESMA, M.; GARBAYO, I.; VEGA, J.M.; VÍLCHEZ, C. Growth and photosynthetic utilization of inorganic carbon of the microalga *Chlamydomonas acidophila* isolated from Tinto river. *Enzyme and Microbial Technology*.n.40.p.158-162, 2006.

GADEN, E.L.Jr. Fermentation kinetics and productivity. *Chemistry and Industry*.n.12.p.154-163, 1955.

GUERRERO, L.; OMIL, F.; MENDEZ,R.; LEMA, J. M., 1999. Anaerobic hydrolysis and acidogenesis of wastewaters from food industries with high content of organic solids and protein. *Water Research*.v.33.n.15.p.3281-3250.

GROSSMAN, A.R.; SCHAEFER, M.R.; CHIANG, G.G.; COLLIER, J.L. The Responses of cyanobacteria to environmental conditions: light and nutrients. In: Bryant, D.A. *The Molecular Biology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers.p.641-668, 1994.

HSUEH, H.T.; CHU, H.; YU, S.T. A batch study on the bio-fixation of carbon dioxide in the absorbed solution from a chemical wet scrubber by hot springs and marine algae. *Chemosphere*.n.66.p.878-886, 2007.

JEON, Y.C.; CHO, C.W.; YUN, Y.S. Measurement of microalgal photosynthetic activity depending on light intensity and quality *Biochemical Engineering Journal*.n.27.p.127-131, 2005.

KAJIWARA, S.; YAMADA, H.; NARUMASA, O. Design of the bioreactor for carbon dioxide fixation by *Synechococcus* PCC7942. *Energy Conversion and Management*.v.38.p.529-532, 1997.

KITAYA, Y. ; AZUMA, H. ; KIYOTA, M. Effects of temperature, CO₂/O₂ concentrations and light intensity on cellular multiplication of microalgae *Euglena gracilis*. *Advances in Space Research*.n.35.p.1584-1588, 2005.

LEE, Y.K.; LOW, C.S. Productivity of outdoor algal cultures in enclosed tubular photobioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*.n.40.p.1119-1122, 1992.

LEVEAU, J.Y.; BOUIX, M. Cinéticas microbianas . In: Scriban, R. 1^º Ed. Manole, 1985.

LIN, Y.H.; LEU, J.Y.; LAN, C.R.; LIN, P.P.; CHANG, F.L. Kinetics of inorganic carbon utilization by microalgal biofilm in a flat plate photoreactor. *Chemosphere*.n.53.p.779-787, 2003.

MERCHUK, J.C.; WHU, X. A model integrating fluid dynamics in photosynthesis and photoinhibition processes. *Chemical Engineering Science*.n.56.p.3527–3538, 2001.

MIYARI, S. CO₂ assimilation in thermophilic cyanobacterium. *Energy conservation and Management*.v.36.p.673-679, 1995.

MOLINA GRIMA, E.; FERNANDÉZ, F.G.A.; CAMACHO, F.G.; CHISTI, Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scale up. *Journal of Biotechnology*.n.70.p.231-247, 1999.

MUÑOZ, R.; GUIEYSSE, B. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Research*.n.40.p.2799-2815, 2006.

PULZ, O. ; SCHEINBENBOGEN, K. Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. *Advances Biochemical Engineering and Biotechnology*.n.59.p.123-152, 1998.

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*.n.111.p.1-61, 1979.

STEWART, C.; HESSAMI, M. A study of methods of carbon dioxide capture and sequestration: the sustainability of a photosynthetic bioreactor approach. *Energy Conversion and Management*.n.46.p.403–420, 2005.

SUBRAMANIAN, G.; THAJUDDIN, N. Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Current Science*.v.89.n.1.p.47-57, 2005.

YOON, J.H. High cell density culture of *Anabaena variabilis* using repeated injections of carbon dioxide for the production of hydrogen .*International Journal of Hydrogen Energy*.n.27.p.1265-1270, 2002.

YUE, L.; CHEN, W. Isolation and determination of cultural characteristics of a new highly CO₂ tolerant fresh water microalgae. *Energy Conversion and Management*.n.46.p.1896-1846, 2005.

ZAK, E.; NORLING, B.; MAINTRA, R.; HUANG, F.; ANDERSSON, B.; PAKRASI, B. The initial steps of biogenesis of cyanobacterial photosystems occurs in plasma membranes. *Plant Biology*.v.32.n.98.p.13443-13448, 2001.

Capítulo 4

**Taxas de remoção de dióxido de carbono
em fotobiorreatores tubulares por
Aphanothece microscopica Nägeli**

RESUMO

O método integral de análise de dados cinéticos foi utilizado para descrever a remoção de dióxido de carbono dissolvido na fase aquosa de um fotobiorreator tubular pela cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli*. O efeito da concentração de dióxido de carbono (3, 15, 25, 50 e 62%), intensidade luminosa (960, 3000, 6000, 9000 e 11000lux) e temperatura (21,5, 25, 30, 35 e 38,5°C) foi considerado a partir de um planejamento composto central, visando determinar as condições de maior eficiência do sistema. A metodologia de superfície de resposta demonstrou a importância dos parâmetros de operação do fotobiorreator na cinética de remoção de dióxido de carbono, ocorrendo um bom ajuste do modelo cinético de primeira ordem aos dados experimentais.

Palavras chave: dióxido de carbono, fotobiorreator, cianobactéria.

1 Introdução

Numerosas pesquisas vêm sugerindo que cianobactérias marinhas poderiam ser consideradas como uma solução para a redução dos níveis de dióxido de carbono atmosférico (Buessler et al., 2007; Bryant & Frigaard, 2006). A fotossíntese que ocorre nos oceanos é responsável por aproximadamente 40% do carbono global fixado anualmente no planeta. Este processo é realizado por microrganismos unicelulares que constituem o fitoplâncton, onde as espécies dominantes são compostas por cianobactérias que auxiliam na redução da concentração de carbono inorgânico nos oceanos, num processo cíclico no qual o carbono orgânico é reoxidado através da respiração heterotrófica, enriquecendo os oceanos com carbono inorgânico. Estas bombas biológicas auxiliam na manutenção da concentração atmosférica de dióxido de carbono (Falkowski, 1997).

Baseado nestes sistemas biológicos, diversos processos de engenharia bioquímica estão sendo conduzidos, no qual o metabolismo de microrganismos fotossintéticos converte a energia luminosa e dióxido de carbono em moléculas naturais (Molina Grima et al., 2006). Estes sistemas visam à redução das emissões de dióxido de carbono oriundo da manufatura de diversos segmentos industriais, através da incorporação deste poluente a uma biomassa (Cheng et al., 2006).

O desenvolvimento da tecnologia de fotobiorreatores está sendo revista detalhadamente, com foco em fotobiorreatores tubulares, que são considerados os sistemas mais promissores para a produção em larga escala de bioprodutos obtidos através do cultivo de microalgas, com remoção simultânea de CO₂ (Ono & Cuello, 2006; Molina Grima et al., 1999).

A eficiência destes processos, entretanto, tem sido demonstrada apenas teoricamente, no qual avaliações mais detalhadas são necessárias para a utilização destes sistemas visando à obtenção de créditos de carbono. Em relação às taxas de remoção de dióxido de carbono, expressas em termos de modelos cinéticos, poucas são as referências na literatura que relatam o desempenho de cianobactérias e/ou microalgas no consumo fotossintético de carbono inorgânico (Lin et al., 2003), o que sugere a necessidade de pesquisas visando avaliar a influência de parâmetros do processo nas taxas de remoção biológica de CO₂. Desta forma, este estudo apresenta uma quantificação inicial, visando descrever a cinética de remoção de dióxido de carbono por cianobactérias, tendo como objetivos avaliar as taxas de remoção de CO₂ em fotobiorreatores.

2 Modelagem Cinética

O método integral de análise de dados cinéticos é usualmente utilizado para interpretar os dados de consumo de substrato e para encontrar as equações da taxa (Eroglu et al., 1999, Beltran-Heredia et al., 2000). Neste método, assume-se uma determinada ordem de reação e integra-se a equação diferencial usada para modelar o sistema em batelada. Neste procedimento de tentativa-erro, se as considerações estiverem corretas, o gráfico da concentração vs. tempo deverá ser linear.

Para a reação simplificada (CO₂ → Produtos), conduzida em reator batelada a volume constante, o balanço molar é descrito pela Equação 1:

$$\frac{-d[CO_2]}{dt} = r_{co_2} \quad (1)$$

Assumindo que a velocidade de reação é função apenas da concentração de dióxido de carbono, podemos escrever a lei de velocidade na seguinte forma:

$$-r_{co_2} = k[CO_2]^n \quad (2)$$

Considerando-se reação de primeira ordem (n=1) e combinado a lei de velocidade com o balanço molar, obtemos a Equação 3:

$$\frac{-d[CO_2]}{dt} = k[CO_2] \quad (3)$$

Integrando-se a equação diferencial, com [CO₂]=[CO₂]₀ em t=0, a Equação 3 torna-se:

$$\ln \frac{[CO_2]_0}{[CO_2]} = kt \quad (4)$$

Desta forma, um gráfico de $\ln([\text{CO}_2]_0/[\text{CO}_2])$ em função do tempo deverá ser linear, com inclinação correspondente a constante de velocidade de reação (k).

Entretanto, deve-se considerar que a variação do dióxido de carbono em função do tempo não é devida apenas à remoção microbiana e físico-química, parte do CO_2 é perdida nos gases de exaustão (dessorção). A taxa real de remoção de dióxido de carbono no sistema é obtida, mediante a determinação da constante de velocidade resultante (k_R), que corresponde a diferença entre as constante da velocidade de reação para os processos de absorção (k_1) e dessorção (k_2). Desta forma, com os valores de k_R e com a concentração de CO_2 no sistema, considerando uma reação de primeira ordem, é possível obter a taxa de remoção de dióxido de carbono.

3 Material e Métodos

3.1 Microrganismo e meio de cultura

As culturas de *Aphanothece microscopica Nægeli* (RSMAN92) foram propagadas e mantidas em meio sintético BGN (Ripka et al., 1979), com a seguinte composição: $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($0,040\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,075\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), EDTA ($0,001\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), H_3BO_3 ($2,860\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($1,810\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,222\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,390\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($0,079\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($0,040\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), NaNO_3 ($150\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($0,006\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), citrato de amônio e ferro ($0,006\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), pH 8,0. As condições utilizadas foram 25°C , 1 klux de luminosidade e fotoperíodo de 12h.

3.2 Fotobiorreator

Os experimentos foram realizados em fotobiorreator de coluna de bolhas. O sistema foi construído em vidro de 4mm de espessura, com um diâmetro interno de 7,5cm e uma altura de 75cm, perfazendo um volume nominal de trabalho de 3,0L. O sistema de dispersão de ar consiste em um difusor de 1,5cm de diâmetro, localizado no centro da coluna. O reator foi continuamente iluminado com 16 lâmpadas fluorescentes de 20W, conectadas em paralelo, localizadas em uma câmara de fotoperíodo. Diferentes números de lâmpadas foram combinados em cada lado da câmara para a obtenção da intensidade luminosa desejada. A alimentação dos gases foi provida através de ar comprimido e um cilindro de CO_2 industrial. A mistura ar/ CO_2 foi controlada por 3 rotâmetros que medem a vazão de dióxido de carbono, ar e a mistura entre os gases respectivamente.

3.3 Obtenção e análise dos dados cinéticos em reator de bancada

Os experimentos foram realizados em biorreatores, operando em regime intermitente, alimentados com 3,0L de meio sintético BGN. As condições dos experimentos foram: concentração celular inicial de 100 mg.L^{-1} , reator isotérmico, operando em diferentes temperaturas, intensidades luminosas e aeração contínua de 1VVM com injeção de ar enriquecido com dióxido de carbono em diferentes concentrações. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para determinar as condições ótimas de remoção de dióxido de carbono, em função de três fatores experimentais (temperatura, luminosidade e concentração de ar enriquecido com dióxido de carbono). A partir de um planejamento composto central com 5 níveis foi avaliado a relação entre as condições de cultivo (variáveis independentes) com a taxa de remoção de CO_2 (variável dependente). O planejamento experimental e as análises estatísticas foram realizados utilizando o software Statistica 7.0 (Statsoft, USA). Os níveis das variáveis experimentais utilizadas são expressos na Tabela 1:

Tabela 1: Valores das variáveis independentes para os diferentes níveis do planejamento.

Variável Independente	Símbolo	Nível				
		-1,68	-1	0	1	+1,68
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	X_1	21,5	25	30	35	38,5
Luminosidade (klux)	X_2	0,96	3	6	9	11
Concentração CO_2 (%)	X_3	3	15	25	50	62

Para um sistema de 3 fatores, o modelo estatístico é definido pela Equação 5 (Box, Hunter & Hunter, 1978):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (5)$$

3.4 Determinação da concentração de CO_2 dissolvido e obtenção dos perfis de concentração

A concentração de dióxido de carbono dissolvido na fase líquida foi avaliada através do método dinâmico, no qual a transferência de CO_2 foi interrompida a cada 12h de cultivo, e a concentração de dióxido de carbono livre medida como uma função do tempo por um período de 5 min, com tomadas de dados a cada 0,5 min. As estimativas da dessorção de dióxido de carbono foram realizadas através de experimentos controle, na ausência do microrganismo, para cada condição experimental em função de concentração de CO_2 , temperatura e agitação envolvidas no sistema. Os dados de concentração de dióxido de carbono dessorvido da fase líquida foram registrados em regime transiente, a cada 0,5min, por um período de 5 min. Uma vez obtida a variação das concentrações de dióxido de carbono absorvido e dessorvido para todo o cultivo, a fase exponencial de

crescimento foi determinada numericamente através do ajuste da concentração celular a uma função polinomial, e para este período, calculados as médias da variação da concentração de dióxido de carbono absorvido em função do tempo. As duas séries de dados experimentais (absorção média e dessorção) obtidas foram ajustadas a um modelo cinético de primeira ordem para estimativa das variáveis cinéticas de remoção e perda de dióxido de carbono no sistema.

3.5 Métodos Analíticos

A concentração de dióxido de carbono dissolvido e a temperatura foram determinadas através de um sensor polarográfico (Metler Toledo InPro5000 Series, precisão de $\pm 10\%$). As medidas de intensidade luminosa incidente no reator foram realizadas na superfície externa da coluna, a partir de um luxímetro digital (Minipa MLM 1010, precisão de $\pm 4\%$). A vazão de dióxido de carbono, ar e ar enriquecido com CO₂ foram determinadas através de rotâmetros (AFSG 100 Key Instruments, precisão de $\pm 5\%$). A concentração celular foi avaliada gravimetricamente, através da filtração de um volume conhecido de meio de cultura em filtro de diâmetro 0,45 μ m, seco a 60°C por 24 horas (APHA, 1998).

4 Resultados e Discussão

A partir do planejamento experimental proposto, 17 experimentos avaliando diferentes combinações de temperatura, intensidade luminosa e concentração de dióxido de carbono foram realizados. O método integral de análise proposto foi utilizado para interpretar os resultados de remoção de substrato e para encontrar as equações da taxa de remoção de dióxido de carbono. Durante estas análises, o volume do fotobiorreator foi considerado constante. Variações significativas na temperatura e na concentração não foram consideradas, uma vez que o sistema de aeração fornecia uma dispersão adequada da mistura reagente. A Figura 1 apresenta o ajuste dos dados experimentais com o modelo de remoção de dióxido de carbono proposto, nas diferentes condições avaliadas. Considerou-se que a variação total da concentração de dióxido de carbono livre em função do tempo é representada pela variação ocasionada pela presença do microrganismo no biorreator somada as perdas de CO₂ nos gases de exaustão, sendo ambas as medidas realizadas na fase líquida do sistema. Os dados cinéticos correspondem ao valor médio de remoção de dióxido de carbono na fase exponencial de crescimento.

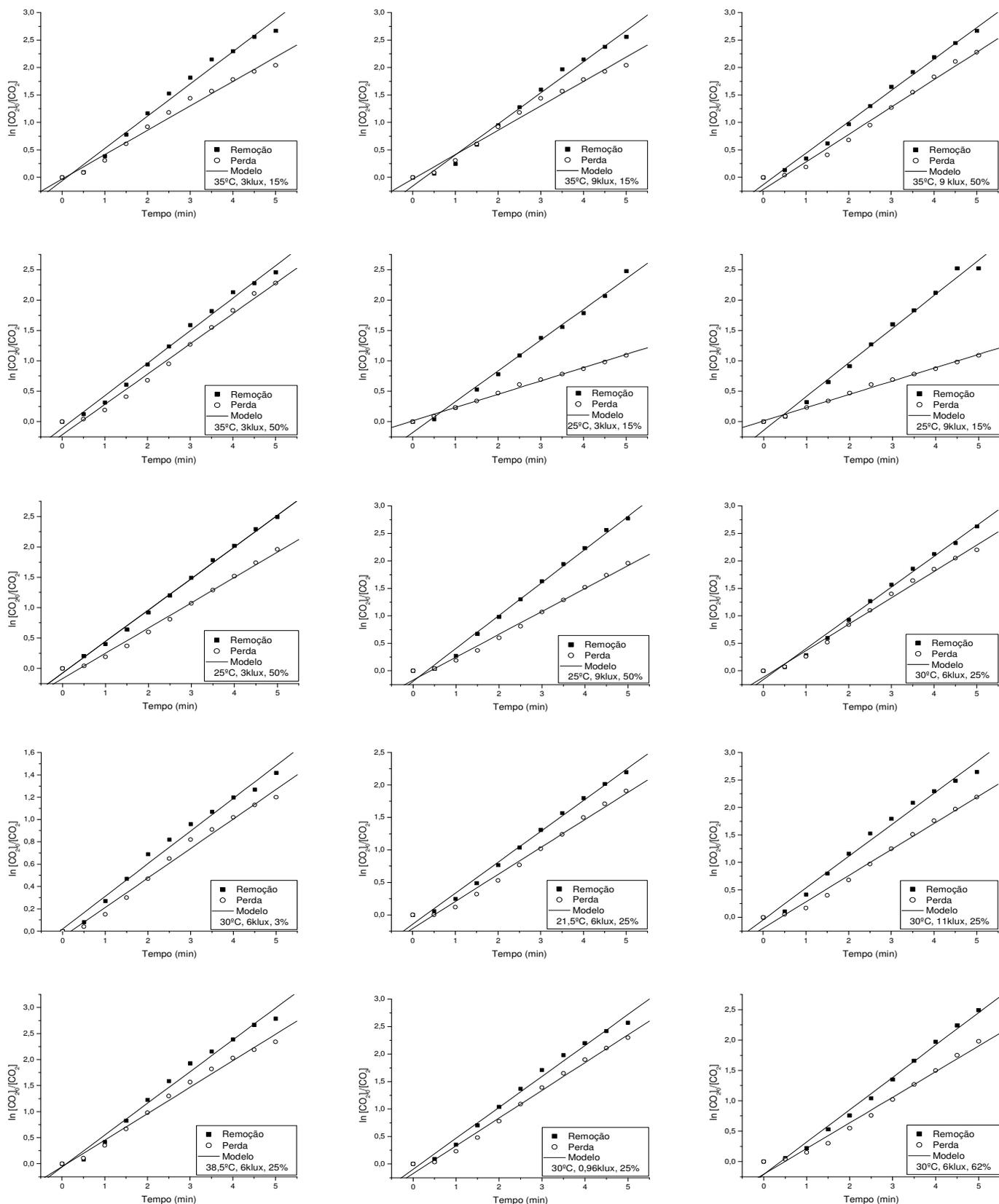


Figura 1: Ajuste dos dados experimentais pelo método integral de análise para cinética de primeira ordem (medidas de concentração de CO₂ na fase líquida do sistema).

Verifica-se a partir da análise da Figura 1, independente da condição considerada um ajuste satisfatório do modelo proposto, considerando as dificuldades experimentais e a dispersão das condições avaliadas. Estes resultados são melhor elucidados na Tabela 2, que apresenta os parâmetros cinéticos para o ajuste do modelo.

Tabela 2: Parâmetros cinéticos para a taxa de remoção de dióxido de carbono.

Condição			Parâmetro Cinético							
X ₁ (°C)	X ₂ (klux)	X ₃ (%)	k ₁ (min ⁻¹)	R ²	k ₂ (min ⁻¹)	R ²	k _R (min ⁻¹)	k ₁ /k ₂	C _{CO2} (mg/L)	μ _{max} (dia ⁻¹)
35,0	3	15	0,587	0,985	0,444	0,984	0,143	1,32	130	0,648
35,0	9	15	0,560	0,988	0,444	0,984	0,116	1,26	131	0,816
35,0	3	50	0,534	0,991	0,490	0,986	0,044	1,09	594	0,528
35,0	9	50	0,570	0,994	0,490	0,986	0,080	1,16	590	0,601
25,0	3	15	0,506	0,990	0,210	0,996	0,300	2,41	24	0,240
25,0	9	15	0,559	0,990	0,210	0,996	0,350	2,66	25	0,312
25,0	3	50	0,518	0,997	0,416	0,989	0,102	1,24	593	0,552
25,0	9	50	0,600	0,993	0,416	0,989	0,184	1,44	596	0,552
30,0	6	25	0,561	0,993	0,482	0,991	0,080	1,16	280	0,672
30,0	6	3	0,290	0,985	0,264	0,987	0,030	1,09	50	0,504
21,5	6	25	0,470	0,993	0,410	0,983	0,060	1,14	455	0,576
30,0	11	25	0,575	0,987	0,475	0,988	0,100	1,21	340	0,720
38,5	6	25	0,610	0,986	0,500	0,990	0,110	1,22	260	0,072
30,0	0,96	25	0,562	0,990	0,504	0,990	0,060	1,11	330	0,192
30,0	6	62	0,530	0,990	0,420	0,981	0,110	1,26	790	0,552

Os elevados coeficientes de determinação obtidos indicam a adequacidade do modelo proposto aos dados experimentais. Valores equivalentes da constante de velocidade de reação são obtidos na presença (k₁) e ausência (k₂) do microrganismo, o que sugere que proporções significativas de dióxido de carbono são perdidas nos gases de exaustão. Esta constatação indica que o dióxido de carbono está sendo adicionado em excesso no meio de cultivo, onde apenas uma fração do CO₂ adicionado é convertida em biomassa e outros produtos do metabolismo fotossintético. Resultados similares são evidenciados por Berenguel et al., (2004) e Chae et al., (2006), que citam que concentrações elevadas de CO₂ nos gases de entrada do biorreator proporcionam consideráveis perdas para a atmosfera. Segundo estes autores, o suprimento em excesso de gás carbônico poderia favorecer a disponibilidade da fonte de carbono as células, de forma a não limitar a atividade metabólica. Entretanto, a adição excessiva deste composto provoca perdas que não são aproveitadas pelas culturas, resultando em poluição ambiental desnecessária. Embora o sistema ocasiona perdas significativas de CO₂ para a atmosfera, verificou-se que independente da condição considerada, taxas positivas (k₁>k₂)

de remoção de dióxido de carbono foram obtidas no fotobiorreator, sugerindo que parte do dióxido de carbono transferido ao meio de cultura é removido pela ação do metabolismo fotossintético da *Aphanothece microscopica* Nägeli.

É verificado ainda que as maiores razões entre a constante de velocidade de dióxido de carbono absorvido em função da constante de velocidade de dióxido de carbono desorvido (k_1/k_2) ocorrem nas condições de 25°C, 15% de dióxido de carbono (2,66), independente da intensidade luminosa, o que sugere que o processo ocorre de forma mais eficiente nestas condições, com uma compensação superior entre adição e perda de dióxido de carbono. O cultivo conduzido a 50% de dióxido de carbono, 9klux e 25°C apresenta valores intermediários de razão entre CO₂ removido e CO₂ perdido. Estes resultados quando corroborados com as taxas de remoção de dióxido de carbono (Tabela 3), indicam esta condição de cultivo como um ponto de equilíbrio entre as taxas de remoção e a eficiência do processo. Esta aparente discrepância entre os dados, é justificada à medida que as perdas de dióxido de carbono nos gases de exaustão se elevam com acréscimo da concentração de CO₂ na mistura com o ar, ocasionando a elevação da concentração de dióxido de carbono livre dissolvido no estado estacionário. Desta forma, como a taxa de remoção de dióxido de carbono é proporcional a concentração do gás dissolvido, as elevadas constantes da taxa obtidas nas condições de 15% de ar enriquecido com CO₂ não são suficientes para compensar os valores elevados de dióxido de carbono livre obtidos em condições de ar enriquecido com elevadas proporções de dióxido de carbono. Segundo os resultados de Fridlyand et al., (1996) as razões entre as taxas de CO₂ absorvido e desorvido podem variar entre 0,66 a 4,0 em função da atividade enzimática envolvida no metabolismo fotossintético, ocorrendo perdas de eficiência do processo à medida que a concentração de carbono inorgânico se eleva no ambiente externo.

A velocidade específica de crescimento, μ , é uma medida de quão rápido uma população microbiana está crescendo. Elevados valores de μ são indicativos de altas taxas de crescimento. Observa-se a partir dos dados cinéticos de crescimento celular, que as velocidades máximas específicas de crescimento obtidas variaram entre 0,072-0,816 dia⁻¹. Entretanto, verifica-se que as condições que apresentaram maiores taxas de remoção de dióxido de carbono, não correspondem as maiores velocidades de crescimento, o que sugere a possibilidade de um deslocamento da reação fotossintética através da conversão de CO₂ em biopolímeros extracelulares, não quantificados na biomassa. A produção destes compostos por microalgas é evidenciada por diversos autores (De Philippis & Vincenzini, 1998; Otero & Vincenzini, 2003; Parikh & Madamwar,

2006), que reportam que a síntese de compostos exocelulares está associada diretamente com as condições ambientais em que o microrganismo é submetido. Estes estudos citam possibilidade de estimular a produção de polissacarídeos extracelulares através da manipulação de determinadas variáveis ambientais como a intensidade luminosa, temperatura e disponibilidade de fontes de nitrogênio e carbono. De Philippis & Vincenzini, (1998) relatam que condições de stress metabólico favorecem a produção destes compostos, o que justificaria os experimentos com lenta formação de células terem substanciais taxas de assimilação de dióxido de carbono. Além disso, estes autores reportam que a acumulação de reservas de carbono intracelular ocasiona um incremento na produção de carboidratos extracelulares, sugerindo que o incremento da concentração de CO₂ nos gases de entrada favorece a incorporação de carbono em compostos excretados ao meio de cultivo. Por outro lado, Lee, Apel & Walton (2006) reportam que neste tipo de sistema para o seqüestro de CO₂, uma fração muito pequena de carbono é convertida em biomassa, quando comparado à precipitação de espécies químicas na forma de bicarbonatos e carbonatos.

A metodologia de superfície de resposta foi utilizada para determinar as condições operacionais do fotobiorreator visando otimizar a taxa de dióxido de carbono removido da fase aquosa do sistema. A Tabela 3 apresenta a matriz codificada do planejamento composto central.

Tabela 3: Matriz codificada do efeito da temperatura, luminosidade e concentração de CO₂ na taxa de remoção de dióxido de carbono.

Experimento	Temperatura	Luminosidade	Concentração CO ₂	-r _{CO2} (mg/L.min)
1	+1	-1	-1	18,59
2	+1	+1	-1	15,08
3	+1	+1	+1	47,70
4	+1	-1	+1	25,96
5	-1	-1	-1	7,20
6	-1	+1	-1	8,40
7	-1	-1	+1	60,18
8	-1	+1	+1	108,56
9	-1,68	0	0	27,30
10	+1,68	0	0	28,60
11	0	-1,68	0	19,80
12	0	+1,68	0	34,01
13	0	0	-1,68	1,50
14	0	0	+1,68	86,90
15	0	0	0	22,40
16	0	0	0	22,10
17	0	0	0	22,60

Tabela 4: Coeficientes do modelo estimados por regressão linear.

Fator	Efeitos	Erro Padrão	t(2)	p	Coeficientes	Estimativas por intervalo	
						-95%	+95%
Média	21,64	0,05	375,63	0,00000	21,64	21,39	21,89
X ₁ (L)	-11,03	0,05	-203,82	0,00002	-5,51	-5,63	-5,39
X ₁ (Q)	9,12	0,05	153,21	0,00004	4,56	4,43	4,69
X ₂ (L)	11,50	0,05	212,63	0,00002	5,75	5,63	5,87
X ₂ (Q)	11,03	0,05	185,26	0,00002	5,51	5,38	5,64
X ₃ (L)	34,88	0,05	644,58	0,00000	17,44	17,32	17,55
X ₃ (Q)	0,004	0,05	0,07	0,94415	0,002	-0,12	0,13
X ₁ (L) × X ₂ (L)	-7,96	0,07	-112,60	0,00007	-3,98	-4,13	-3,82
X ₁ (L) × X ₃ (L)	-28,41	0,07	-401,81	0,00000	-14,20	-14,35	-14,05
X ₂ (L) × X ₃ (L)	17,98	0,07	254,31	0,00001	8,99	8,83	9,14

O resultado dos efeitos e interações entre os fatores temperatura, luminosidade e concentração de dióxido de carbono, bem como os coeficientes do modelo estão expressos na Tabela 4. A partir da análise dos dados, observa-se que na faixa avaliada, a taxa de dióxido de carbono removido da fase aquosa é controlada principalmente pelos fatores concentração de dióxido de carbono(L) e pela interação entre a temperatura e a concentração de CO₂(L). Os demais efeitos e interações, com exceção do fator X₃(Q) possuem significância estatística em menor proporção.

Desta forma, o modelo estatístico para a variável resposta taxa de remoção de CO₂ é apresentado pela Equação 6:

$$Y = 21,64 - 5,51X_1 + 4,56X_1^2 + 5,75X_2 + 5,51X_2^2 + 17,44X_3 - 3,98X_1X_2 - 14,20X_1X_3 + 8,99X_2X_3 \quad (6)$$

Os diagramas de contorno (Figura 2) apresentam a variação da taxa de remoção de CO₂ em função dos fatores de estudo. Neste sentido, o aumento da remoção de dióxido de carbono da fase líquida do sistema é obtido fixando os fatores luminosidade e concentração de dióxido de carbono no nível superior, isto é, operando o fotobiorreator em elevadas intensidades luminosas e concentrações de CO₂, como também fixando a temperatura nos níveis inferiores.

As taxas de remoção de dióxido de carbono dissolvido da fase aquosa do fotoreator variaram entre 1,50 a 108,56 mg.L⁻¹.min⁻¹ para as diferentes condições de cultivo. Estas taxas de remoção não representam, no entanto, valores correspondentes somente à assimilação biológica do dióxido de carbono.

Diversos processos físico-químicos e biológicos estão envolvidos na remoção de dióxido de carbono da fase líquida do sistema. Devido à elevada reatividade do gás carbônico em soluções aquosas vários equilíbrios são estabelecidos. O primeiro equilíbrio refere-se à dissolução do gás na água formando ácido carbônico, que sofre dissociação quase instantânea em íons bicarbonato e carbonato em função do pH do meio de cultivo,

sendo a concentração de carbono inorgânico total dada pelo somatório das espécies CO_3^{2-} , HCO_3^- e CO_2 (Rorrer & Mullikin, 1999). Desta forma, devido ao equilíbrio do sistema tampão carbonato-bicarbonato, uma fração do dióxido de carbono transferido é transformada nestes compostos durante estas reações químicas. Segundo Marcus (1996), a presença de cálcio no meio de cultivo, ocasiona o seqüestro do carbonato, e a conseqüente redução na proporção de carbonato livre. Lee, Apel & Walton (2006) indicam que quantidades substanciais de dióxido de carbono podem ser seqüestrados de meios de cultura contendo cianobactérias através da precipitação de CaCO_3 . Estes autores relatam que a precipitação destes compostos catalisada pelo crescimento e fisiologia de cianobactérias representa um mecanismo potencial de fixação de dióxido de carbono através do desenvolvimento de um ambiente alcalino no meio de cultura.

Além disso, a reação de carboxilação fotossintética catalisada pela ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase (rubisco) usa especificamente o dióxido de carbono como substrato gerando fosfoglicerato. A taxa fotossintética destes organismos pode ser reduzida e limitada pelo suprimento de CO_2 , já que a ausência de mecanismos para bombear CO_2 até os sítios de carboxilação pode ser responsável pela redução da atividade. No entanto, evidências demonstram que estes organismos podem manter elevados níveis de carbono inorgânico intracelular através de um mecanismo biofísico de concentração de carbono (CCM), no qual ocorre o transporte ativo dos íons bicarbonato através da membrana plasmática para dentro das células. O bicarbonato é convertido a CO_2 pela anidrase carbônica, suprindo a rubisco com este substrato (Falkowski, 1997). A anidrase carbônica é uma das mais eficientes enzimas conhecidas, sua atividade ocasiona elevações nos níveis de CO_2 intracelular em concentrações de até 1000 vezes superiores à concentração do fluído externo. Neste sentido, devido à permeabilidade das membranas plasmáticas ao CO_2 , proporções significativas podem difundir para do meio interno e para o meio externo. Tchernov et al., (1997) demonstraram experimentalmente este efeito, no qual as células quando ativadas fotossinteticamente podem ser fontes de CO_2 para o fluído ao seu redor. Estes fluxos estão relacionados à atividade fotossintética e estão acoplados as condições em que o microrganismo está sendo cultivado (Falkowski, 1997). Segundo Fridlyand et al., (1996) modelos quantitativos têm sido propostos para prever as perdas e o acúmulo e de CO_2 retido através do CCM intracelularmente. O modelo proposto por estes autores consiste em considerar a célula da cianobactéria próxima a uma esfera, dividida em 6 compartimentos, no qual as espécies de carbono inorgânico presentes podem reagir quimicamente e difundir-se através das membranas por gradientes de concentração de carbono inorgânico. Este modelo cinético considera os mecanismos enzimáticos propostos por Michaelis e Menten

associado aos mecanismos de transporte ativo, equações de difusão, mecanismos de equilíbrio químico e as características geométricas do sistema, no qual é gerado um conjunto de equações diferenciais para representar as taxas de alteração na concentração das espécies de carbono inorgânico nos vários compartimentos celulares. Desta forma, este complexo mecanismo utilizado por estes microrganismos para reter as distintas formas de carbono inorgânico pode estar associado às elevadas taxas de remoção de dióxido de carbono da fase líquida do sistema. Estas taxas, entretanto, não correspondem numericamente à proporção de carbono fixado biologicamente, uma vez que grandes quantidades são apenas acumuladas intracelularmente para posterior assimilação, resultando em taxas de fixação superestimadas, devido à limitação da técnica utilizada.

Além disso, Wendel & Juttner (1996) e Muñoz et al., (2004) relatam a possibilidade da produção de compostos orgânicos voláteis (VOCs), em cultivos fotossintéticos de microalgas e cianobactérias, cuja formação depende das condições de cultivo e da atividade fotossintética. Segundo estes autores, estes microrganismos são capazes de formar e desprender quantidades substanciais de hidrocarbonetos e aldeídos, com cadeias que podem conter até 10 átomos de carbono.

Por outro lado, outros mecanismos além das transformações químicas e biológicas do dióxido de carbono estão envolvidos neste tipo de sistema. Segundo Talbot & De La Noue, (1993), Bich et al., (1999) e Queiroz et al., (2007) as elevadas eficiências obtidas na remoção de nutrientes inorgânicos em sistemas de aeração intensiva utilizando cianobactérias não podem ser atribuídas apenas à conversão biológica destes compostos. Outros mecanismos como adsorção, sedimentação e volatilização estão envolvidos na remoção dos compostos. Lei et al., (2007) demonstram que a adsorção de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nas células de diferentes espécies de microalgas possui relevância nas taxas de remoção destes compostos. Tang et al., (1998) sugerem que a razão entre a área superficial e volume das células possui influência na adsorção de nutrientes do meio de cultura. Segundo estes autores elevadas razões área/volume elevam a capacidade de adsorção de compostos.

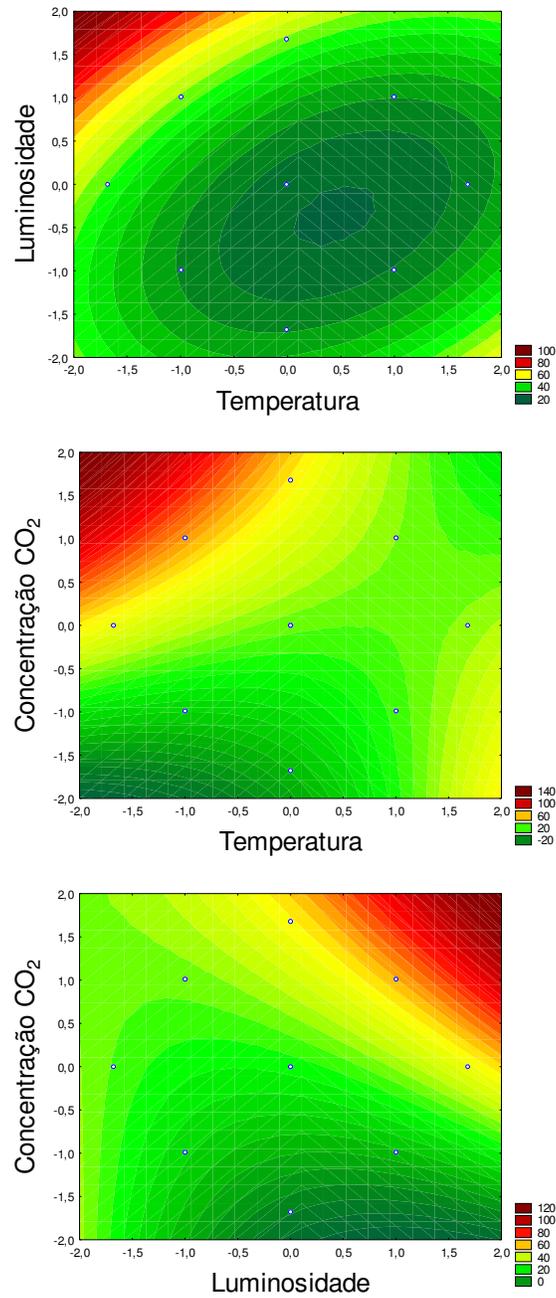


Figura 2: Diagramas de contorno para a variável taxa de remoção de dióxido de carbono.

A validação do modelo estatístico, definido pela Eq. 6 é confirmada através da Tabela 5, que apresenta a análise de variância para ajuste dos dados ao modelo quadrático.

Tabela 5: Análise de variância para o ajuste do modelo

Fonte Variação	Soma Quadrática	Graus Liberdade	Média quadrática	F _{calculado}
Regressão	7928,82	9	880,98	3,4 ^a
Resíduos	1824,08	7	260,58	
Falta Ajuste	1824,06	5	364,81	
Erro Puro	0,020	2	0,010	
Total	9752,81	16		

^aSignificância estatística ($p < 0,05$)

A validação do modelo é verificada a partir da distribuição F, que sugere a existência de uma relação quadrática entre as variáveis, indicando que o modelo proposto se ajusta aos dados experimentais. O modelo estatístico obtido apresenta um percentual máximo de variação explicada de 99,99%.

Estes resultados refletem a necessidade do fracionamento das diferentes rotas de conversão do dióxido de carbono no sistema, visando quantificar separadamente as taxas de conversão físico-químicas e biológicas de seqüestro de carbono. No entanto, as diferentes condições operacionais testadas, permitiram uma avaliação dos parâmetros de cultivo nos processos de transferência, remoção e assimilação de dióxido de carbono por cianobactérias.

5 Conclusão

A remoção de dióxido de carbono a partir de misturas de gases por lavagem com soluções alcalinas é um dos mais amplos processos de absorção de gases praticados na indústria química. Estes processos consistem em capturar o CO₂ em soluções alcalinas, através das reações químicas do sistema CO₂-H₂O-OH⁻. Neste sentido, o seqüestro de CO₂ através da formação de carbonatos e bicarbonatos é limitado pela concentração de íons OH⁻ presente na fase aquosa dos reatores, através do estabelecimento do equilíbrio químico. Em reatores fotossintéticos que utilizam microalgas, o ambiente alcalino é proporcionado pela ação do metabolismo microbiano, responsável pelo transporte de íons hidróxido para o exterior da célula, através da reação catalisada pela enzima anidrase carbônica, associado à captação de íons H⁺ para o interior das membranas tilacóides, tendo por resultados a obtenção de ambientes altamente alcalinos, que resultam em eficiente capacidade de fixação de CO₂. A vantagem dos processos biológicos esta relacionada com as questões de pós tratamento, necessária e mais complexa em sistemas puramente químicos, associada à transformação de parte do dióxido de carbono em biomassa e polímeros solúveis no meio de cultivo, que podem ser reciclados de diferentes formas.

A partir dos resultados obtidos, foi possível descrever a remoção de dióxido de carbono em fotobiorreatores, a partir de um modelo cinético de primeira ordem. A metodologia de superfície de resposta foi adequada para determinar o efeito dos parâmetros de operação do fotobiorreator, expressos em termos de temperatura, intensidade luminosa e concentração de dióxido de carbono nas taxas de remoção de CO₂.

Nomenclatura

[CO₂]: concentração de dióxido de carbono

t: tempo de residência (min)

r_{CO2}: taxa de remoção de dióxido de carbono (mg.L⁻¹.h⁻¹)

k: constante da velocidade de reação (min⁻¹)

k₁: constante da velocidade de absorção de dióxido de carbono (min⁻¹)

k₂: constante da velocidade de dessorção de dióxido de carbono (min⁻¹)

k_R: constante da velocidade resultante de remoção de dióxido de carbono (min⁻¹)

k₁/k₂: razão entre a constante da velocidade de absorção e dessorção de CO₂

n: ordem da reação

Y: variável resposta

X₁, X₂, X₃: variáveis independentes do modelo estatístico

β: parâmetros do modelo estatístico

R²: coeficiente de determinação

μ_{max}: velocidade máxima específica de crescimento (dia⁻¹)

6 Referências Bibliográficas

APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20^o ed. American Public Health Association, D.C,1998.

BADGER, M.R.; PRICE, G.D. CO₂ concentration mechanisms in Cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. Journal of experimental Botany.v.54.n.383.p.609-622, 2003.

BELTRAN-HEREDIA, J.; TORREGROSA, J.; DOMINGUEZ, R.; GARCIA, J. Treatment of black-olive wastewaters by ozonation and aerobic biological degradation. Water Research.v.34.n.14.p.3515-3522, 2000.

BERENGUEL, M.; RODRIGUEZ, F.; ACIÉN, F.G.; GARCIA, J.L. Model predictive control of pH in tubular photobiorreactors. Journal of Process Control.n.14.p.377-387, 2004.

BICH, N.N.; YAZIZ, M.I.; KAKTI, N. Combination of *Chlorella vulgaris* and *Andeichhornia crassipes* for wastewater nitrogen removal. Water. Research.v.33.n.10.p.2357-2362, 1999.

BOX, G.E.P; HUNTER, W.G, HUNTER, J.S. Statistics for experiments. New York: John Wiley and Sons, 1978.

BRYANT, D.A.; FRIGAARD, N.U. Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated. Trends in Microbiology.n.14.p.488-496, 2006.

BUESSELER, K.O.; LAMBORG, C.H.; BOYD, P.W.; LAM, P.J.; TRULL, T.W.; BIDIGARE, R.R.; BISHOP, J.K.B.; DEHAIRS, C.F.; ELSKENS, M.; HONDA, M.; KARL, D.A.; SIEGEL, D.A.; SILVER, M.W.; STEINBERG, D.K.; VALDES, J.; MOOY, V.M.; WILSON, S. Revisiting carbon flux through the ocean's twilight zone. Science.v.316.p.567-570, 2007.

CHAE, S.R; HWANG, E. J, SHIN, H.S. Single cell protein production of *Euglena gracilis* and carbon dioxide fixation in an innovative photo-bioreactor. Bioresource Technology. n.97.p.322-329, 2006.

CHENG, L.; ZHANG, L.; CHEN, H.; GAO, C. Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. Separation and Purification Technology.n.50.p.324-329, 2006.

DE PHILIPPIS, R.; VINCENZINI, M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. FEMS Microbiology Reviews n.22.p.151-175, 1998.

EROGLU, I.; ASLAN, K.; GÜNDÜZ, U.; YÜCEL, M.; TÜRKER, L. Substrate consumption rates for hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* in a column photobioreactor. Journal of Biotechnology.n.70.p.103-113, 1999.

FALKOWSKI, P.G. Photosynthesis: The paradox of carbon dioxide efflux. Current Biology.n.7.p.637-639, 1997.

FRIDLAND, L.; KAPLAN, A.; REINHOLD, L. Quantitative evaluation of the role of a putative CO₂-scavenging entity in the cyanobacterial CO₂-concentrating mechanism. BioSystems.n.37.p.229-238, 1996.

JAISWAL, P.; KASHYAP, A. Isolation and characterization of mutants of two diazotrophic cyanobacteria tolerant to high concentrations of inorganic carbon. Microbiological Research.n.157.p.83-91, 2002.

LEE, B.D.; APEL, W.A.; WALTON, M.R. Calcium carbonate formation by *Synechococcus* sp. strain PCC 8806 and *Synechococcus* sp. strain PCC 8807. Bioresource Technology.n.97.p.2427-2434, 2006.

LEI, A.P.; HU, Z.L.; WONG, Y.S.; TAM, N.F.Y. Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species. Bioresource Technology.n.98.p.273-280, 2007.

LIN, H.Y.; LEU, J.Y.; LAN, C.R.; LIN,P.; CHANG, F. Kinetics of inorganic carbon utilization by microalgal biofilm in a flat plate photoreactor. Chemosphere.n.53.p.779-787, 2003.

MARCUS, Y. Distribution of inorganic carbon among its component species in cyanobacteria: do cyanobacteria in fact actively accumulate inorganic carbon? *Journal of Theoretical Biology*.n.185.p.31-45, 1997.

MOLINA GRIMA, E.; FERNANDÉZ, F.G.A.; CAMACHO, F.G.; CHISTI, Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scale up. *Journal of Biotechnology*.n.70.p.231-247, 1999.

MUÑOZ, J.; MUDGE, S.M.; SANDOVAL, A. Effects of ionic strength on the production of short chain volatile hydrocarbons by *Dunaliella salina* (Teodoresco). *Chemosphere*.n.54.p.1267–1271, 2004.

ONO, E.; CUELLO, J.L. Carbon dioxide mitigation using thermophilic cyanobacteria. *Biosystems Engineering*.n.96.p.129-134, 2007.

PARIKH, A.; MADAMWAR, D. Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. *Bioresource Technology*.n.97.p.1822–1827, 2006.

QUEIROZ, M.I.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L.Q, BASTOS, R.; GOLDBECK, R. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. *Bioresource Technology*.n.98.p.2163-2169, 2007.

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*.n.111.p.1-61, 1979.

RORRER, G.L.; MULLIKIN, R.K. Modeling and simulation of a tubular recycle photobioreactor for macroalgal cell suspension cultures. *Chemical Engineering Science*.n.54.p.3153-3162, 1999.

TALBOT, P.; DE LA NOUE, J. Tertiary treatment of wastewater with *Phormidium bonheri* (Schmidle) under various light and temperature conditions. *Water Research*.n.27.p.153-159, 1993.

TANG, J.X.; HOAGLAND, D.D.; SIEGERIED, B.D. Uptake and bioconcentration of atrazine by selected freshwater algae. *Environmental Toxicology and Chemistry*.n.17.p.1085-1090, 1998.

TCHERNOV, D.; HASSIDIM, M.; LUZ, B.; SUKENIK, A.; REINHOLD, L.; KAPLAN, A. Sustained net CO₂ evolution during photosynthesis by marine microorganisms. *Current Biology*.n.7.p.723-728, 1997.

WENDEL, T.; JUTTNER, F. Lipxygenase-mediated formation of hydrocarbons and unsaturated aldehydes in freshwater diatoms. *Phytochemistry*.v.41.n.6.p.1445-1449, 1996.

Capítulo 5

Fixação biológica de dióxido de carbono em reatores de coluna de bolhas

RESUMO

O trabalho teve por objetivos avaliar as taxas de fixação de dióxido de carbono pela cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli* em reatores de coluna de bolhas. O modelo cinético utilizado considerou apenas a conversão de CO₂ em biomassa, no qual se obteve máximas taxas de incorporação de carbono na ordem de 109,2 mg.L⁻¹.h⁻¹. Os resultados obtidos demonstram a potencialidade da aplicação da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli* em processos de seqüestro de carbono.

Palavras-Chave: cianobactéria; fotobiorreator; fixação de carbono.

1 Introdução

O desenvolvimento de tecnologias para o controle dos gases de efeito estufa vem sendo considerado fundamental para a manutenção da integridade da biosfera e das condições climáticas do planeta (Ono & Cuello, 2006).

Numerosas pesquisas foram desenvolvidas especialmente no Japão, na década de 90, a partir de processos de biofixação de dióxido de carbono utilizando cianobactérias (Miyari, 1995; Hirata et al., 1996; Kajiwara et al., 1997; Murakami & Ikenouchi, 1997). Estes estudos estão sendo intensificados, visando projetar sistemas que operem de maneira eficiente e econômica, com o objetivo de desenvolver tecnologias limpas para a redução de poluentes gasosos (Cheng et al., 2006; Chae et al., 2006; Cuaresma et al., 2006; Hsueh et al., 2007).

O uso de cianobactérias e microalgas em processos de fixação de dióxido de carbono é considerado uma alternativa promissora, uma vez que o elemento carbono pode ser fixado por diferentes mecanismos. Em uma primeira etapa, o dióxido de carbono quando dissolvido na fase aquosa do sistema, pode ser seqüestrado por precipitação química através da reação dos íons bicarbonato e carbonato com elementos presentes no meio de cultivo, como cálcio e magnésio. Estas reações são catalisadas pelo crescimento e fisiologia de microalgas (Marcus, 1996; Lee, Apel & Walton, 2006). Uma outra rota de fixação de carbono está relacionada com o Ciclo de Calvin, onde enzimas especializadas presentes nestes organismos catalisam reações que incorporam átomos de carbono, oriundos do CO₂ envolvido na fotossíntese (Falkowski, 1997). A conversão biológica do dióxido de carbono resulta em produtos do metabolismo fotossintético como células, oxigênio e biopolímeros solúveis no meio de cultivo (Reboloso Fuentes et al., 1999; Acien Fernández et al., 2005).

Neste sentido, diversos gêneros de cianobactérias e microalgas estão sendo avaliados quanto a seu potencial na aplicação em processos de fixação de carbono. Estes

estudos estão sendo focados na determinação de condições operacionais dos fotobiorreatores, bem como na avaliação da cinética de consumo de dióxido de carbono e formação de células e produtos do metabolismo fotossintético (Stewart & Hessami et al., 2005; Muñoz & Guieysse, 2006). Em face disto, o trabalho teve por objetivos, avaliar a taxas de fixação de dióxido de carbono em biomassa pela cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli.

2 Material e Métodos

2.1 Microrganismo e meio de cultura

As culturas de *Aphanothece microscopica* Nägeli (RSMAN92) foram propagadas e mantidas em meio padrão BGN (Ripka et al., 1979), com a seguinte composição: $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ($0,040g \cdot L^{-1}$), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ($0,075g \cdot L^{-1}$), EDTA ($0,001g \cdot L^{-1}$), H_3BO_3 ($2,860g \cdot L^{-1}$), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ($1,810g \cdot L^{-1}$), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ($0,222g \cdot L^{-1}$), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ($0,390g \cdot L^{-1}$), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ($0,079g \cdot L^{-1}$), $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ ($0,040g \cdot L^{-1}$), $NaNO_3$ ($150g \cdot L^{-1}$), $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ($0,006g \cdot L^{-1}$), citrato de amônio e ferro ($0,006g \cdot L^{-1}$), pH 8,0. As condições utilizadas foram 25°C, 1 klux de luminosidade e fotoperíodo de 12h.

2.2 Fotobiorreator

Os experimentos foram realizados em um fotobiorreator de coluna de bolhas. O sistema foi construído em vidro de 4mm de espessura, com um diâmetro interno de 7,5cm e uma altura de 75cm, perfazendo um volume nominal de trabalho de 3,0L. O sistema de dispersão de ar consiste em um difusor de 1,5cm de diâmetro, localizado no centro da coluna. O reator foi continuamente iluminado com 16 lâmpadas fluorescentes de 20W, conectadas em paralelo, localizadas em uma câmara de fotoperíodo. A alimentação dos gases foi provida através de ar comprimido e um cilindro de CO_2 industrial. A mistura ar/ CO_2 foi controlada por 3 rotâmetros que medem a vazão de dióxido de carbono, ar e a mistura entre os gases respectivamente.

2.3 Obtenção dos dados cinéticos

Os experimentos foram realizados em biorreatores, operando em regime intermitente, alimentados com 3,0L de meio sintético BGN. As condições dos experimentos foram: concentração celular inicial de $100 mg \cdot L^{-1}$, reator isotérmico, operando em temperaturas de 35°C, intensidades luminosas de 11klux e aeração contínua de 1 VVM com injeção de ar enriquecido com 15% dióxido de carbono. A concentração

celular e as taxas de fixação de dióxido de carbono foram monitoradas a cada 12 e 24 horas, respectivamente, durante as fases de crescimento de microrganismo.

2.4 Análise dos dados cinéticos

O método diferencial de análise de dados cinéticos (Crynes & Fogler, 1981) foi utilizado para interpretar os dados de produção de biomassa e para encontrar a equação da taxa de fixação de CO₂. Para a reação simplificada (CO₂ → Biomassa), conduzida em um reator batelada a volume constante, o balanço molar é descrito pela Equação 1:

$$\frac{dX}{dt} = r_X \quad (1)$$

Assumindo que a velocidade de reação é uma função apenas da concentração de células, podemos escrever a lei de velocidade na seguinte forma:

$$r_X = kX^n \quad (2)$$

Combinando o balanço molar com a lei de velocidade, e aplicando a definição de logaritmo, obtemos a Equação 3:

$$\log\left(\frac{dX}{dt}\right) = \log k + n \log X \quad (3)$$

Desta forma, um gráfico de log (dX/dt) em função de log (X) deverá ser linear, com inclinação correspondente a ordem da reação (n). A velocidade específica de formação de células (k) é obtida por manipulação algébrica da Equação 3, conforme a Equação 4:

$$k = \frac{dX/dt}{X^n} \quad (4)$$

Os dados cinéticos de concentração celular em função do tempo foram diferenciados numericamente pelo método das diferenças finitas, conforme proposto por Carnahan et al., (1969).

A taxa de dióxido de carbono fixado na biomassa (CB) foi determinada através da relação entre o conteúdo de carbono presente nas células e a taxa de crescimento do microrganismo, conforme indica a Equação 5 (Kajiwara et al., 1997):

$$CB = C_c \cdot \left(\frac{dX}{dt}\right) \left(\frac{M_{CO_2}}{M_c}\right) \quad (5)$$

2.5 Métodos Analíticos

A concentração celular foi avaliada gravimetricamente, através da filtração de um volume conhecido de meio de cultura em filtro de diâmetro 0,45 μ m, seco a 60°C por 24 horas (APHA, 1998). A intensidade luminosa foi determinada a partir de um luxímetro digital (Minipa MLM 1010, precisão de \pm 4%). A temperatura foi controlada por termostatos, e medida através de um sensor polarográfico (Metler Toledo InPro5000 Series). A vazão de dióxido de carbono, ar e ar enriquecido com CO₂ foram determinadas a partir de rotômetros (AFSG 100 Key Instruments, precisão de \pm 5%). A composição elementar das células da *Aphanothece microscopica Nægeli* foi determinada através de um analisador elementar CHNS/O (2400-Perkin Elmer). Amostras de 2mg de biomassa foram oxidadas a 1000°C, e os gases resultantes foram determinados a partir de um sensor de condutividade térmica para carbono, nitrogênio e hidrogênio. O padrão utilizado foi a acetanilida, com composição de 71,09% de carbono, 11,84% de oxigênio, 6,71% de hidrogênio e 10,36% de nitrogênio.

3 Resultados e Discussão

A curva de crescimento e a variação das velocidades volumétricas de formação de células da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nægeli* a partir da condição considerada estão expressas na Figura 1.

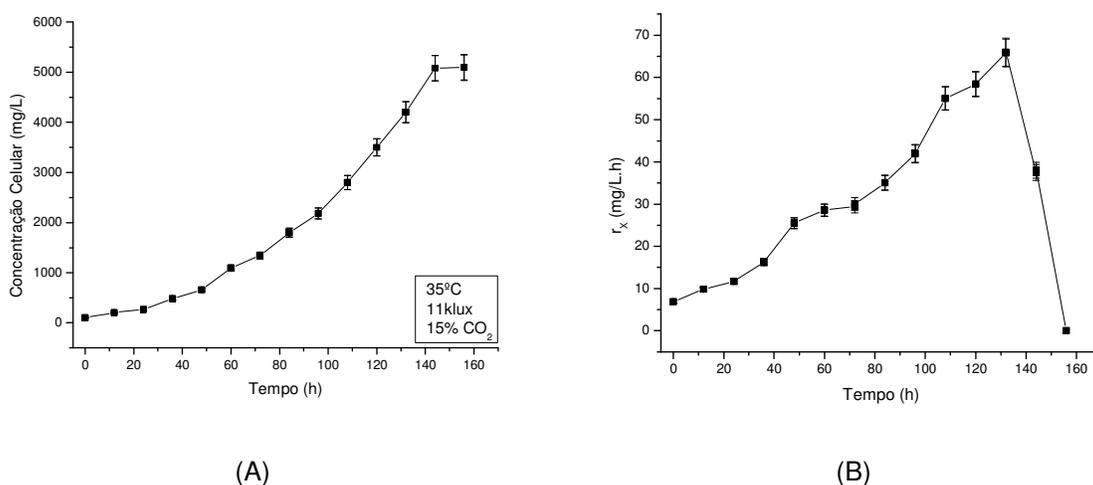


Figura 1: Variação da concentração celular (A) e velocidades volumétricas de formação de células (B).

Observa-se a partir da análise da curva de crescimento, um comportamento típico de cultivos fotossintéticos de cianobactérias. A ausência da fase de adaptação do microrganismo é verificada, ocorrendo o crescimento exponencial a partir de 12h de tempo de residência celular. A fase estacionária foi observada a partir do sexto dia de

cultivo. Reduzidas velocidades de crescimento são observadas nas primeiras 36h de cultivo, o que pode ser atribuído à fotoinibição celular, uma vez que inicialmente as densidades celulares são baixas para a elevada intensidade luminosa incidente no fotobiorreator. Por outro lado, as elevadas luminosidades utilizadas nesta condição de cultivo são responsáveis pelo aporte energético necessário às células nos tempos de residência mais avançados, onde as densidades celulares são elevadas. Ishida et al., (1997) visando contornar problemas de inibição causados por elevadas concentrações de dióxido de carbono nos gases de entrada, propôs a realização de cultivos inicialmente com concentrações de dióxido de carbono reduzidas, e, a partir de determinadas densidades celulares, elevar a concentração deste composto. Os resultados obtidos por estes autores indicam que o ajuste das condições operacionais durante o processo é uma alternativa viável para melhorar o desempenho de fotobiorreatores, sugerindo a possibilidade do ajuste das intensidades luminosas em função do tempo de residência celular.

A variação do pH em função do tempo de residência e em função da concentração de células estão expressos na Figura 2.

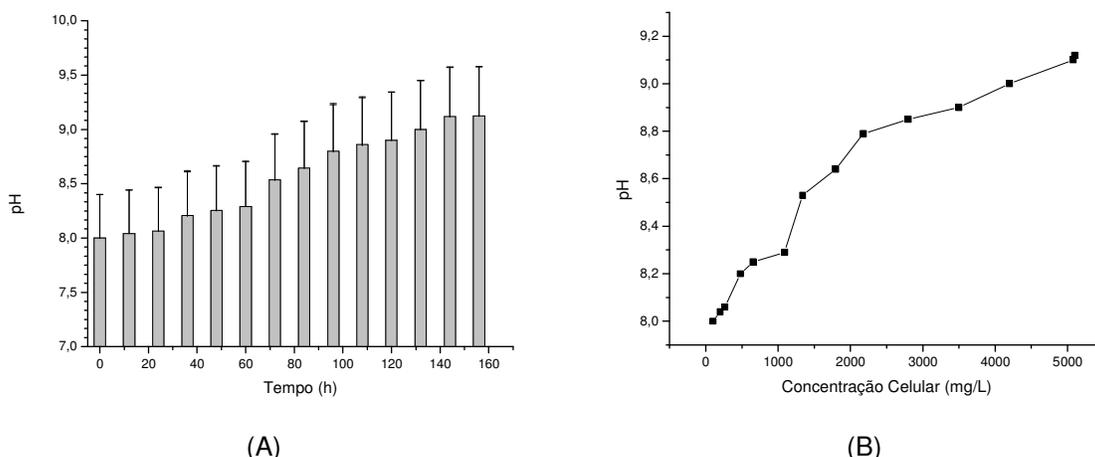


Figura 2: Variação do pH em função do tempo de residência (A) e variação do pH em função da concentração celular (B).

A elevação gradual do pH em função do tempo de residência é verificada, acompanhado do aumento da massa celular no fotobiorreator. De acordo com Lee, Apel & Walton (2006), a elevação do pH em cultivos fotossintéticos é um indicador do consumo de carbono inorgânico devido ao crescimento celular. Estes autores reportam que o incremento do pH no meio de cultivo é atribuído a dois mecanismos principais; primeiro, ocorre o transporte de íons hidróxido para o exterior da célula, através da reação catalisada pela enzima anidrase carbônica durante a conversão dos íons bicarbonato

dentro da célula para fornecer CO_2 à reação fotossintética, elevando o pH do meio de cultivo. Um segundo mecanismo potencial é o aumento do pH devido à atividade da enzima ribulose 1,5 bisfosfato carboxilase cuja atividade depende sensivelmente do pH, aumentando à medida que o pH eleva-se. Esta enzima está presente no aparato fotossintético das cianobactérias, onde os íons H^+ são seqüestrados para o interior das membranas tilacóides com transferência simultânea de íons Mg^{+2} para o ambiente. Estes fluxos, induzidos pela energia luminosa ocasionam a elevação do pH e da concentração de Mg^{+2} ativando a enzima rubisco, resultando em uma eficiente fixação de dióxido de carbono.

Diversos modelos foram propostos para quantificar as taxas de dióxido de carbono fixado fotossinteticamente. Estes modelos estão relacionados diretamente com a formação de células a partir da fixação de átomos de carbono, de forma que a modelagem do sistema é um fator fundamental nas estimativas das taxas de carbono fixado. Neste sentido, a Figura 3 apresenta o ajuste dos dados cinéticos de crescimento sob cinética de ordem n de modo a determinar a equação da taxa de formação de biomassa.

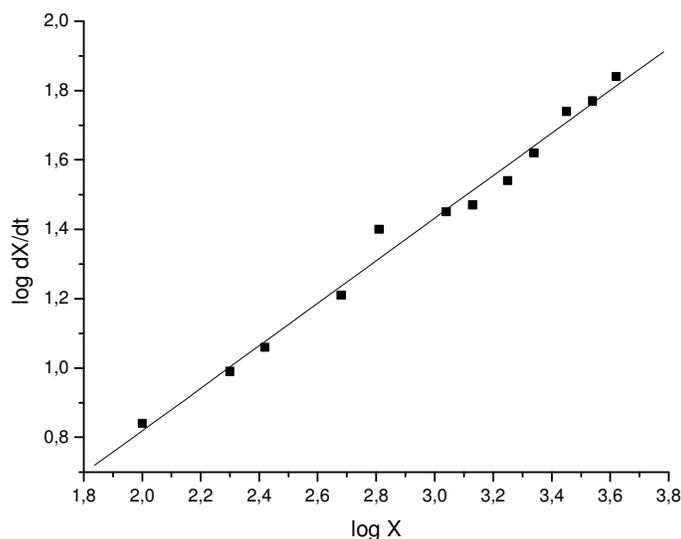


Figura 3: Análise de dados cinéticos pelo método diferencial.

A análise de regressão linear para cultivos de *Aphanothece, microscopica Nägeli* a 35°C , 11klux e 15% de CO_2 apresenta uma ordem de reação $n = 0,61$, com coeficiente de correlação $R^2 = 0,99$, o que demonstra a adequacidade do modelo utilizado para descrever a cinética de formação de células em cultivos fotossintéticos. A velocidade específica de

formação de células (k) obtida foi de $0,04 \text{ h}^{-1}$. A equação da taxa é representada pela Equação 6:

$$r_X = 0,04 \text{ h}^{-1} X^{0,61} \text{ mg.L}^{-1} \quad (6)$$

Uma vez que a ordem da reação refere-se à expressão da equação da taxa encontrada empiricamente, ela pode ser um valor fracionário. No caso da Equação 6, o crescimento da *Aphanothece* nas condições de cultivo avaliadas se dá em cinética de ordem 0,61.

A análise elementar da biomassa foi determinada com o objetivo de avaliar a capacidade de incorporação de carbono do microrganismo ao longo do cultivo. A análise elementar das células da *Aphanothece microscopica Nægeli* em função do tempo de residência celular (Figura 4) mostra que 1g de biomassa pode conter entre $0,40 \pm 0,41$ a $0,51 \pm 0,03$ g de carbono, em função da fase de crescimento do microrganismo.

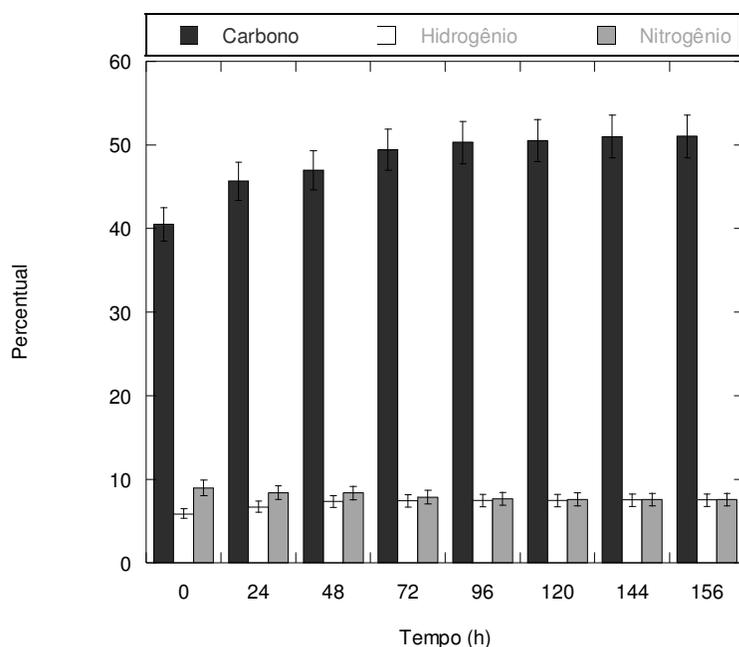


Figura 4: Variação da composição química da biomassa.

Resultados similares foram obtidos por diversos autores, que demonstram variações na composição bioquímica de microalgas ao longo dos cultivos (Reboloso Fuentes et al., 1999; Acién Fernández et al., 2003, 2005). Estes estudos demonstram o direcionamento do metabolismo através da manipulação das condições operacionais dos biorreatores, no qual a síntese de carboidratos é favorecida pelos períodos de luz, com aumento da concentração de carbono e hidrogênio na biomassa. Paralelamente, o

conteúdo de nitrogênio é reduzido. Estas variações na composição celular ao longo do cultivo sugerem a possibilidade da coleta da biomassa em cultivos descontínuos, ou, a operação de processos contínuos nos períodos de composição química mais adequada, de forma a favorecer a eficiência dos sistemas.

Desta forma, as taxas de carbono incorporado à biomassa ao longo do cultivo são expressas na Figura 5. A partir da análise dos resultados, observa-se taxas máximas de fixação de carbono na biomassa na ordem de 109,2 mg/L.h, obtidas em 120h de cultivo.

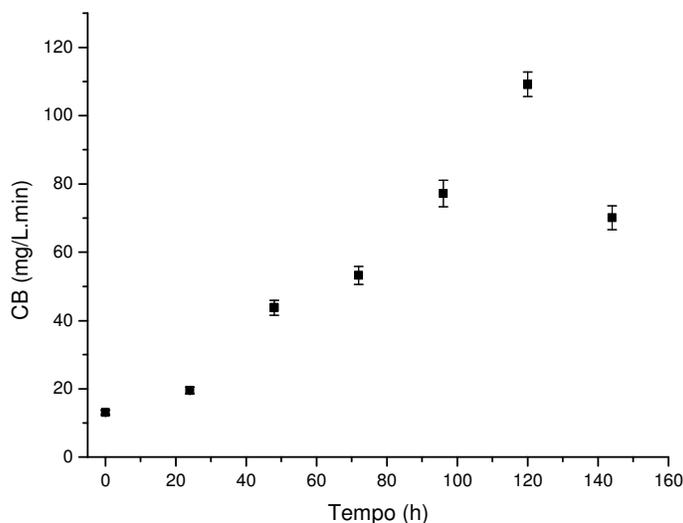


Figura 5: Taxas de carbono incorporado à biomassa.

Se considerarmos a manutenção das culturas em regime estacionário em um quimiostato, no qual a densidade da biomassa é fixada em 3,5g/L, com taxa de formação de células 58,4 mg/L.h. A partir do processamento de 4000 m³ de meio de cultura é possível estimar uma taxa de fixação de carbono de 10,48 ton/dia, com produção de 5,6 ton/dia de biomassa. Estes valores são dez vezes superiores aos estimados por Kajiwara et al., (1997) em aumento de escala na mesma proporção, utilizando a cianobactéria *Synechococcus* PCC7942. Por outro lado, Yun et al., (1997) estimaram a possibilidade de seqüestro de 6,3 ton/dia de carbono, usando a mesma metodologia, em biorreatores capazes de processar 11233 m³/dia de meio de cultura. Estes resultados demonstram a potencialidade do uso da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli* em sistemas para o seqüestro de carbono.

É necessário considerar, que estas estimativas consideraram apenas a fixação de carbono na biomassa. No entanto, outros produtos do metabolismo fotossintético estão envolvidos no seqüestro do dióxido de carbono dissolvido na fase aquosa do sistema, como por exemplo, a formação de carboidratos exocelulares (Otero & Vincenzini, 2003;

Parikh & Madamwar, 2006) e a formação de espécies químicas nas reações dos íons carbonato e bicarbonato na presença de cálcio e magnésio (Marcus, 1997; Lee, Apel & Walton, 2006).

As limitações operacionais do aumento de escala destes processos, em termos de transferência de massa, calor e quantidade de movimento não foram consideradas, sendo as estimativas baseadas apenas nas relações mássicas de conversão dos sistemas.

4 Conclusão

A conversão de dióxido de carbono a partir do cultivo fotossintético da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nægeli* demonstrou ser uma alternativa em potencial para processos de seqüestro de carbono. A partir das variáveis cinéticas obtidas, verificou-se a adequacidade do método diferencial de análise para descrever a taxa de formação de células no fotobiorreator, obtendo máximas taxas de fixação de carbono na biomassa na ordem de 109,2 mg/L.h.

Nomenclatura

X: concentração celular (mg.L^{-1})
t: tempo de residência (h)
 r_x : taxa de formação de células ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
k: constante da velocidade de reação (min^{-1})
n: ordem da reação
 R^2 : coeficiente de determinação
CB: taxa de carbono incorporado a biomassa ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
 C_c : Percentual de carbono da biomassa (%)
 M_{CO_2} : peso molecular do CO_2
 M_C : peso molecular do carbono

5 Referências Bibliográficas

ACIÉN-FERNANDEZ, F.G.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J.M.; ALÍAS, C.B.; LÓPEZ, M.C.G.M.; GONZÁLEZ, M.J.I.; GÓMEZ, R.N.; MOLINA GRIMA, E. Assessment of the production of ^{13}C labeled compounds from phototrophic microalgae at laboratory scale. *Biomolecular Engineering*.n.20.p.149-162, 2003.

ACIÉN-FERNANDEZ, F.G.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J.M.; EGOROVA-ZACHERNYUK, T.A.; MOLINA GRIMA, E. Cost-effective production of ^{13}C , ^{15}N stable isotope-labelled biomass from phototrophic microalgae for various biotechnological applications. *Biomolecular Engineering*.n.22.p.193-200, 2005.

APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20^o ed. American Public Health Association, D.C,1998.

CARNAHAN, B.; LUTHER, H.A.; WILKES, J.O. Applied numerical methods. New York. Wiley, 1969.

CHAE, S.R; HWANG, E. J, SHIN, H.S. Single cell protein production of *Euglena gracilis* and carbon dioxide fixation in an innovative photo-bioreactor. Bioresource Technology. n.97.p.322-329, 2006.

CHENG, L.; ZHANG, L.; CHEN, H.; GAO, C. Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor. Separation and Purification Technology.n.50.p.324-329, 2006.

CRYNES, B.L.; FOGLER, H.S. AIChE modular instruction series E: Kinetics.v.2 New York. American Institute of Chemical Engineers.p.51-74, 1981.

CUARESMA, M.; GARBAYO, I.; VEGA, J.M.; VÍLCHEZ, C. Growth and photosynthetic utilization of inorganic carbon of the microalga *Chlamydomonas acidophila* isolated from Tinto river. Enzyme and Microbial Technology.n.40.p.158-162, 2006.

FALKOWSKI, P.G. Photosynthesis: The paradox of carbon dioxide efflux. Current Biology.n.7.p.637-639, 1997.

HIRATA, S.; HAYASHITANI, M.; TONES, S. Carbon dioxide fixation in batch culture of *Chlorella* sp. using a photobioreactor with a sunlight-collection device. Journal of Fermentation and Bioengineering.v.81.n.5.p.470-472,1996.

HSUEH, H.T.; CHU, H.; YU, S.T. A batch study on the bio-fixation of carbon dioxide in the absorbed solution from a chemical wet scrubber by hot springs and marine algae. Chemosphere.n.66.p.878-886, 2007.

ISHIDA, T.; HASEGAWA, N.; HAYASHI, N.R.; PEERAPORNPIBAL, Y.; ISHII, M.; IGARASHI, Y.; KODAMA, T. Growth Characteristics and dense culture of a thermophilic cyanobacterium *Chroococcidiopsis* sp. strain TS-821. Journal of Fermentation and Bioengineering.v.83.n.6.p.571-576, 1997.

KAJIWARA, S.; YAMADA, H.; NARUMASA, O. Design of the bioreactor for carbon dioxide fixation by *Synechococcus* PCC7942. Energy Conversion and Management.v.38.p.529-532, 1997.

LEE, B.D.; APEL, W.A.; WALTON, M.R. Calcium carbonate formation by *Synechococcus* sp. strain PCC 8806 and *Synechococcus* sp. strain PCC 8807. Bioresource Technology.n.97.p.2427-2434, 2006.

MARCUS, Y. Distribution of inorganic carbon among its component species in cyanobacteria: do cyanobacteria in fact actively accumulate inorganic carbon? *Journal of Theoretical Biology*.n.185.p.31-45, 1997.

MIYARI, S. CO₂ assimilation in thermophilic cyanobacterium. *Energy conservation and Management*.v.36.p.673-679, 1995.

MUÑOZ, R.; GUIEYSSE, B. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. *Water Research*.n.40.p.2799-2815, 2006.

MURAKAMI. M.; IKENOUCHI. M, The biological fixation and utilization project by rite (2)-screening and breeding of micro algae with high capability in fixing CO₂. *Energy Convers. Mgmt*.v.38.p.493-497, 1997.

ONO, E.; CUELLO, J.L. Feasibility assessment of microalgal carbon dioxide sequestration technology with photobioreactor and solar collector. *Biosystems Engineering*.n.95.p.597-606, 2006.

OTERO, A.; VINCENZINI, M. Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity. *Journal of Biotechnology*.n.102.p.143-152, 2003.

PARIKH, A.; MADAMWAR, D. Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria. *Bioresource Technology*.n.97.p.1822–1827, 2006.

REBOLOSO-FUENTES, M.M.; SÁNCHEZ, J.L.G.; SEVILLA, J.M.F.; FERNANDÉZ, F.G.A. PÉREZ, J.A.S.; MOLINA GRIMA, E. Outdoor continuous culture of *Porphyridium cruentum* in a tubular photobioreactor: quantitative analysis of the daily cyclic variation of culture parameters. *Journal of Biotechnology*.n.70.p.271-288, 1999.

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*.n.111.p.1-61, 1979.

STEWART, C.; HESSAMI, M. A study of methods of carbon dioxide capture and sequestration: the sustainability of a photosynthetic bioreactor approach. *Energy Conversion and Management*.n.46.p.403–420, 2005.

YUN, Y.S.; LEE, S.B.; PARK, J.M.; LEE, C.; YANG, J. Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients. *Journal Chemical Technology and Biotechnology*. n.69.p.451-455, 1997.

Capítulo 6

**Efeito dos ciclos de luminosidade
(escuro/claro) na fixação de CO₂ por
microalgas em fotobiorreatores**

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do fotoperíodo nas taxas de incorporação de carbono em biomassa através do cultivo fotossintético da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nægeli* em fotobiorreatores tubulares. Os cultivos foram conduzidos em temperaturas de 35°C, concentrações de ar enriquecido com dióxido de carbono na proporção de 15% e intensidades luminosas de 11klux. Os ciclos de luminosidade avaliados foram de 24:0, 22:2, 20:4, 18:6, 16:8, 14:10, 12:12, 10:14, 8:16, 6:18, 4:20, 2:22 e 0:24 (claro: escuro) respectivamente. Os resultados obtidos indicam que a duração dos períodos de luminosidade é um fator determinante no desempenho de fotobiorreatores, ocasionando reduções de até 99,69% nas taxas de carbono incorporado à biomassa quando comparado a cultivos com iluminação contínua.

Palavras-Chave: microalgas, fotobiorreator, fotoperíodo, fixação de CO₂.

1 Introdução

Diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas na aplicação de cianobactérias na biofixação de dióxido de carbono, visando projetar fotobiorreatores viáveis para a tecnologia de seqüestro de CO₂ (Yue & Chen, 2005; Lee et al., 2006; Ono & Cuello, 2007).

A fotossíntese é um processo composto de duas etapas, que compreendem reações luminosas, que ocorrem apenas quando as células são iluminadas, e reações de fixação de carbono, também chamadas de reações no escuro, que ocorrem tanto na presença de luz como no escuro. Na primeira etapa as células transformam a energia luminosa em energia química, que é armazenada em compostos de alto valor energético, para posterior utilização nas reações de fixação de carbono (Iverson, 2006).

O uso destas rotas metabólicas em processos de engenharia ambiental requer a utilização da energia solar, a fim de desenvolver processos de tecnologia limpa (Essam et al., 2007). Desta forma, as células utilizariam a energia luminosa através de reações exergônicas, as quais seriam utilizadas na síntese de compostos a partir da fixação de dióxido de carbono através de reações endergônicas (Horton et al., 1994). Entretanto, um dos problemas operacionais deste tipo de tecnologia, refere-se à indisponibilidade da energia luminosa em períodos integrais de tempo.

Os regimes de luminosidade os quais as culturas são submetidas são considerados um fator determinante na produtividade e rendimento das reações fotossintéticas (Toro, 1989; Sicko-Goad & Andresen, 1991). Diversos estudos foram conduzidos com foco no efeito provocado por diferentes intensidades luminosas

incidentes em fotobiorreatores, havendo poucos relatos a respeito da influência da duração dos ciclos de luz e escuro (Pulz & Scheinbenbogen, 1998; Molina Grima et al., 1999; Kitaya et al., 2006). Assim, uma comparação entre diferentes fotoperíodos faz-se necessário visando determinar os regimes de luminosidade mais eficientes para propósitos industriais. Em face disto, o trabalho teve por objetivos avaliar o efeito do fotoperíodo nas taxas de incorporação de carbono na biomassa através do cultivo fotossintético da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nægeli* em fotobiorreatores tubulares.

2 Material e Métodos

2.1 Microrganismo e meio de cultura

As culturas de *Aphanothece microscopica Nægeli* (RSMAN92) foram propagadas e mantidas em meio sintético BGN (Ripka et al., 1979), com a seguinte composição: $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ($0,040\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,075\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), EDTA ($0,001\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), H_3BO_3 ($2,860\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($1,810\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($0,222\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,390\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($0,079\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($0,040\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), NaNO_3 ($150\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($0,006\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), citrato de amônio e ferro ($0,006\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), pH 8,0. As condições utilizadas foram 25°C , 1 klux de luminosidade e fotoperíodo de 12h (escuro/claro).

2.2 Fotobiorreator

Os experimentos foram realizados em um fotobiorreator de coluna de bolhas. O sistema foi construído em vidro de 4mm de espessura, com um diâmetro interno de 7,5cm e uma altura de 75cm, perfazendo um volume nominal de trabalho de 3,0L. O sistema de dispersão de ar consiste em um difusor de 1,5cm de diâmetro, localizado no centro da coluna. O reator foi continuamente iluminado com 16 lâmpadas fluorescentes de 20W, conectadas em paralelo, localizadas em uma câmara de fotoperíodo. A alimentação dos gases foi provida através de ar comprimido e um cilindro de CO_2 industrial. A mistura ar/ CO_2 foi controlada por 3 rotâmetros que medem a vazão de dióxido de carbono, ar e a mistura entre os gases respectivamente.

2.3 Obtenção dos dados cinéticos

Os experimentos foram realizados em biorreatores, operando em regime intermitente, alimentados com 3,0L de meio sintético BGN. As condições dos experimentos foram: concentração celular inicial de $0,1\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, reator isotérmico, operando

em temperaturas de 35°C, intensidades luminosas de 11klux e aeração contínua de 1 VVM com injeção de ar enriquecido com 15% dióxido de carbono. Os ciclos de luminosidade avaliados foram de 24:0, 22:2, 20:4, 18:6, 16:8, 14:10, 12:12, 10:14, 8:16, 6:18, 4:20, 2:22 e 0:24 (claro:escuro) respectivamente. A concentração celular e as taxas de fixação de dióxido de carbono foram monitoradas a cada 12h durante as fases de crescimento de microrganismo.

2.4 Parâmetros cinéticos

A produtividade em biomassa (P_x) foi determinada através da relação entre a variação da concentração celular em um determinado intervalo de tempo, conforme indica a Equação 1:

$$P_x = \frac{X_m - X_0}{t_f} \quad (1)$$

As taxas de carbono incorporado à biomassa (CB) foram avaliadas através da relação entre o conteúdo de carbono presente nas células e a taxa de crescimento do microrganismo, conforme indica a Equação 2:

$$CB = C_c \cdot \left(\frac{dX}{dt} \right) \left(\frac{M_{CO_2}}{M_c} \right) \quad (2)$$

2.5 Métodos Analíticos

A concentração celular foi avaliada gravimetricamente, através da filtração de um volume conhecido de meio de cultura em filtro de diâmetro 0,45µm, seco a 60°C por 24 horas (APHA, 1998). A intensidade luminosa foi determinada a partir de medidas na superfície externa do reator, através de um luxímetro digital (Minipa MLM 1010, precisão de ± 4%). A temperatura foi controlada por termostatos, e medida a partir de um sensor polarográfico (Metler Toledo InPro5000 Series). A vazão de dióxido de carbono, ar e ar enriquecido com CO₂ foram determinados por rotâmetros (AFSG 100 Key Instruments, precisão de ± 5%). A composição elementar das células da *Aphanothece microscopica Nägeli* foi determinada através de um analisador elementar CHNS/O (2400-Perkin Elmer). Amostras de 2mg de biomassa foram oxidadas a 1000°C, e os gases resultantes foram determinados a partir de um sensor de condutividade térmica para carbono. O padrão utilizado foi a acetanilida, com composição de 71,09% de carbono, 11,84% de oxigênio, 6,71% de hidrogênio e 10,36% de nitrogênio.

3 Resultados e Discussão

Em cultivos fotossintéticos, a quantidade de energia luminosa recebida e armazenada pelas células possui relação direta com a capacidade de fixar carbono, determinando conseqüentemente a produtividade em biomassa e a velocidade de crescimento celular. A energia luminosa está disponível na natureza descontinuamente, já que há uma variação da luz durante o dia e a noite. Estas considerações tornam-se relevantes, em processos de seqüestro de carbono em fotobiorreatores, já que a viabilidade destes sistemas requer o uso da energia solar para a fotossíntese. Sistemas deste tipo, que são baseados fundamentalmente em recursos naturais, são fortemente afetados pela indisponibilidade da energia luminosa em períodos integrais de tempo.

A variação do crescimento da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli nas condições de 35°C, 11klux e 15% de CO₂ em fornecimento contínuo de energia luminosa está expressa na Figura1.

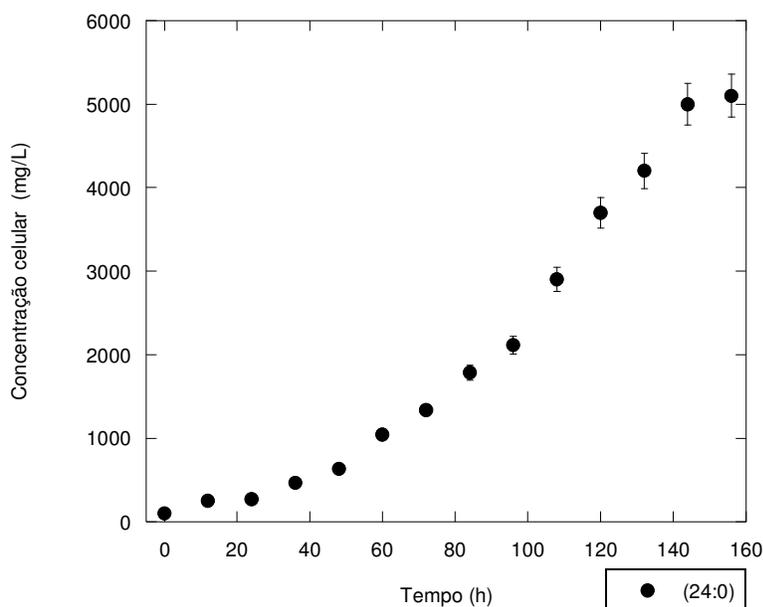


Figura 1: Curva de crescimento em regime contínuo de luz.

Observa-se a partir da análise da curva de crescimento a ausência da fase de adaptação do microrganismo, ocorrendo um crescimento exponencial a partir de 12h de tempo de residência celular. A fase estacionária foi observada a partir do sexto dia de cultivo. As máximas concentrações celulares obtidas foram de 5,1g/L, o que representa um aumento superior a 50 vezes a densidade celular inicialmente presente no reator.

A influência dos ciclos de luz tem sido relatada como um fator determinante na atividade fotossintética e nas taxas de crescimentos de microalgas em fotobiorreatores (Janssen et al., 1999, 2000, 2001). De acordo com estes autores, a luz é um substrato limitante destes sistemas, que são afetados por zonas de claro/escuro, que dependem primariamente da configuração, agitação e mistura do reator, associados à possibilidade de cultivos com períodos descontínuos de fornecimento de energia luminosa. Como resultado, as células são expostas a diferentes ciclos de luz, que tem um considerável efeito no desempenho dos sistemas.

As curvas de crescimento da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli, em ciclos de luminosidade que são reduzidos a cada 2h, estão expressas na Figura 2.

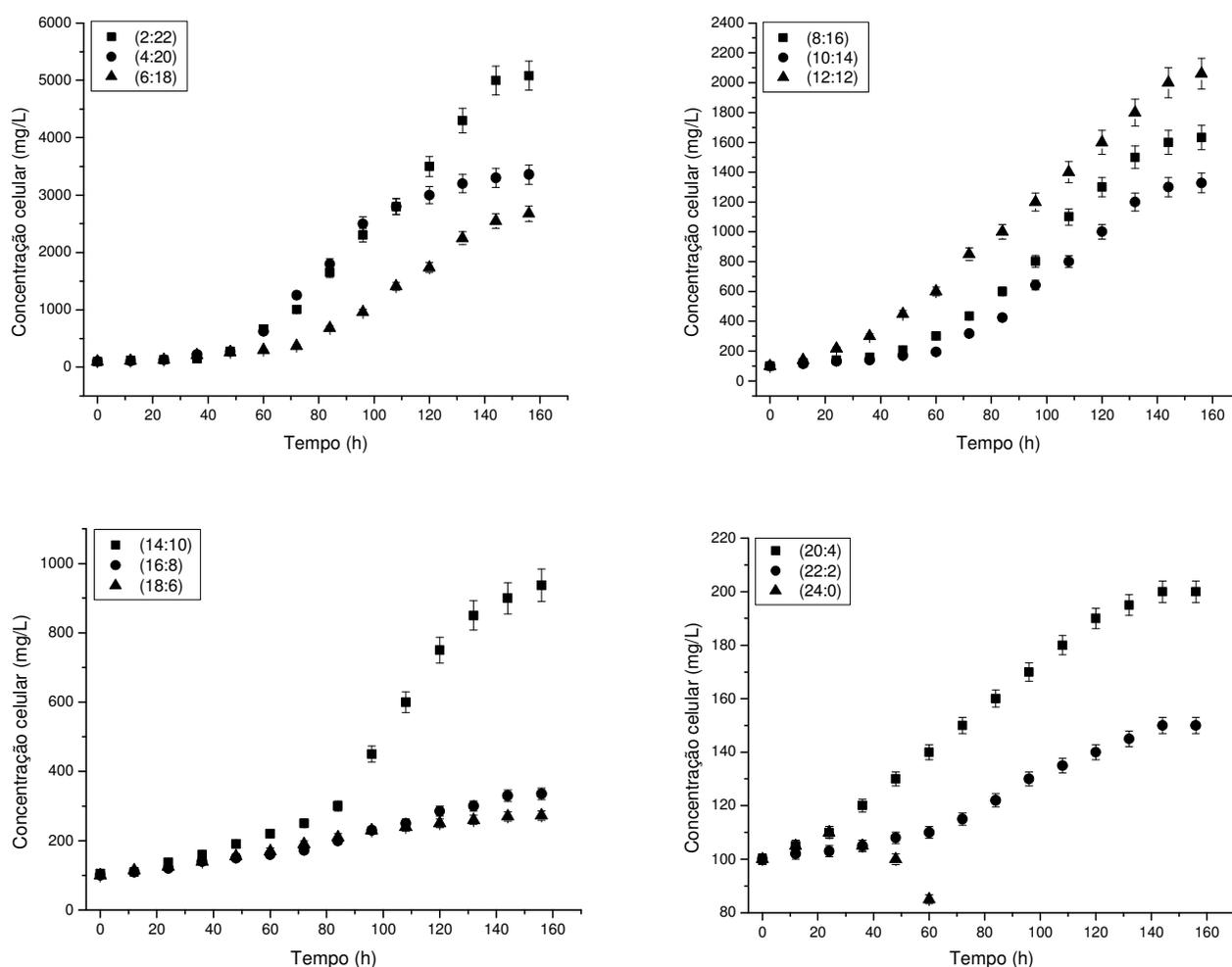


Figura 2: Curvas de crescimento em diferentes ciclos de luminosidade (escuro:claro).

Diferentes perfis de crescimento celular são observados em função da duração dos períodos de luminosidade. Os cultivos conduzidos em fotoperíodos de 22:2 (claro:escuro) demonstraram características similares aos experimentos conduzidos com

suprimento contínuo de energia luminosa, enquanto que em cultivos conduzidos na ausência de luz, foi evidenciado a limitação de fontes de carbono para o crescimento celular, uma vez que as cianobactérias não são capazes de utilizar fontes de carbono inorgânico na ausência de luz, e as concentrações de carbono orgânico presente no meio de cultivo (0,012g/L) não são suficientes para a manutenção energética em metabolismo respiratório (Queiroz et al., 2007).

Estes resultados são melhor evidenciados na Tabela 1 que apresenta a caracterização da cinética de crescimento e fixação de carbono em biomassa da *Aphanothece microscopica Nägeli*, nos diferentes ciclos de luz avaliados.

Tabela 1: Parâmetros cinéticos para *Aphanothece microscopica Nägeli*.

Fotoperíodo (claro:escuro)	P_x (g/L.dia)	X_{max} (g/L)	CB (g/L.dia)
24:0	0,770 ^a ± 0,13	5,10 ^a ± 0,06	1,440 ^a ± 0,15
22:2	0,764 ^a ± 0,02	5,08 ^a ± 0,03	1,428 ^a ± 0,03
20:4	0,501 ^c ± 0,06	3,40 ^b ± 0,02	0,936 ^b ± 0,05
18:6	0,235 ^d ± 0,18	2,68 ^c ± 0,16	0,439 ^c ± 0,19
16:8	0,240 ^e ± 0,12	1,64 ^d ± 0,09	0,448 ^c ± 0,10
14:10	0,189 ^f ± 0,19	1,30 ^e ± 0,01	0,353 ^d ± 0,18
12:12	0,301 ^g ± 0,10	2,06 ^f ± 0,08	0,562 ^e ± 0,11
10:14	0,127 ^h ± 0,01	0,94 ^g ± 0,17	0,237 ^f ± 0,01
8:16	0,035 ⁱ ± 0,05	0,34 ^h ± 0,11	0,065 ^g ± 0,03
6:18	0,026 ^j ± 0,12	0,26 ⁱ ± 0,10	0,048 ^g ± 0,09
4:20	0,015 ^k ± 0,10	0,20 ⁱ ± 0,03	0,028 ^g ± 0,10
2:22	0,008 ^l ± 0,18	0,15 ^j ± 0,05	0,015 ^g ± 0,19
0:24	0,002 ^m ± 0,05	0,11 ⁱ ± 0,02	0,004 ^g ± 0,07

* letras distintas diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

Avaliando estatisticamente os resultados com base na análise de variância e no teste de comparação de médias de Tukey ($p < 0,05$), verifica-se que a máximas produtividades volumétricas são obtidas condições de suprimento contínuo de energia luminosa (0:24), os quais não diferem significativamente ($p = 0,41$) dos experimentos conduzidos com fotoperíodos de (22:2), sugerindo que o fornecimento de luz em períodos superiores a 22h, não influencia a taxa volumétrica de formação de células. Estes resultados demonstram que a *Aphanothece microscopica Nägeli* é capaz de armazenar ATP suficiente para sustentar o crescimento celular por períodos de no máximo 2h de escuro, sem afetar as taxas de metabolismo fotossintético. Para os demais fotoperíodos avaliados, todos os valores de produtividade volumétrica diferem estatisticamente ($p < 0,0001$). Resultados similares são obtidos para as densidades celulares máximas, no qual os fotoperíodos de (0:24) e (2:22) (escuro:claro), são estatisticamente iguais ($p < 0,05$). Por outro lado, verifica-se não haver diferenças significativas nas concentrações

celulares máximas para os cultivos conduzidos com períodos de escuro superior a 18 horas.

As pronunciadas variações nas taxas volumétricas de crescimento e densidades celulares máximas em função da duração dos ciclos de luminosidade mostram que o crescimento celular decresce proporcionalmente com a fração de tempo que o microrganismo foi exposto a condições intermitentes de luz, quando comparado à iluminação contínua. Exceção a este comportamento foi verificado em fotoperíodos de 12:12 (escuro/claro), nos quais foram obtidos valores de produtividade e densidades celulares máximas superiores a cultivos conduzidos com períodos de luz compreendidos em 14 e 16h. Estes resultados estão relacionados ao fato de que as culturas foram mantidas e propagadas nas condições de ciclos de luminosidade de 12h, o que ocasionou uma melhoria na velocidade volumétrica de formação de células, bem como nas concentrações celulares máximas. Resultados similares foram obtidos por Sicko-Goad & Andresen (1991), que reportam que algumas espécies de microalgas podem ter preferências em relação à duração dos períodos de luminosidade, resultantes das condições ambientais de seu isolamento da natureza. Estes resultados são corroborados por Grobbelaar et al., (1996), que relatam que independente do cultivo em condições contínuas ou intermitentes de luz, a aclimação das culturas é determinante nas taxas fotossintéticas de microalgas. Por outro lado, Toro (1989) comparando o crescimento das microalgas *Chaetoceros gracilis* e *Isochrysis galbana* em cultivos conduzidos com fotoperíodos de 0:24 e 12:12 (escuro/claro) respectivamente, no qual os cultivos em que havia períodos de 12h de escuro era fornecido o dobro da intensidade luminosa em relação aos cultivos com fornecimento contínuo de energia luminosa, obtiveram taxas de crescimentos iguais, o que sugere que o crescimento celular é também afetado pela quantidade de energia oferecida por ciclo, e não somente pela duração do fotoperíodo.

Estes resultados sugerem a possibilidade do armazenamento da energia luminosa através de reações exergônicas através do suprimento em excesso, para posterior utilização desta energia nas subseqüentes reações endergônicas, que ocorrem também nos períodos de ausência de luz. Tecnicamente, esta situação seria interessante sob o ponto de vista operacional de fotobiorreatores, no qual espécies capazes de armazenar quantidades substanciais de energia luminosa teriam melhor desempenho para aplicação neste tipo de processo. Entretanto, a limitada capacidade da maioria das espécies de microalgas de armazenar energia luminosa, faz com que a maior parte desta energia seja dissipada na forma de calor nos reatores (Jansen et al., 1999).

As taxas de carbono fixado estão associadas à energia recebida pelas células durante os períodos de luz. A partir da determinação da quantidade de carbono presente

nas células ao final dos cultivos, obteve-se taxas máximas de 1,44 g/L.dia, em cultivos com fornecimento contínuo de energia luminosa. Uma redução linear entre as taxas de carbono fixadas na biomassa e a duração do período de luminosidade é evidenciado, com exceção dos ciclos de 12:12 (claro:escuro). É observado ainda que a fixação de carbono em biomassa, não difere estatisticamente ($p < 0,05$) em cultivos conduzidos com períodos de escuro superiores a 16h. Desta forma, a Figura 3 apresenta a distribuição dos percentuais de carbono fixado em biomassa nas diferentes condições avaliadas, tendo como referência o experimento conduzido com suprimento contínuo de luz.

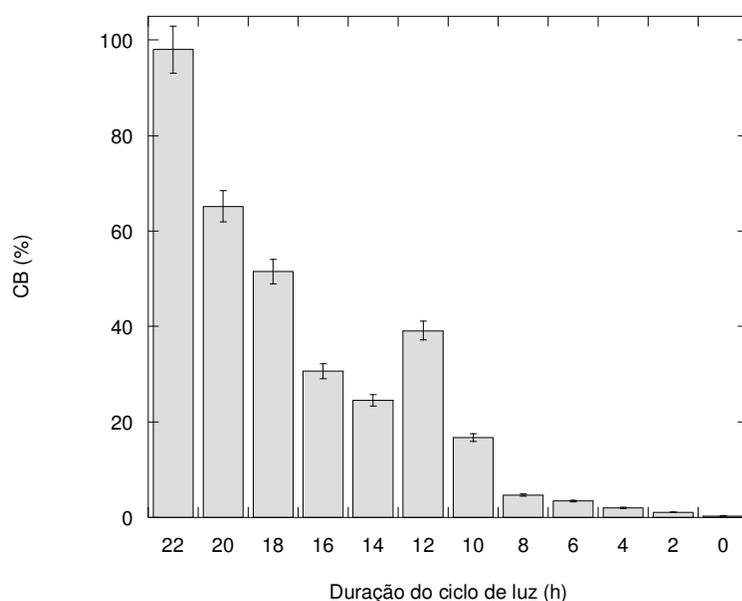


Figura 3: Percentual de carbono fixado em relação a condições contínuas de luminosidade.

A representação gráfica sugere que o suprimento descontínuo de energia proporciona reduções nas taxas de carbono fixado na biomassa entre 2,0 a 99,69%, o que indica a importância da fase clara da fotossíntese nas subseqüentes reações de fixação de carbono, devendo-se considerar estes critérios no projeto e análise de fotobiorreatores para o seqüestro de dióxido de carbono.

Os resultados obtidos para os diferentes ciclos de luminosidade avaliados, indicam que o desenvolvimento de tecnologias para a fixação biológica de dióxido de carbono em fotobiorreatores, depende fundamentalmente do acesso à energia luminosa, que deve ser provida a partir da energia solar, a fim de desenvolver processos de tecnologia limpa. Este tipo de tratamento de resíduos pode ser muito eficiente em países tropicais, principalmente em locais próximos a linha do equador, que possuem períodos similares

de luminosidade/escuro, associados a condições favoráveis de temperatura. Martins et al., (2007) reportam que países como o Brasil, possuem amplo potencial de exploração de energia solar, com irradiações solares médias que variam de 4,25 kW/m².dia a 6,50 kW/m².dia, nas diferentes regiões que abrangem o território. De acordo com os mapas de irradiação solar destes autores, todas as regiões do Brasil recebem elevados índices de energia luminosa, com potencial de utilização como fonte energética.

4 Conclusão

O desenvolvimento de fotobiorreatores para o seqüestro de dióxido de carbono é uma tecnologia em potencial para aplicação em países tropicais, com elevadas disponibilidade de luz solar. Entretanto, a partir do cultivo da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nægeli* em diferentes condições de fotoperíodo, ficou demonstrado a necessidade de considerar a indisponibilidade da energia luminosa em períodos integrais de tempo, a fim de predizer as taxas reais de remoção de dióxido de carbono nestes sistemas.

Nomenclatura

P_x : produtividade volumétrica (g/L.dia)
 X_m : concentração celular em $t=n$ (g/L)
 X_0 : concentração celular em $t=0$ (g/L)
 t_r : tempo de residência celular em $t=n$ (h)
 X_{max} : densidade celular máxima (g/L)
 X : concentração celular (g/L)
 t : tempo de residência (h)
CB: taxa de carbono incorporado a biomassa (g/L.dia)
 C_c : Percentual de carbono da biomassa (%)
 M_{CO_2} : peso molecular do CO₂
 M_C : peso molecular do carbono

5 Referências Bibliográficas

ESSAM, T.; AMIN, M.A.; TAYEB, O.E.; MATTIASSON, B.; GUIEYSSE, B. Solar-based detoxification of phenol and p-nitrophenol by sequential TiO₂ photocatalysis and photosynthetically aerated biological treatment. Water Research.n.41.p.1697–1704, 2007.

GROBBELAAR, J.U.; NEDBAL, L.; TICHY, V. Influence of high frequency light:dark fluctuations on photosynthetic characteristics of microalgae photoacclimated to different light intensities and implications for mass algal cultivation. J. Appl. Phycol.n.8.p.335–343, 1996.

HORTON, P.; RUBAN, A.V.; WALTERS, R.G. Regulation of light harvesting in green plants. *Plant Physiol.*n.106.p.415–420, 1994.

IVERSON, T.M. Evolution and unique bioenergetic mechanisms in oxygenic photosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology.*n.10.p.91-100, 2006.

JANSSEN, M.; KUIJPERS, T.C.; VELDHOEN, B.; TERNBACH, M.B.; TRAMPER, J.; MUR, L.R.; WIJFFELS, R.H. Specific growth rate of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella sorokiniana* under medium duration light:dark cycles: 13–87s. *Journal of Biotechnology.*n.70.p.323–333, 1999.

JANSSEN, M.; JANSSEN, M.; WINTER, M.; TRAMPER, J.; MUR, L.R.; SNEL, J.; WIJFFELS, R.H. Efficiency of light utilization of *Chlamydomonas reinhardtii* under medium-duration light:dark cycles. *Journal of Biotechnology.*n.78.p.123–137, 2000.

JANSSEN, M.; SLENDERS, P.; WINTER, M.; TRAMPER, J.; MUR, L.R.; WIJFFELS, R.H. Photosynthetic efficiency of *Dunaliella tertiolecta* under short light/dark cycles. *Enzyme and Microbial Technology.*n.29.p.298–305, 2001.

KITAYA, Y.; AZUMA, H. ; KIYOTA, M. Effects of temperature, CO₂/O₂ concentrations and light intensity on cellular multiplication of microalgae, *Euglena gracilis*. *Advances in Space Research.*n.35.p.1584-1588, 2005.

LEE, B.D.; APEL, W.A.; WALTON, M.R. Calcium carbonate formation by *Synechococcus* sp. strain PCC 8806 and *Synechococcus* sp. strain PCC 8807. *Bioresource Technology.*n.97.p.2427-2434, 2006.

MARTINS, F.R.; PEREIRA, E.B.; ABREU, S.L. Satellite-derived solar resource maps for Brazil under SWERA project. *Solar Energy.*n.81.p.517-528, 2007.

MOLINA GRIMA, E.; FERNANDÉZ, F.G.A.; CAMACHO, F.G.; CHISTI, Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scale up. *Journal of Biotechnology.*n.70.p.231-247, 1999.

ONO, E.; CUELLO, J.L. Carbon dioxide mitigation using thermophilic cyanobacteria. *Biosystems Engineering.*v.96.p.129-134, 2007.

PULZ, O.; SCHEINBENBOGEN, K. Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. *Advances Biochemical Engineering and Biotechnology.*n.59.p.123-152, 1998.

QUEIROZ, M.I.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L.Q, BASTOS, R.; GOLDBECK, R. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. *Bioresource Technology.*n.98.p.2163-2169, 2007.

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*.n.111.p.1-61, 1979.

SICKO-GOAD, L.; ANDRESEN, N.A. Effect of growth and light/dark cycles on diatom lipid content and composition. *J. Phycol.*n.27.p.710– 718, 1991.

TORO, J.E. The growth rate of two species of microalgae used in shellfish hatcheries cultured under two light regimes. *Aquac. Fish. Manage.*n.20.p.249–254, 1989.

YUE, L.; CHEN, W. Isolation and determination of cultural characteristics of a new highly CO₂ tolerant fresh water microalgae. *Energy Convers. Mgmt.*v.46.p.1896-1846, 2005.

Capítulo 7

Desenvolvimento de estratégias operacionais para a remoção de dióxido de carbono em fotobiorreatores

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar diferentes formas de operação de fotobiorreatores visando à remoção de dióxido de carbono por microalgas. Dois tipos de reatores (coluna de bolhas e air-lift), operando em três distintas condições operacionais (operação simples, com recirculação do ar e em série de dois estágios) foram avaliados quanto ao potencial de tratamento de ar contaminado com dióxido de carbono. Os resultados obtidos demonstram que a configuração do reator e o modo de operação são critérios determinantes no desempenho de fotobiorreatores para a fixação biológica de dióxido de carbono.

Palavras-chave: fotobiorreatores, seqüestro de dióxido de carbono, cianobacterias.

1 Introdução

Numerosas evidências das alterações nos sistemas climáticos da terra têm pressionado o desenvolvimento de estratégias para minimizar estes efeitos. A magnitude destas mudanças tem sido intensificada pela massiva quantidade e diversidade de fontes de poluição do ar. Gases como o dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4), óxido nitroso (N_2O), hidrofluorcarbonos (HFCs), perfluorcarbonos (PFCs) e hexafluoreto de enxofre (SF_6) são considerados como os principais responsáveis pelo efeito estufa, que é um fenômeno natural que ocasiona severas alterações no clima do planeta (Petit, 2003).

Devido às conseqüências das emissões destes gases, iniciou-se as primeiras regulamentações visando o controle de poluentes atmosféricos. Desta forma, os países signatários do protocolo de Kyoto, comprometeram-se em reduzir em 5% as emissões de gases de efeito estufa, no período compreendido entre 2008 a 2012 (UNFCCC, 1997).

As quantidades substanciais de dióxido de carbono emitidas pelas variadas atividades antropogênicas, fazem deste composto, um dos principais gases a serem controlados. A tecnologia de fotobiorreatores vem sendo reconhecida como um dos meios mais vantajosos para o tratamento de ar contaminado com CO_2 . Estes sistemas são utilizados para conduzir reações fotossintéticas, no qual este composto é transferido a fase aquosa do sistema onde ocorre a conversão microbiana em produtos como oxigênio, biomassa, biopolímeros solúveis, espécies químicas como carbonato e bicarbonato e compostos orgânicos voláteis (Ono & Cuello, 2007; Marcus, 1997; Muñoz et al., 2004). Diversos sistemas estão sendo propostos para o controle biotecnológico de gases contaminados com CO_2 , visando à remoção dos poluentes, associado à produção insumos, uma vez que parte do dióxido de carbono é incorporado às células de

organismos fotossintéticos. Além disso, a obtenção de retorno econômico através da condução destes sistemas é possibilitada, através do comércio de créditos de carbono, comercializados por intermédio do Banco Mundial, em um sistema denominado de Mecanismo de Desenvolvimento Limpo (MDL), proposto pelo protocolo. Em face disto, o trabalho teve por objetivo avaliar diferentes estratégias operacionais para a remoção de dióxido de carbono em fotobiorreatores.

2 Material e Métodos

2.1 Microrganismo e meio de cultura

As culturas de *Aphanothece microscopica Nägeli* (RSMAN92) foram propagadas e mantidas em meio sintético BGN (Ripka et al., 1979), com a seguinte composição: $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ($0,040g \cdot L^{-1}$), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ($0,075g \cdot L^{-1}$), EDTA ($0,001g \cdot L^{-1}$), H_3BO_3 ($2,860g \cdot L^{-1}$), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ($1,810g \cdot L^{-1}$), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ($0,222g \cdot L^{-1}$), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ($0,390g \cdot L^{-1}$), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ($0,079g \cdot L^{-1}$), $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ ($0,040g \cdot L^{-1}$), $NaNO_3$ ($150g \cdot L^{-1}$), $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ($0,006g \cdot L^{-1}$), citrato de amônio e ferro ($0,006g \cdot L^{-1}$), pH 8,0. As condições utilizadas foram 25°C, 1 klux de luminosidade e fotoperíodo de 12h.

2.2 Fotobiorreatores

O diagrama do aparato experimental utilizado está expresso na Figura 1. Os fotobiorreatores foram construídos em vidro, com uma espessura de 4mm, similares em termos de geometria, dimensão e volume de trabalho. Os sistemas possuem um diâmetro interno de 7cm e altura de 70cm, com um volume nominal de trabalho de 2,4L. Os reatores de coluna de bolhas (RCB), possuem um sistema de dispersão de ar de disco poroso de 7cm de diâmetro. Para os reatores air-lift (RAL), o sistema de dispersão consiste em um difusor de ar de 1 cm de diâmetro, localizado no centro de coluna. Nestes reatores foi usado um tubo concêntrico que possui um diâmetro interno de 3cm e uma altura de 50cm, localizado axialmente no centro da coluna e fixado a 5cm de distância do difusor de ar. Para os sistemas com recirculação do ar, os reatores de coluna de bolhas e air-lift utilizados foram conectados por meio de uma bomba a um tanque de armazenamento de 13,25L. O fluxo que parte do tanque é emitido novamente aos reatores, tendo por resultado um circuito fechado. Nos reatores conectados em série, a alimentação de ar do segundo reator é provida através dos gases dessorvidos na primeira coluna.

2.3 Obtenção dos dados cinéticos

Os experimentos foram realizados em três condições operacionais para cada reator: operação simples, com recirculação do ar e operação em séries de dois reatores. Os testes foram realizados em biorreatores operando em regime intermitente, alimentados com 2,4L de meio sintético BGN. As condições dos experimentos foram: concentração celular inicial de 100mg.L⁻¹, reator isotérmico, operando em temperaturas de 35°C, intensidades luminosas de 11klux e aeração contínua de 1VVM com injeção de ar enriquecido com dióxido de carbono em 15%. Os dados cinéticos foram monitorados em termos de concentração celular, pH e concentração de CO₂, a cada 12h de cultivo, durante as fases de crescimento do microrganismo. Os testes foram conduzidos em duplicata e os dados cinéticos referem-se à média de quatro repetições.

2.4 Modelagem cinética

A capacidade de eliminação (CE) é determinada através da relação mássica de dióxido de carbono degradado por unidade de volume de reator por unidade de tempo. Este parâmetro fornece a medida da habilidade do reator em remover dióxido de carbono, conforme indica a Equação 1. Na determinação das eficiências de remoção (ER) dos sistemas (Eq.2) considerou-se a fração de CO₂ removido no fotobiorreator, expresso em porcentagem (Devigny et al., 1999).

$$CE = \frac{(C_T - C_e) \times Q}{V_R} \quad (1)$$

$$ER = \frac{(C_T - C_e)}{C_T} \times 100 \quad (2)$$

A modelagem cinética para os reatores descontínuos com recirculação (Ibarra & Smith, 1974) consiste em estabelecer um balanço de massa na totalidade do sistema. Considera-se que os volumes da linha de conexão e da bomba são desprezíveis, que a reação se verifica somente no reator e que as mudanças de concentração de CO₂ na entrada e saída no reator são pequenas (C_R~C_T). Desta forma, a Equação 3 expressa o modelo cinético para a velocidade de reação em reator batelada com recirculação.

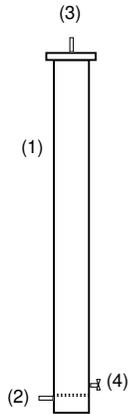
$$r = \left(\frac{V_R + V_T}{V_R} \right) \frac{d(CO_2)}{dt} \quad (3)$$

A validade do modelo proposto está baseada no critério de operação diferencial. Neste sentido, supondo que a vazão de alimentação (Q) é constante e que a concentração de CO₂ no efluente do reator é C_e, a concentração no reator irá variar desde C_T até C_e. Consequentemente, C_R-C_T quando (C_T - C_e)→0. Com estas suposições, a Equação 3 é válida e o critério desejado em termos de condição de operação e velocidade de remoção é dado pela Eq. 4.

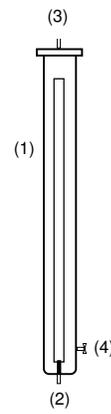
$$C_T - C_e = \frac{-VR}{Q} \left(\frac{V_T}{V_R + V_T} \right) \times r \quad (4)$$

2.5 Métodos Analíticos

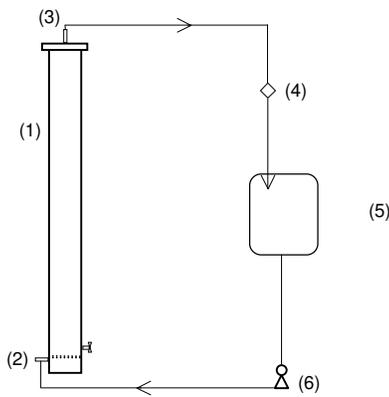
As determinações da concentração de dióxido de carbono no sistema foram realizadas por cromatografia gasosa. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo Agilent Technologies (Série 6890), equipado com uma coluna capilar empacotada porapack Q 80/100 (construída em aço inox com 1,8m de comprimento) conectada a um detector de condutividade térmica. As condições de operação foram as seguintes: temperatura do injetor e detector de 110°C e temperatura da coluna de 65°C. O gás carreador utilizado foi o hélio, a um fluxo de 0,6 mL/min. O volume de amostra injetado foi de 100 µL. O dióxido de carbono removido foi determinado a partir de amostras tomadas na fase gasosa do sistema (entrada e saída). As áreas obtidas mediante o integrador, foram relacionadas com curvas de referência para determinar as porcentagens de CO₂. A partir da porcentagem pode-se obter a concentração de CO₂ na fase gasosa. A medida da intensidade luminosa incidente no reator foi realizada a partir de um luxímetro digital (Minipa MLM 1010, precisão de ± 4%). A vazão de dióxido de carbono, ar e ar enriquecido com CO₂ foram determinados através de rotâmetros (AFSG 100 Key Instruments, precisão de ± 5%).



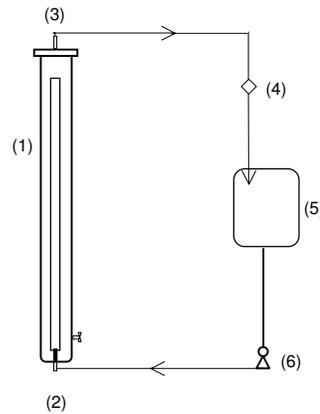
(A) Reator RCB com operação simples



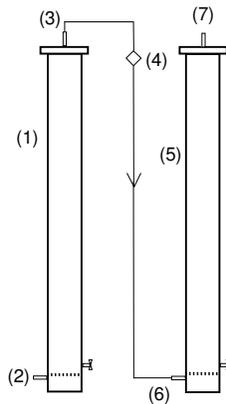
(B) Reator RAL com operação simples



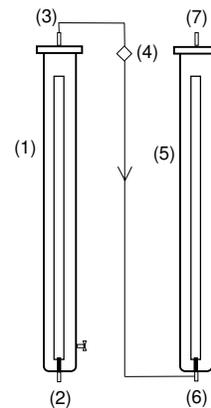
(C) Reator RCB com recirculação do ar



(D) Reator RAL com recirculação do ar



(E) Reatores RCB em série



(F) Reatores RAL em série

Figura 1: Diagramas experimentais. [A-B]: (1):reator; (2): amostrador da entrada de gases; (3): amostrador da saída de gases; (4): amostrador de líquido. [C-D] (1):reator; (2): amostrador da entrada de gases; (3): amostrador da saída de gases; (4): desumidificador de ar; (5):tanque de armazenamento; (6): bomba. [E-F]: (1):reator 1; (2): amostrador da entrada de gases; (3): amostrador da saída de gases; (4): desumidificador de ar, (5): reator 2; (6):amostrador da entrada de gases; (7): amostrador da saída de gases.

3 Resultados e Discussão

3.1 Reatores descontínuos com operação simples

Fotobiorreatores são sistemas físico-químico-biológicos multifásicos, com numerosas interações entre as variáveis do processo e as alterações dinâmicas entre gás-líquido-sólido (Molina Grima et al., 1999). O uso deste tipo de reatores em processos de eliminação de dióxido de carbono é considerado uma alternativa promissora, uma vez que o elemento carbono pode ser fixado através de diferentes mecanismos. Os dados cinéticos para o reator RCB com operação simples estão expressos na Figura 2.

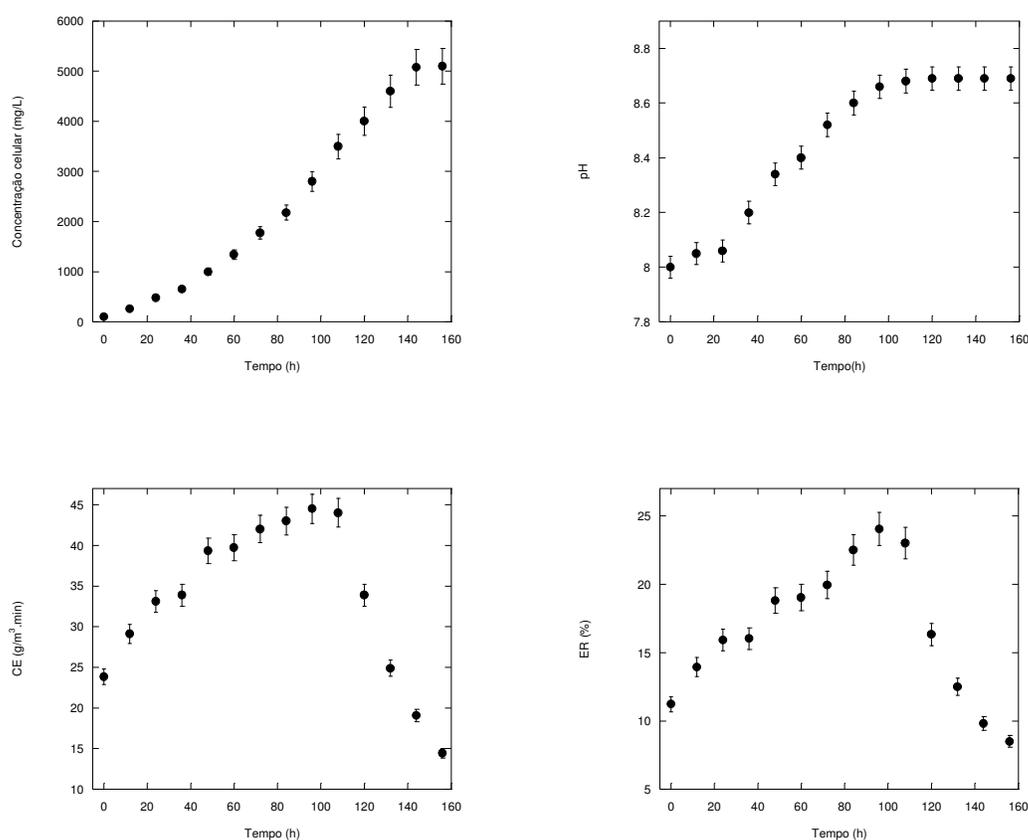


Figura 2: Dados cinéticos para reator RCB com operação simples.

Os dados cinéticos de remoção de dióxido de carbono, expressos em termos de capacidade de eliminação e eficiência de remoção demonstram a elevação gradual da remoção de CO_2 no sistema, até um determinado ponto onde começa a haver a redução da capacidade de eliminação de carbono inorgânico. Estas características estão relacionadas à depleção de nutrientes presentes no meio de cultivo, associados à formação de aglomerados celulares nos períodos mais avançados do processo (Muñoz et al., 2004). Estes aglomerados proporcionam uma baixa capacidade de remoção de

dióxido de carbono, devido a problemas de agitação e mistura no reator, somados a reduzida área por unidade de volume de célula capaz de captar a energia luminosa para a subsequente reação de fixação de átomos de carbono. Richardson & Jackson (2007) reportam que células de microalgas crescendo exponencialmente em sistemas agitados, tendem a formar aglomerados durante as colisões celulares. A taxa de formação destes aglomerados depende primariamente da abundância e do tamanho das células. De acordo com estes autores, estas características determinam os fluxos de absorção e dessorção de carbono inorgânico em sistemas aquosos.

Valores máximos de 44,5 g/m³.min e 24,04% foram obtidos para capacidade de eliminação e eficiência de remoção respectivamente, em 96h de tempo de residência celular.

As máximas concentrações celulares e valores de pH obtidos para o reator de coluna de bolhas foram de 5,1g/L e 8,69 respectivamente. A elevação gradual do pH, associado a massa celular em função do tempo de residência é característica do cultivo de microalgas em fotobiorreatores, a qual é um indicativo do consumo de carbono inorgânico. Lee, Apel & Walton (2006) e Berenguel et al., (2004) reportam que o aumento do pH em cultivos fotossintéticos ocorre através do transporte de íons hidróxido para o exterior da célula, através da reação catalisada pela enzima anidrase carbônica, associado à captação de íons H⁺ para o interior das membranas tilacóides. Estes fluxos, induzidos pela energia luminosa resultam em uma eficiente capacidade de fixação de CO₂.

A fixação biológica de dióxido de carbono é um processo de reações fotoquímicas em cadeia que conduzem à síntese de compostos. Globalmente, estes processos obedecem ao princípio da conservação da matéria (Leveau & Bouix, 1985). Deve-se considerar, no entanto, que a transformação de dióxido de carbono nestes sistemas não se dá apenas em biomassa. Outros produtos do metabolismo fotossintético estão envolvidos nestes processos, como por exemplo, a formação de proteínas e carboidratos exocelulares (Yamada et al., 1997; Otero & Vincenzini, 2003) associado à catálise de espécies químicas na formação de precipitados de bicarbonatos e carbonatos (Marcus, 1997), além da formação de compostos orgânicos voláteis (VOCs) como aldeídos e hidrocarbonetos, que são formados e desprendidos em cultivos fotossintéticos de microalgas (Wendel & Juttner, 1996; Muñoz et al., 2004). Os numerosos compostos que podem ser formados em reações fotossintéticas, associados às elevadas taxas de conversão de CO₂, justificam o interesse recente na aplicação destes organismos em processos de seqüestro de dióxido de carbono.

Comportamento similar foi obtido para o reator RAL em operação simples (Figura 3), no qual os máximos valores de capacidade de eliminação e eficiência de remoção situaram-se na faixa de 46,4 g/m³.min e 26,95% respectivamente. Estes valores são 4,1 e 10,7% superiores aos obtidos para o reator RCB para as máximas capacidades de eliminação e eficiências de remoção respectivamente. Além disso, observa-se que o reator RAL é mais eficiente ao longo de todo o período avaliado, o que indica capacidades de eliminação e eficiências de remoção globais superiores quando comparado ao sistema RCB. As máximas concentrações celulares e valores de pH obtidos situaram-se na faixa de 5,35 g/L e 8,99 respectivamente.

Dentre as muitas decisões do projeto de sistemas para a eliminação de dióxido de carbono, a configuração dos reatores e o modo de operação são fundamentais para a obtenção de elevados desempenhos. Os reatores de coluna verticais são compactos, de baixo custo e fáceis de operar monoaspticamente. Em adição, sistemas de coluna de bolhas e air-lift são consideradas opções viáveis para a eliminação biológica de dióxido de carbono (Molina Grima et al., 1999). De acordo com Jin & Lant (2004), a diferença básica entre estas duas configurações de reatores esta baseada na distribuição das bolhas de ar. Enquanto nos sistemas RCB há uma ascensão aleatória das bolhas de ar, nos reatores RAL a diferença de pressão hidrostática entre o riser e o downcomer induz a um movimento ordenado de ascensão e queda das bolhas de ar e conseqüentemente das células. Este tipo de movimento produz uma mistura e transferência de massa mais efetiva na fase líquida do reator RAL quando comparado aos sistemas RCB. Estas considerações justificam o melhor desempenho do sistema air-lift, quando comparado ao reator de coluna de bolhas, uma vez que se obteve não somente valores mais elevados de capacidade de eliminação e eficiência de remoção máximas, como também desempenho superior nos períodos críticos do processo, onde a mistura é dificultada pela formação de aglomerados celulares.

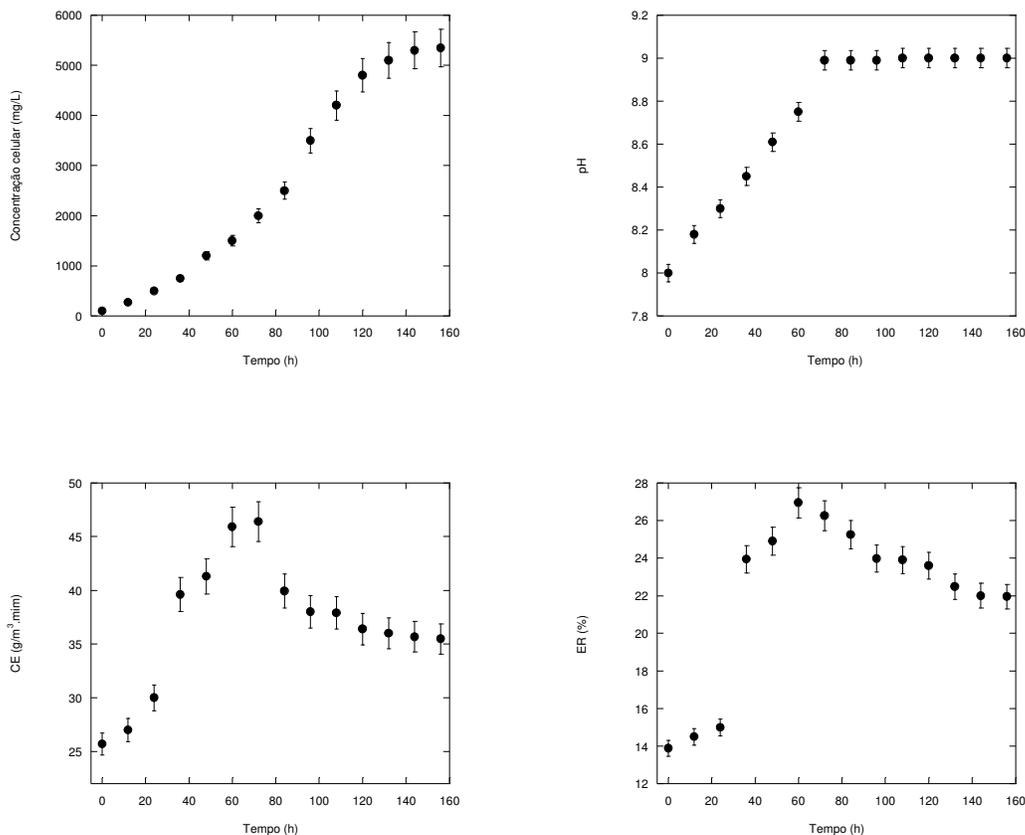


Figura 3: Dados cinéticos para reator RAL com operação simples.

3.2 Reatores descontínuos com recirculação do ar

Reatores em batelada com recirculação podem apresentar vantagens em processos de pequeno porte, no qual os poluentes são recirculados em circuito fechado até que o abatimento desejado seja alcançado. Desta forma, a Tabela 1 apresenta a caracterização cinética para um reator batelada de coluna de bolhas com recirculação do ar, em função do tempo de detenção hidráulica.

É verificado através da análise dos dados cinéticos um aumento gradual das taxas de remoção do dióxido de carbono recirculado em função do tempo de residência celular. Para o reator RCB, as máximas velocidades de consumo no tanque de armazenamento (3,82 g/m³.min) são obtidos em tempos de residência celular de 96h. Paralelamente, considerando a relação entre os volumes do reator e do tanque de armazenamento, obtêm-se taxas de remoção de CO₂ máximas no sistema de 24,91 g/m³.min, associados a uma diferença entre a concentração de dióxido de carbono presente no tanque (C_T) e na saída do reator (C_e) no instante considerado de 25,30 g/m³.

Estes dados, quando corroborados aos obtidos em reator RCB com operação simples, indicam que para estes sistemas, as máximas taxas de remoção de dióxido de carbono ocorrem em 96h de cultivo. Taxas de remoção inferiores no sistema de recirculação são verificadas, uma vez que a velocidade de remoção de dióxido de carbono é proporcional a sua concentração, a qual se reduz a cada passagem pelo sistema de reciclo. A adequação do modelo proposto está baseada na obtenção de perfis lineares de concentração de dióxido de carbono no reservatório em função do tempo, de forma a validar as considerações realizadas. Os elevados coeficientes de correlação obtidos associados à Figura 4, comprovam estas características.

Tabela 1: Cinética de remoção de dióxido de carbono em reator RCB com recirculação.

TDH (h)	$-d(\text{CO}_2)/dt$ ($\text{g}/\text{m}^3 \cdot \text{min}$)	R	r ($\text{g}/\text{m}^3 \cdot \text{min}$)	$C_T - C_e$ (g/m^3)
24	0,84	0,97	5,48	5,56
48	2,50	0,99	16,30	16,56
72	3,03	0,98	19,75	20,06
96	3,82	0,98	24,91	25,30
120	2,83	0,96	18,45	18,74
144	1,38	0,99	9,01	9,14
156	0,94	0,96	6,13	6,22

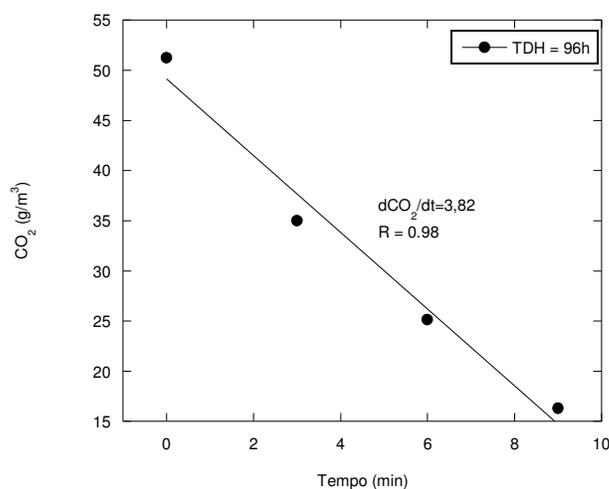


Figura 4: Dados do reator RCB com recirculação do ar para cinética do processo.

Comportamento similar é verificado no reator RAL com recirculação (Tabela 2), no qual se obteve taxas máximas de consumo de CO_2 no reservatório, taxas de remoção do sistema e diferença de concentração ($C_T - C_e$) de $4,54 \text{ g}/\text{m}^3 \cdot \text{min}$, $29,47 \text{ g}/\text{m}^3 \cdot \text{min}$ e $29,94 \text{ g}/\text{m}^3$ respectivamente. Entretanto, para este sistema, observou-se velocidades máximas de remoção em 72h de tempo de residência celular, o que representa redução de 15% no tempo necessário para atingir a velocidade máxima de remoção quando comparado ao

reator RCB. Além disso, as taxas máximas de remoção no sistema RAL são 15,47% superiores as obtidas no reator RCB, o que evidencia o melhor desempenho deste sistema. A Figura 5 apresenta o ajuste dos dados experimentais para o reator RAL, que juntamente com os valores dos coeficientes de correlação obtidos, demonstram a validade do modelo utilizado.

Tabela 2: Cinética de remoção de dióxido de carbono em reator RAL com recirculação.

TDH (h)	$-d(\text{CO}_2)/dt$ (g/m ³ .min)	R	r (g/m ³ .min)	$C_T - C_e$ (g/m ³)
24	1,68	0,97	10,95	11,12
48	3,82	0,95	24,90	25,29
72	4,54	0,98	29,47	29,94
96	3,68	0,95	24,01	24,38
120	3,34	0,97	21,78	28,22
144	3,61	0,99	23,54	23,91
156	3,13	0,99	21,58	21,92

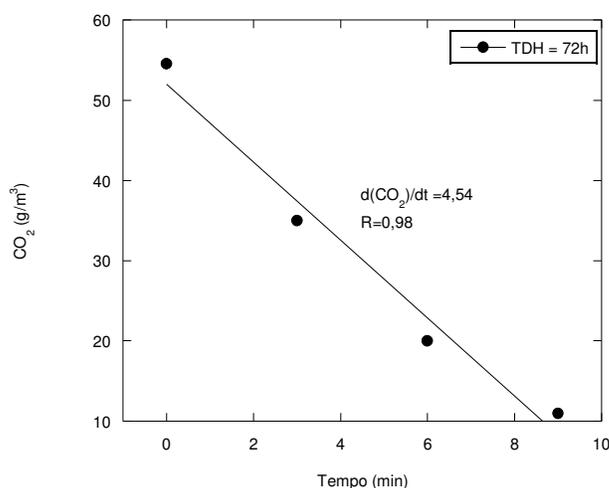


Figura 5: Dados do reator RAL com recirculação do ar para cinética do processo.

Os reatores em batelada com recirculação, são utilizados amplamente em sistemas laboratoriais, para a análise da cinética de reações. Objetivo principal destes estudos é obter as constantes cinéticas através da dependência da concentração de um determinado composto com o tempo dentro do tanque de armazenamento (Sagawe et al., 2004). A vantagem principal deste modo de operação está relacionada com a possibilidade de obtenção de elevados valores de eficiências de remoção, uma vez que o circuito fechado possibilita a manipulação da taxa total de remoção. Industrialmente, este tipo de operação é limitada pela baixa capacidade de eliminação de poluentes. Desta forma, para volumes maiores, sistemas com recirculação contínuos podem ser mais apropriados.

3.3 Reatores em série de dois estágios

A eficiência na utilização do dióxido de carbono transferido a fase líquida de fotobiorreatores é um parâmetro de fundamental importância no desempenho destes processos. Este fator depende primariamente da capacidade metabólica das células e também da configuração e modo de operação dos reatores. Uma vez que se tenha atingido o limite metabólico das células, o aumento do tempo de residência do CO_2 nos sistemas é um fator determinante na eficiência do processo. O estabelecimento desta condição pode ser obtido através da conexão de reatores em série, no qual o ar contaminado com dióxido de carbono dessorvido é utilizado para alimentar o segundo reator. Desta forma, os parâmetros cinéticos de crescimento celular e remoção de CO_2 em um sistema de dois reatores RCB em série estão expressos na Figura 6.

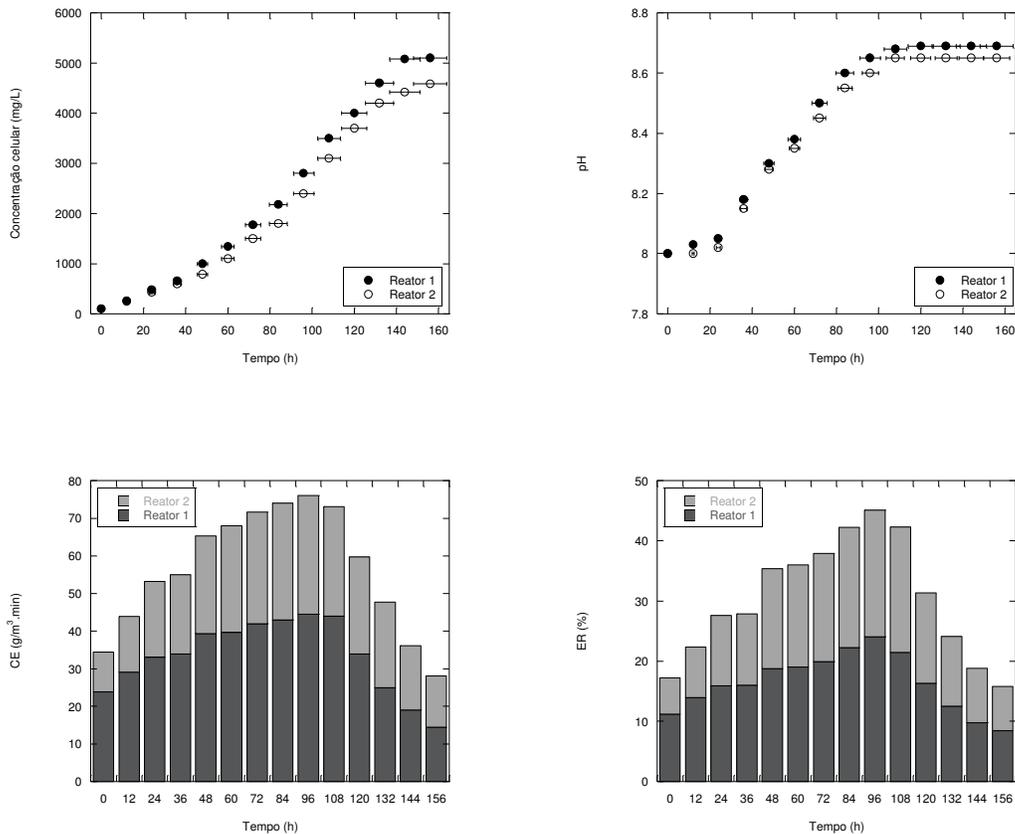


Figura 6: Dados cinéticos para dois reatores RCB em série.

A avaliação global do sistema indica um significativo aumento da capacidade de eliminação e eficiência de remoção quando comparado ao sistema RCB com operação simples. Valores máximos de $76,0 \text{ g/m}^3 \cdot \text{min}$ e $45,08\%$ para a capacidade de eliminação e eficiência de remoção de dióxido de carbono respectivamente. Similar resultado foi

evidenciado para os reatores air-lift conectados em série. Para este sistema, verificou-se máximos valores de capacidade de eliminação de $80,06 \text{ g/m}^3 \cdot \text{min}$ associados a uma eficiência de remoção de $51,9\%$. Em relação aos valores de pH e concentração celulares, observam-se a partir da análise das curvas perfis semelhantes, embora os valores sejam inferiores ao longo de todo o cultivo para ambos os parâmetros no segundo reator.

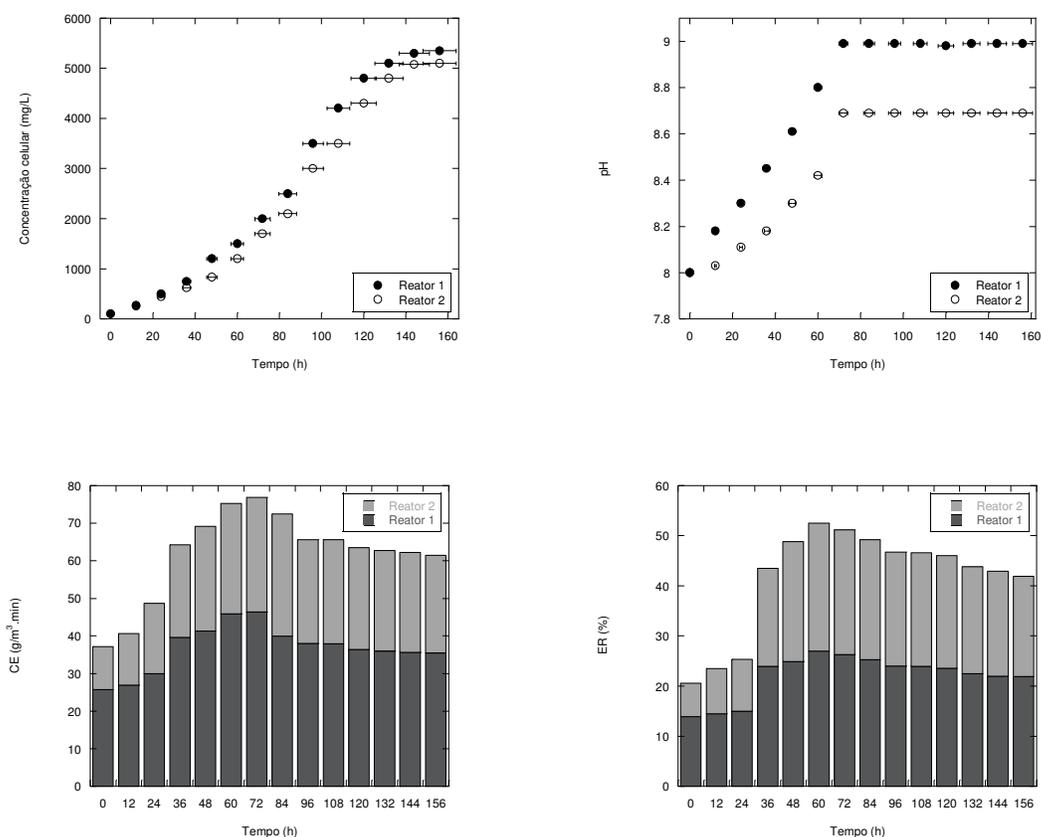


Figura 7: Dados cinéticos para dois reatores RAL em série.

3.4 Capacidade global de seqüestro de carbono

A integração numérica da área abaixo das curvas de capacidade de eliminação versus tempo de residência pelo método 1/3 de Simpson (Carnahan et al., 1969), fornece a quantidade de carbono fixado nos sistemas. A Tabela 3 apresenta os valores das capacidades diárias de seqüestro de carbono, considerando a totalidade dos sistemas utilizados. A análise dos resultados demonstra a obtenção de desempenhos superiores nos reatores air-lift para todos os modos de operação avaliados, quando comparado aos reatores de coluna de bolhas. Em relação aos modos de operação, as séries de dois reatores air-lift, demonstraram o melhor desempenho na remoção biológica de dióxido de carbono.

Tabela 3: Capacidade diária de seqüestro de carbono dos reatores.

Sistema	Carbono sequestrado (g/dia)
RCB (operação simples)	30,97 ± 0,15
RCB (operação em série)	43,94 ± 0,18
RCB (operação com recirculação do ar)	13,33 ± 0,26
RAL (operação simples)	34,38 ± 0,12
RAL (operação em série)	57,91 ± 0,09
RAL (operação com recirculação do ar)	20,81 ± 0,10

4 Conclusão

A mitigação das emissões de gases de efeito estufa, particularmente CO₂ e sua efetiva utilização representam um importante aspecto para o desenvolvimento sustentável das atividades industriais. O seqüestro de dióxido de carbono através de reações fotossintéticas é uma estratégia adequada sob este ponto de vista, uma vez que é possível transformar este poluente em vários produtos do metabolismo fotossintético, que podem ser reaproveitados de diferentes formas. Foi considerado no presente estudo, o desenvolvimento de estratégias operacionais e projeto de reatores para conversão biológica de CO₂, os quais resultaram na elucidação da capacidade da aplicação deste tipo processo. Os reatores air-ift demonstraram maior habilidade na remoção de CO₂ quando comparados aos sistemas de colunas de bolhas. A operação com recirculação do ar, evidenciou a possibilidade deste tipo de arranjo em processos de pequena escala. Entretanto, as séries de dois reatores demonstraram ser o modo de operação de maior potencial para aplicação em escala industrial.

Nomenclatura

CE: Capacidade de eliminação (g/m³.min)
 ER: Eficiência de remoção (%)
 C_T: concentração de dióxido de carbono na entrada do sistema (g/m³)
 C_e: concentração de dióxido de carbono na saída do sistema (g/m³)
 Q: fluxo gasoso (m³/min)
 V_R: volume do reator (m³)
 V_T: volume do somatório entre o tanque de armazenamento e o reator (m³)
 r: velocidade de consumo de dióxido de carbono (g/m³.min)
 d(CO₂)/dt: velocidade de consumo de CO₂ no tanque de armazenamento (g/m³.min)

5 Referências Bibliográficas

BERENGUEL, M.; RODRIGUEZ, F.; ACIÉN, F.G.; GARCIA, J.L. Model predictive control of pH in tubular photobioreactors. Journal of Process Control.n.14.p.377-387, 2004.

CARNAHAN, B.; LUTHER, H.A.; WILKES, J.O. Applied numerical methods. New York. Wiley, 1969.

DEVINNY, J.S.; DESHUSSES, M.A.; WEBSTER, T.S. Biofiltration for air pollution control. Lewis Publishers, 1999.

IBARRA, M.; SMITH, J.M. Induction-period kinetics in acrylamide photopolymerization AICHE Journal.v.20.p.404-407, 1974.

JIN, B.; LANT, P. Flow regime, hydrodynamics, floc size distribution and sludge properties in activated sludge bubble column, air-lift and aerated stirred reactors. Chemical Engineering Science.n.59.p.2379–2388, 2004.

LEE, B.D.; APEL, W.A.; WALTON, M.R. Calcium carbonate formation by *Synechococcus* sp. strain PCC 8806 and *Synechococcus* sp. strain PCC 8807. Bioresource Technology.n.97.p.2427-2434, 2006.

LEVEAU, J.Y.; BOUIX, M. Cinéticas microbianas. In: Scriban, R. Manole, 1985.

MARCUS, Y. Distribution of inorganic carbon among its component species in cyanobacteria: do cyanobacteria in fact actively accumulate inorganic carbon? Journal of Theoretical Biology. n.185.p.31-45, 1997.

MOLINA GRIMA, E.; FERNANDÉZ, F.G.A.; CAMACHO, F.G.; CHISTI, Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scale up. Journal of Biotechnology.n.70.p.231-247, 1999.

MUÑOZ, J.; MUDGE, S.M.; SANDOVAL, A. Effects of ionic strength on the production of short chain volatile hydrocarbons by *Dunaliella salina* (Teodoresco). Chemosphere.n.54.p.1267–1271, 2004.

MUÑOZ, R.; KÖLLNER, C.; GUIEYSSE, B.; MATTIASSON, B. Photosynthetically oxygenated salicylate biodegradation in a continuous stirred tank photobioreactor. Biotechnology and Bioengineering.v.87.n.6.p.797-803, 2004.

ONO, E.; CUELLO, J.L. Carbon dioxide mitigation using thermophilic cyanobacteria. Biosystems Engineering.n.96.p.129-134, 2007.

OTERO, A.; VINCENZINI, M. Extracellular polysaccharide synthesis by Nostoc strains as affected by N source and light intensity. Journal of Biotechnology.n.102.p.143-152, 2003.

PETIT, M. The greenhouse effect, impacts and possible solutions: overall credibility. Geoscience n.335.p.497-501, 2003.

RICHARDSON, T.L.; JACKSON, G.A. Small phytoplankton and carbon export from the surface ocean. *Science*.v.315.p.838-840, 2007.

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*.n.111.p.1-61, 1979.

SAGAWA, G.; BRANDI, R.J.; BAHNEMANN, D.; CASSANO, A.E. Photocatalytic reactors for treating water pollution with solar illumination. III: a simplified analysis for recirculating reactors. *Solar Energy*.n. 77.p. 471–489, 2004.

UNFCCC. Kyoto Protocol to the United Nations Framework Convention on Climate Change (UNFCCC). <http://unfccc.int/resource/docs/convkp/kpeng.pdf>, 1997.

YAMADA, H.; OHKUNI, N.; KAJIWARA, S.;OHTAGUCHI, K. CO₂-removal characteristics of *Anacystis nidulans* R2 in airlift bioreactors. *Energy*.v.22.n.2/3.p.349-352, 1997.

WENDEL, T.; JUTTNER, F. Lipoxygenase-mediated formation of hydrocarbons and unsaturated aldehydes in freshwater diatoms. *Phytochemistry*.v.41.n.6.p.1445-1449, 1996.

Capítulo 8

Conclusão geral

Conclusão

O seqüestro de dióxido de carbono em fotobiorreatores por microalgas envolve diferentes processos, responsáveis pela conversão deste poluente. Neste sentido, além dos mecanismos biológicos, processos físico-químicos estão envolvidos na remoção de CO₂ nestes sistemas, fazendo com que se obtenham elevadas taxas de eliminação de dióxido de carbono.

A incorporação de carbono em biomassa é significativamente afetada pelos parâmetros temperatura, intensidade luminosa e concentração de dióxido de carbono. As máximas taxas de fixação de carbono em biomassa obtidas nas cinco faixas inicialmente consideradas para as três condições operacionais situaram-se em 45,78 mg_{carbono}/L.h.

O estudo cinético da absorção/dessorção de CO₂ em fotobiorreatores de coluna de bolhas demonstrou que elevadas concentrações deste composto são perdidas junto aos gases de exaustão, sendo convertido apenas uma fração do dióxido de carbono alimentado. A temperatura, intensidade luminosa e concentração de CO₂ determinam os mecanismos de absorção e dessorção, obtendo-se taxas máximas de remoção de dióxido de carbono de 108,56 mg/L.min.

A fixação de carbono em biomassa associa o tratamento de poluentes com a produção de insumos que podem ser reutilizados com diferentes propósitos. Assim, a otimização da biofixação de carbono em células resultou em taxas máximas de 109,2 mg_{Carbono}/L.h, o que representa aumento de 63,42 mg_{carbono}/L.h, quando comparado as taxas máximas obtidas nas condições testadas inicialmente.

O efeito do fotoperíodo demonstrou a importância da fase clara da fotossíntese na subsequente reação de fixação de átomos de carbono. Os diferentes ciclos de luz avaliados proporcionaram redução de eficiência de incorporação de carbono em biomassa que variou entre 2,0 a 99,69%. Estes resultados elucidam a necessidade de considerar a indisponibilidade de regimes contínuos de luz no projeto de fotobiorreatores para o seqüestro de carbono.

As configurações dos fotobiorreatores testados demonstraram o melhor desempenho dos reatores air-lift quando comparados com sistemas similares de coluna de bolhas. A conexão de dois reatores em série proporcionou as maiores eficiências e capacidades de eliminação de CO₂. Capacidades diárias de seqüestro de carbono na ordem de 24,13 g_{carbono}/L.dia foram obtidas em reatores operando com alimentação de

gases contaminados com 15% de dióxido de carbono, que é a faixa de concentração obtida na queima de combustíveis fósseis.

A tecnologia desenvolvida durante esta tese de doutorado apresenta potencial para aplicação em processos de engenharia ambiental, com foco na obtenção de créditos de carbono. Países tropicais como o Brasil, que apresentam condições de temperatura e intensidade luminosa adequadas, combinados a indústrias que geram correntes de gases contaminados com dióxido de carbono podem utilizar este tipo de sistema para reduzir as emissões de dióxido de carbono para a atmosfera. No entanto, embora estes sistemas apresentem elevada capacidade de converter dióxido de carbono em produtos do metabolismo fotossintético, inúmeras dificuldades técnicas ainda necessitam de esclarecimento, quando se visa à ampliação de escala e o uso em condições industriais.

Capítulo 9

Sugestão para trabalhos futuros

Sugestão para Trabalhos Futuros

Identificar e quantificar os compostos intermediários envolvidos nos processos de transformação do dióxido de carbono;

Estudar os mecanismos de transferência de massa no transporte de dióxido de carbono da fase gasosa até a conversão microbiana em produtos do metabolismo fotossintético.

Avaliar o uso da energia solar como fonte de luminosidade;

Avaliar o processo em escala piloto.

Capítulo 10

Anexo I



Rates of CO₂ removal by *Aphanothece microscopica Nægeli* in tubular photobioreactors

Eduardo Jacob-Lopes, Carlos Henrique Gimenes Scoparo, Telma Teixeira Franco*

Biochemical Engineering Laboratory, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brazil

Received 16 February 2007; received in revised form 5 June 2007; accepted 6 June 2007

Abstract

The integral method for the analysis of kinetic data was used to describe the removal of carbon dioxide dissolved in the aqueous phase of a tubular photobioreactor by *Aphanothece microscopica Nægeli*. The effects of the carbon dioxide concentration (3, 15, 25, 50 and 62%), light intensity (960, 3000, 6000, 9000 and 11,000 lux) and temperature (21.5, 25, 30, 35 and 38.5 °C) were considered using a central composite design, aiming to determine the most efficient system conditions. Response surface methodology showed the importance of the operational parameters of the photobioreactor on the kinetics of carbon dioxide removal, a good fit of the first order kinetic model to the experimental data being obtained. © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Global warming; Carbon dioxide sequestration; Microalgae/cyanobacteria; Photobioreactor

1. Introduction

Numerous studies have suggested that marine cyanobacteria could be considered as a solution for the reduction of atmospheric carbon dioxide levels [1,2]. Photosynthesis occurring in the oceans is responsible for approximately 40% of the overall amount of carbon annually fixed on the planet. This process is carried out by unicellular microorganisms constituting the phytoplankton, where the dominant species are composed of cyanobacteria, helping to reduce the inorganic carbon concentration in the oceans in a cyclical process in which organic carbon is re-oxidised by way of heterotrophic respiration, enriching the oceans with inorganic carbon. These biological pumps help maintain the atmospheric carbon dioxide concentration [3].

Based on these biological systems, diverse biochemical engineering processes are being carried out, in which the metabolism of the photosynthetic microorganisms convert light energy and carbon dioxide into natural molecules [4]. These systems aim to reduce the carbon dioxide emissions from various industrial manufacturing sectors, by incorporating this pollutant into biomass [5].

The development of photobioreactor technology is being carefully reviewed in detail, with a focus on tubular photobioreactors, considered to be more promising for the large scale production of bio-products obtained from the cultivation of microalgae, with the simultaneous removal of CO₂ [6,7].

However, the efficiency of these processes has only been demonstrated in theory, and more detailed evaluations are required for the use of these systems, with the objective of obtaining carbon credits. With respect to the rates of carbon dioxide removal, expressed in terms of kinetic models, few references can be found in the literature that report on the performance of cyanobacteria and/or microalgae to photosynthetically consume inorganic carbon [8], suggesting the need for studies to evaluate the influence of the process parameters on the rates of the biological removal of CO₂. Thus, this study presents an initial quantification, aimed at describing the kinetics of the removal of carbon dioxide by cyanobacteria in tubular photobioreactors. The principle objective of the study was to evaluate the CO₂ removal rates in photobioreactors using a culture of the cyanobacteria *Aphanothece microscopica Nægeli*.

2. Kinetic modelling

The integral method for the analysis of kinetic data is usually used to interpret substrate consumption data and determine the

* Corresponding author. Tel.: +55 19 3521 2089.
E-mail address: franco@feq.unicamp.br (T.T. Franco).

rate equations [9,10]. In this method, a determined reaction order is assumed and the differential equation used integrated to model the system in batches. In this trial and error procedure, if the considerations are correct, the graph of concentration *versus* time will be linear.

For the simplified reaction ($\text{CO}_2 \rightarrow \text{Products}$), carried out in a batch reactor with constant volume, the molar balance is described by Eq. (1):

$$\frac{-d[\text{CO}_2]}{dt} = r_{\text{CO}_2} \quad (1)$$

Assuming that the reaction rate is a function only of the carbon dioxide concentration, the rate law can be written in the following form:

$$-r_{\text{CO}_2} = k[\text{CO}_2]^n \quad (2)$$

Considering a first order reaction ($n = 1$) and combining the rate law with the molar balance, Eq. (3) is obtained:

$$\frac{-d[\text{CO}_2]}{dt} = k[\text{CO}_2] \quad (3)$$

Integrating the differential equation, with $[\text{CO}_2] = [\text{CO}_2]_0$ at $t = 0$, Eq. (3) becomes:

$$\ln \frac{[\text{CO}_2]_0}{[\text{CO}_2]} = kt \quad (4)$$

Thus, the graph of $\ln([\text{CO}_2]_0/[\text{CO}_2])$ as a function of time should be linear, with a slope corresponding to the rate constant of the reaction (k).

However, one should consider that the variation in carbon dioxide as a function of time is not only due to biological and physicochemical removal, since part of the CO_2 is lost with the exhaustion gases (desorption). The true rate of carbon dioxide removal from the system is obtained by determining the resulting rate constant of the reaction (k_R), which corresponds to the difference between the rate constant of the reaction for the processes of absorption (k_1) and desorption (k_2). In this way, with the values for k_R and the CO_2 concentration in the system and considering a first order reaction, it is possible to obtain the rate of carbon dioxide removal.

3. Material and methods

3.1. Microorganism and culture medium

The cultures of *Aphanotheca microscopica* Nägeli (RSMAn92) were propagated and maintained on standard BGN medium [11] with the following composition: $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (0.040 g L^{-1}), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.075 g L^{-1}), EDTA (0.001 g L^{-1}), H_3BO_3 (2.860 g L^{-1}), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.810 g L^{-1}), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.222 g L^{-1}), $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.390 g L^{-1}), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.079 g L^{-1}), $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.040 g L^{-1}), NaNO_3 (150 g L^{-1}), $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.006 g L^{-1}), ammonium and iron citrate (0.006 g L^{-1}), pH 8.0. The conditions used were 25°C , 1 klux light intensity and a photoperiod of 12 h.

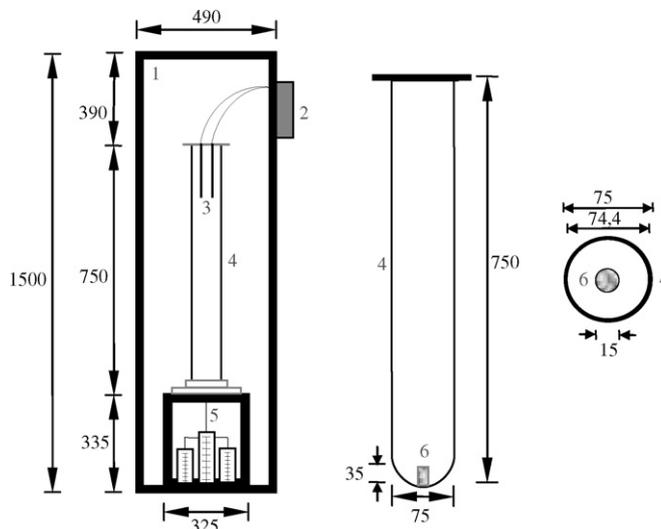


Fig. 1. Diagram of the experiment. (1) photoperiod chamber; (2) pH, temperature and CO_2 analyser; (3) pH, temperature and CO_2 sensors; (4) photobioreactor; (5) system controlling the flow rate and mixture of the gases; (6) gas diffuser, all dimension in mm.

3.2. Photobioreactor design

The experiments were carried out in a 3.2L bubble column photobioreactor. The lighting system consisted of sixteen 20 W fluorescent lamps, located in a photoperiod chamber. The gas flow was controlled by three rotameters that measured the flow rates of the carbon dioxide, the air and the mixture of gases, respectively. Fig. 1 shows the diagram of the experiment.

3.3. Obtaining and analysis of the kinetic data in an experimental photobioreactor

The experiments were carried out in bioreactors operating with an intermittent regime, fed on 3.0L synthetic BGN medium. The test conditions were: initial cell concentration of 100 mg L^{-1} , isothermal reactor operating under different temperatures and light intensities and continuous aeration at 1 VVM with the injection of air enriched with different concentrations of carbon dioxide. Response surface methodology was used to determine the optimal conditions for carbon dioxide removal, as a function of three experimental factors (temperature, light intensity and concentration of carbon dioxide enriched air). A five-level central composite design was used to evaluate the relationship between the culture conditions (independent variables) and the rate of CO_2 removal (dependent variable). The experimental design and the statistical analyses were carried out using the Statistica 7.0 software (Statsoft, USA). Table 1 shows the levels of the experimental variables used:

For a three-factor system, the statistical model is defined by Eq. (5) [12]:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (5)$$

Table 1
Values of the independent variables for the different levels of the experimental design

Independent variable	Symbol	Level				
		−1.68	−1	0	1	+1.68
Temperature (°C)	X_1	21.5	25	30	35	38.5
Light intensity (klux)	X_2	0.96	3	6	9	11
CO ₂ concentration (%)	X_3	3	15	25	50	62

3.4. Determination of the dissolved CO₂ concentration and the concentration profiles

The concentration of carbon dioxide dissolved in the liquid phase was evaluated by a dynamic method, in which the CO₂ transfer was interrupted every 12 h of cultivation, and the concentration of free carbon dioxide measured as a function of time for 5 min, taking readings every 0.5 min. Estimates of carbon dioxide desorption were carried out by way of control experiments in the absence of the microorganism for each experimental condition as a function of the CO₂ concentration, temperature and stirring involved in the system. The data for carbon dioxide concentration desorbed from the liquid phase were recorded in a transient regime every 0.5 min for 5 min. Once the variations in the concentrations of carbon dioxide absorbed and desorbed by the whole culture had been obtained, the exponential growth phase was numerically determined by fitting the cell concentration to a polynomial function, and, for this period, calculating the means of the variation in the concentration of carbon dioxide absorbed as a function of time. The two series of experimental data (mean absorption and desorption) obtained were fitted to a first order kinetic model to estimate the kinetic variables for the removal and loss of carbon dioxide from the system.

3.5. Analytical methods

The concentration of dissolved carbon dioxide and the temperature were determined using a polarographic probe (Mettler Toledo InPro5000 series). The measurements of light intensity incident on the reactor were carried out on the external column surface using a digital luximeter (Minipa MLM 1010). The flow rates of the carbon dioxide, air and CO₂ enriched air were determined using rotameters (AFSG 100 Key Instruments). The cell concentration was evaluated gravimetrically by filtering a known volume of culture medium through a 0.45 μm filter and drying at 60 °C for 24 h [13].

4. Results and discussion

According to the proposed experimental design, 17 experiments were carried out evaluating different combinations of temperature, light intensity and carbon dioxide concentration. The proposed integral analytical method was used to interpret the results for substrate removal and to determine the equations for the rate of carbon dioxide removal. During these analyses, the volume of the photobioreactor was considered to be constant. Significant variations in the temperature and concentration were not considered, since the aeration system provided an adequate

dispersion of the reagent mixture. Fig. 2 shows the fit of the experimental data to the proposed model for carbon dioxide removal under the different conditions evaluated. The total variation in free carbon dioxide concentration as a function of time was considered as represented by the variation caused by the presence of the microorganism (absorption) in the bioreactor, added to the losses of CO₂ in the exhaustion gases (desorption), both measurements being made in the liquid phase of the system. The kinetic data correspond to the mean value of carbon dioxide removal in the exponential growth phase.

It can be seen from the analysis shown in Fig. 2 that a satisfactory fit was obtained for the proposed model, independent of the condition considered, considering the experimental difficulties and the dispersion of the conditions evaluated. These results are better elucidated in Table 2, which shows the kinetic parameters for the fit of the model.

The high values obtained for the determination coefficients indicate the adequacy of the model proposed with respect to the experimental data. Equivalent values were obtained for the reaction rates constants in the presence (k_1) and absence (k_2) of the microorganism, suggesting that significant proportions of carbon dioxide were lost in the exhaustion gases. This indicated that an excess of carbon dioxide was being added to the culture medium, only a fraction of the added CO₂ being converted into biomass and other products of photosynthetic metabolism. Berenguel et al. [14] and Chae et al. [15] showed similar results, reporting that high CO₂ concentrations in the gases entering the bioreactor resulted in considerable losses to the atmosphere. According to these authors, the excess supply of carbon dioxide could favour the availability of the carbon source to the cells, so as not to limit metabolic activity. Nevertheless, the excess addition of this compound provokes losses that are not used by the cultures, resulting in unnecessary environmental pollution. Although the system allowed for significant losses of CO₂ to the atmosphere, it was shown that, independent of the condition considered, positive rates ($k_1 > k_2$) of carbon dioxide removal were obtained in the bioreactor, suggesting that part of the carbon dioxide transferred to the culture medium was removed by the action of the photosynthetic metabolism of the *Aphanothece microscopica* Nägeli.

It was also shown that the highest ratios between the constant for the rate of carbon dioxide removal as a function of the constant for the rate of carbon dioxide lost to the atmosphere (k_1/k_2) occurred under the conditions of 25 °C with 15% of carbon dioxide (2.66), independent of the light intensity, suggesting that the process occurred more efficiently under these conditions, with greater compensation between the addition and loss of carbon dioxide. The cultivation carried out with 50%

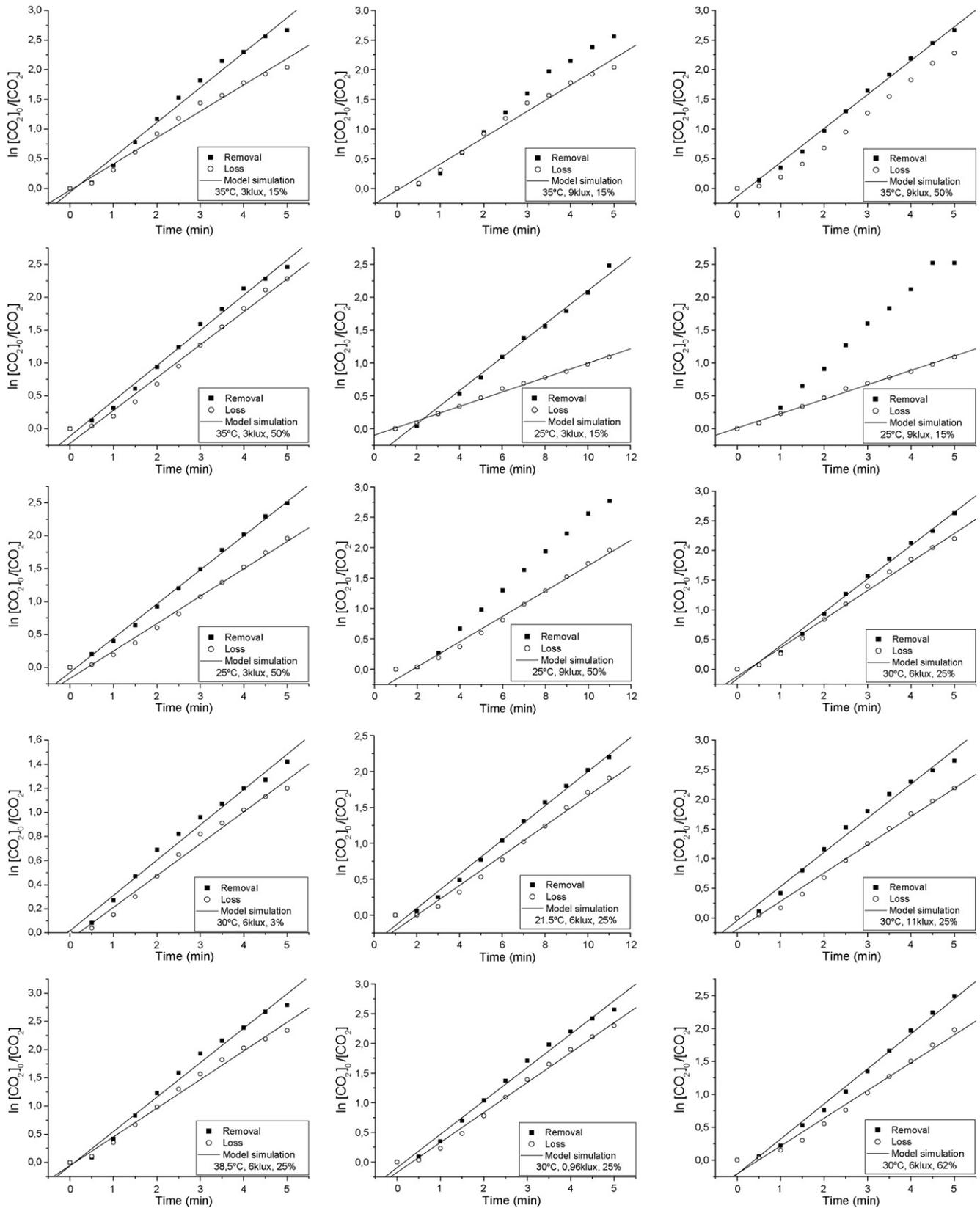


Fig. 2. Fit of the experimental data by the integral method for the analysis of first order kinetic data.

Table 2
Kinetic parameters for the rate of carbon dioxide removal

Condition			Kinetic parameter							
X_1 (°C)	X_2 (klux)	X_3 (%)	k_1 (min ⁻¹)	R^2	k_2 (min ⁻¹)	R^2	k_R (min ⁻¹)	k_1/k_2	CO ₂ (mg L ⁻¹)	μ_{\max} (day ⁻¹)
35.0	3	15	0.587	0.985	0.444	0.984	0.143	1.32	130	0.648
35.0	9	15	0.560	0.988	0.444	0.984	0.116	1.26	131	0.816
35.0	3	50	0.534	0.991	0.490	0.986	0.044	1.09	594	0.528
35.0	9	50	0.570	0.994	0.490	0.986	0.080	1.16	590	0.601
25.0	3	15	0.506	0.990	0.210	0.996	0.300	2.41	24	0.240
25.0	9	15	0.559	0.990	0.210	0.996	0.350	2.66	25	0.312
25.0	3	50	0.518	0.997	0.416	0.989	0.102	1.24	593	0.552
25.0	9	50	0.600	0.993	0.416	0.989	0.184	1.44	596	0.552
30.0	6	25	0.561	0.993	0.482	0.991	0.080	1.16	280	0.672
30.0	6	3	0.290	0.985	0.264	0.987	0.030	1.09	50	0.504
21.5	6	25	0.470	0.993	0.410	0.983	0.060	1.14	455	0.576
30.0	11	25	0.575	0.987	0.475	0.988	0.100	1.21	340	0.720
38.5	6	25	0.610	0.986	0.500	0.990	0.110	1.22	260	0.072
30.0	0.96	25	0.562	0.990	0.504	0.990	0.060	1.11	330	0.192
30.0	6	62	0.530	0.990	0.420	0.981	0.110	1.26	790	0.552

carbon dioxide, 9 klux and 25 °C presented intermediate values for the ratio between CO₂ removal and CO₂ loss. These results, when corroborated by the carbon dioxide removal rates (Table 3), indicated this cultivation condition as the equilibrium point between the rates of removal and the process efficiency. This apparent discrepancy between the data is justified as the losses of carbon dioxide in the exhaustion gases rise with the increase in CO₂ concentration in the air mixture, causing an increase in the free dissolved carbon dioxide in the steady state. Thus, since the rate of removal of carbon dioxide is proportional to the concentration of dissolved gas, the high constants obtained for the rate under conditions of 15% of CO₂ enriched air were not sufficient to compensate the high values of free carbon dioxide obtained under conditions with air enriched with high proportions of carbon dioxide. According to the results of Fridlyand et al. [16], the ratios between the rates of CO₂ fixed and CO₂ lost can vary between 0.66 and 4.0 as a function of

the enzyme activity involved in the photosynthetic metabolism, losses in efficiency occurring for the process as the concentration of inorganic carbon increases in the external environment.

The specific growth rate, μ , is a measure of how quickly a microbial population is growing. High values for μ are indicative of high microbial growth rates. It can be seen from the kinetic data for cell growth that the maximum specific growth rate varied between 0.072 and 0.816 day⁻¹. Nevertheless, it can also be seen that the conditions presenting the highest carbon dioxide removal rates did not correspond to the highest specific growth rate, suggesting the possibility of a displacement of the photosynthetic reaction by way of CO₂ conversion into extracellular biopolymers, not quantified in the biomass. Various authors [17–19] have shown the production of these compounds by microalgae and cyanobacteria, reporting that the synthesis of exocellular compounds was directly associated with the environmental conditions to which the microorganism was submitted. These studies cited the possibility of stimulating the production of extracellular polysaccharides by manipulating certain environmental variables, such as light intensity, temperature and availability of the nitrogen and carbon sources. De Philippis and Vincenzini [17] reported that metabolic stress conditions favoured the production of these compounds, thus justifying the fact that experiments with slow cell formation showed substantial carbon dioxide assimilation rates. In addition these authors reported that the accumulation of intracellular carbon reserves resulted in an increase in extracellular carbohydrates, suggesting that an increase in CO₂ concentration in the gases entering the system favoured the incorporation of carbon into compounds excreted into the culture medium. On the other hand, Lee et al. [20] reported that in this type of CO₂ sequestering system, a very small fraction of the carbon is converted into biomass, when compared to the precipitation of chemical species.

Response surface methodology was used to determine the operational conditions of the photobioreactor so as to optimise the rate of carbon dioxide removal from the aqueous phase of the system. Table 3 shows the codified matrix of the central composite design.

Table 3
Codified matrix for the effects of temperature, light intensity and CO₂ concentration on carbon dioxide removal

Experiment	Temperature	Light intensity	CO ₂ concentration	$-r_{\text{CO}_2}$ (mg L ⁻¹ min ⁻¹)
1	+1	-1	-1	18.59
2	+1	+1	-1	15.08
3	+1	+1	+1	47.70
4	+1	-1	+1	25.96
5	-1	-1	-1	7.20
6	-1	+1	-1	8.40
7	-1	-1	+1	60.18
8	-1	+1	+1	108.56
9	0	0	-1.68	1.50
10	0	0	+1.68	86.90
11	-1.68	0	0	27.30
12	+1.68	0	0	28.60
13	0	-1.68	0	19.80
14	0	+1.68	0	34.01
15	0	0	0	22.40
16	0	0	0	22.10
17	0	0	0	22.60

Table 4
Coefficients of the model estimated by linear regression

Factor	Effects	Standard error	<i>t</i> (2)	<i>p</i> -value	Coefficients	Estimates per interval	
						−95%	+95%
Mean	21.64	0.05	375.63	0.00000	21.64	21.39	21.89
X_1 (<i>L</i>)	−11.03	0.05	−203.82	0.00002	−5.51	−5.63	−5.39
X_1 (<i>Q</i>)	9.12	0.05	153.21	0.00004	4.56	4.43	4.69
X_2 (<i>L</i>)	11.50	0.05	212.63	0.00002	5.75	5.63	5.87
X_2 (<i>Q</i>)	11.03	0.05	185.26	0.00002	5.51	5.38	5.64
X_3 (<i>L</i>)	34.88	0.05	644.58	0.00000	17.44	17.32	17.55
X_3 (<i>Q</i>)	0.004	0.05	0.07	0.94415	0.002	−0.12	0.13
$X_1(L) \times X_2(L)$	−7.96	0.07	−112.60	0.00007	−3.98	−4.13	−3.82
$X_1(L) \times X_3(L)$	−28.41	0.07	−401.81	0.00000	−14.20	−14.35	−14.05
$X_2(L) \times X_3(L)$	17.98	0.07	254.31	0.00001	8.99	8.83	9.14

Table 4 shows the results for the effects and interactions between the factors of temperature, light intensity and carbon dioxide concentration, and also the coefficients of the model. An analysis of this table shows that in the range evaluated, the rate of carbon dioxide removal from the aqueous phase was controlled principally by the factors of carbon dioxide concentration (*L*) and by the interaction between the temperature and the CO₂ concentration (*L*). The other effects and interactions, with the exception of the factor $X_3(Q)$ showed a lower proportion of statistical significance.

Thus, Eq. (6) represents the statistical model for the variable response of rate of CO₂ removal:

$$Y = 21.64 - 5.51X_1 + 4.56X_1^2 + 5.75X_2 + 5.51X_2^2 + 17.44X_3 - 3.98X_1X_2 - 14.20X_1X_3 + 8.99X_2X_3 \quad (6)$$

The contour curves (Fig. 3) present the variation in the rate of CO₂ removal as a function of the factors studied. Thus, carbon dioxide removal from the liquid phase of the system is obtained by fixing the factors of light intensity and carbon dioxide concentration at the highest levels, that is, operating the photobioreactor at elevated light intensities and CO₂ concentrations, and fixing the temperature at the lower values.

The removal rates of the carbon dioxide dissolved in the aqueous phase of the photobioreactor varied between 1.50 and 108.56 mg L^{−1} min^{−1} for the different cultivation conditions. However, these removal rates do not represent the values corresponding exclusively to the biological assimilation of the carbon dioxide.

Various physicochemical and biological processes are involved in the removal of carbon dioxide from the liquid phase of the system. Due to the considerable reactivity of carbon dioxide in aqueous solutions, various equilibria are established. The first equilibrium refers to the dissolution of the gas in the water forming carbonic acid, which suffers almost instantaneous dissociation into bicarbonate and carbonate ions as a function of the pH of the culture medium, the total inorganic carbon concentration being given by the sum of the species CO₃^{2−}, HCO₃[−] and CO₂ [21]. Thus due to the equilibrium of the carbonate-bicarbonate buffer system, a fraction of the transferred carbon dioxide is transformed into these compounds during the chemical reactions. According to Marcus [22], the presence of calcium

in the culture medium sequesters the carbonate, leading to a consequent reduction in the proportion of free carbonate. Lee et al. [20] indicated that substantial amounts of carbon dioxide can be sequestered in culture media containing cyanobacteria by precipitating CaCO₃. These authors reported that the precipitation of these compounds catalysed by the growth and physiology of the cyanobacteria, represents a potential mechanism for fixing carbon dioxide by developing an alkaline environment in the culture medium.

In addition, the photosynthetic carboxylation catalysed by ribulose 1,5-diphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) specifically uses carbon dioxide as the substrate, generating phosphoglycerate. The photosynthetic rate of these organisms can be reduced and limited by the CO₂ supply, since the absence of mechanisms to pump CO₂ to the carboxylation sites may be responsible for the reduction in activity. However, there is evidence demonstrating that these organisms can maintain high levels of intracellular inorganic carbon by way of a biophysical carbon concentration mechanism (CCM) in which the active transport of bicarbonate ions through the plasmatic membrane into the cells occurs. The bicarbonate is converted into CO₂ by carbonic anhydrase, supplying the rubisco with this substrate [3]. Carbonic anhydrase is one of the most efficient enzymes known, its activity resulting in increases in the intracellular CO₂ concentrations of up to 1000 times the concentration in the external fluid. Thus, due to the permeability of the plasmatic membranes to CO₂, significant proportions can diffuse from the internal to the external medium. Tchernov et al. [23] experimentally demonstrated this effect, in which the cells, when photosynthetically activated, could be sources of CO₂ for the fluid around them. These fluxes are related to the photosynthetic activity and are connected to the conditions under which the microorganism is being cultivated [3]. According to Fridlyand et al. [16], quantitative models have been proposed to predict the losses and accumulation of CO₂ retained intracellularly by way of CCM. The model proposed by these authors consists of considering the cell of the cyanobacteria almost as a sphere, divided into six compartments in which the species of inorganic carbon present may react chemically, and diffuse through the membranes by way of inorganic carbon concentration gradients. This kinetic model considers the enzymatic mechanisms proposed by Michaelis and Menten, associated with the active transport

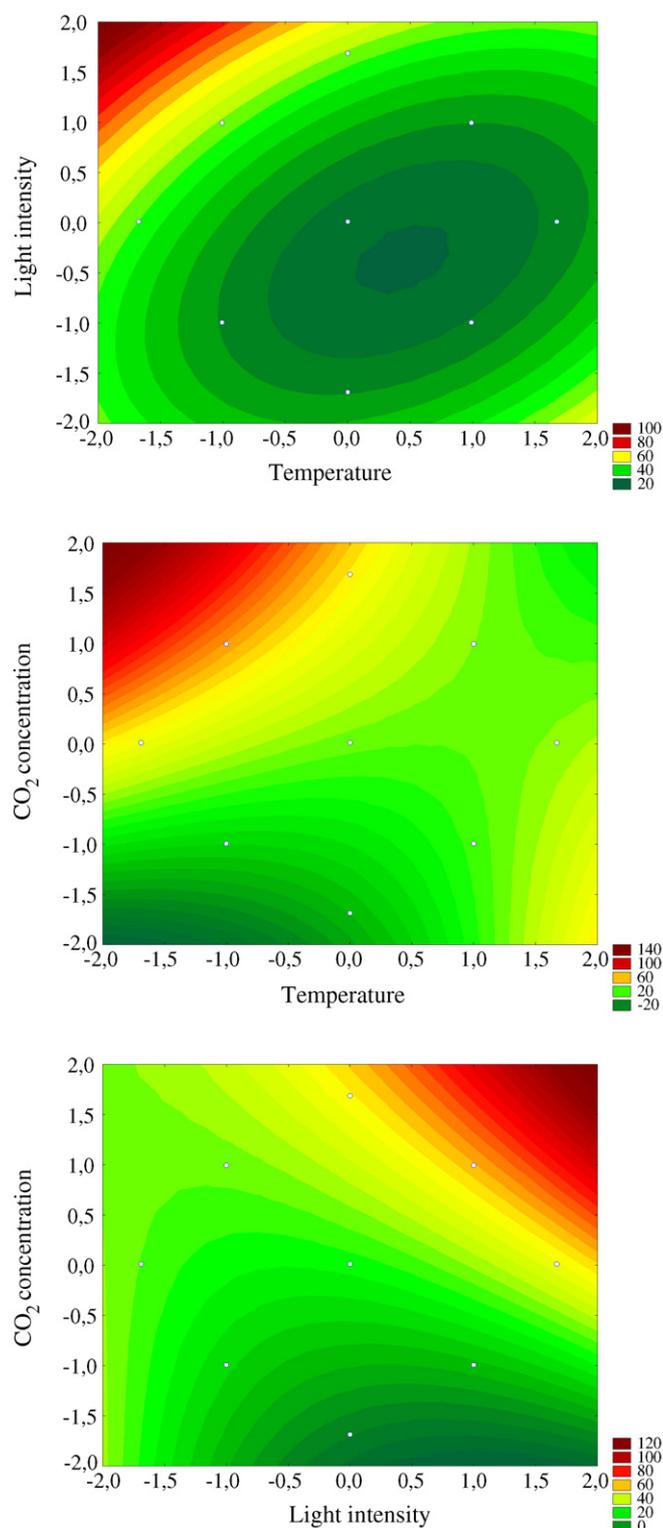


Fig. 3. Contour curves for the variable carbon dioxide removal rate.

mechanisms, diffusion equations, chemical equilibrium mechanisms and the geometric characteristics of the system, in which a group of differential equations are generated to represent the rates of alteration in the concentration of the species of inorganic carbon in the various cell compartments. In this way, this complex mechanism used by these microorganisms to retain the

distinct forms of inorganic carbon, could be associated with the high carbon dioxide removal rates from the liquid phase of the system. However, these rates do not correspond numerically to the proportion of carbon fixed biologically, since large amounts are being accumulated intracellularly for subsequent assimilation, resulting in overestimated fixation rates, due to the limits of the technique used.

In addition, Wendel and Juttner [24] and Muñoz et al. [25] reported the possibility of producing volatile organic compounds, VOCs, in photosynthetic cultures of microalgae and cyanobacteria, whose formation depended on the culture conditions and on the photosynthetic activity. According to these authors, these microorganisms are capable of forming and releasing substantial amounts of hydrocarbons and aldehydes with chains containing up to 10 carbon atoms.

On the other hand, other mechanisms, apart from the chemical and biological transformations of carbon dioxide, are involved in this type of system. According to Talbot and De La Noue [26], Bich et al. [27] and Queiroz et al. [28], the elevated efficiencies obtained in the removal of inorganic nutrients in intensive aeration systems using cyanobacteria, cannot be attributed exclusively to the biological conversion of these compounds. Other mechanisms such as adsorption, sedimentation and volatilisation are involved in the removal of these compounds. Lei et al. [29] demonstrated that the adsorption of aromatic poly-cyclical hydrocarbons onto the cells of different species of microalgae, had relevance in the removal rates of these compounds. Tang et al. [30] suggested that the ratio between the cell surface area and volume had an influence on the adsorption of nutrients from the culture medium. According to these authors, high area/volume ratios increase the compound adsorption capacity.

The validation of the statistical model, as defined by Eq. (6), was confirmed by an analysis of Table 5, which presents the analysis of variance to fit the data to the quadratic model.

The model was validated from the distribution of F, which suggested the existence of a quadratic relationship between the variables, indicating that the proposed model fitted the experimental data. The statistical model obtained explained a maximum of 99.99% of the variation.

These results reflect the need to fraction the different carbon dioxide conversion routes in the system, aiming to separately quantify the physicochemical and biological conversion rates for carbon sequestering. However, the different operational conditions evaluated allowed for an evaluation of the cultivation

Table 5
Analysis of variance for the fit of the model

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean squared	$F_{\text{calculated}}$
Regression	7928.82	9	880.98	3.4 ^a
Residues	1824.08	7	260.58	
Lack of fit	1824.06	5	364.81	
Pure error	0.020	2	0.010	
Total	9752.81	16		

^a Statistical significance ($\alpha = 0.05$).

parameters in the carbon dioxide transference, removal and assimilation processes by cyanobacteria.

5. Conclusions

The removal of carbon dioxide from mixtures of gases by washing with alkaline solutions is one of the gas absorption processes most widely used in the chemical industry. These processes consist of capturing the CO₂ in alkaline solutions by chemical reactions of the system CO₂–H₂O–OH[−]. Thus, sequestering CO₂ by way of the formation of carbonates and bicarbonates is limited by the concentration of OH[−] ions present in the aqueous phase of the reactors, caused by the establishment of chemical equilibrium. In photosynthetic reactors using microalgae, the alkaline environment is provided by the action of the microbial metabolism responsible for the transport of hydroxide ions to the outside of the cell using a reaction catalysed by the enzyme carbonic anhydrase, associated with the capture of H⁺ ions for the interior of the thylakoid membranes, resulting in the production of highly alkaline environments with consequently very efficient CO₂ fixation capacity. The advantage of biological processes is related to post-treatment questions, which are necessary and more complex in purely chemical systems, associated with the transformation of part of the carbon dioxide into biomass and soluble polymers in the culture medium, which can be recycled in different forms.

From the results obtained, it was possible to describe the removal of carbon dioxide in photobioreactors using a first order kinetic model. Response surface methodology was adequate to determine the effect of the operational parameters of the photobioreactor, expressed in terms of the temperature, light intensity and carbon dioxide concentration, on the CO₂ removal rates.

Acknowledgements

Funding for this research was provided by the FAPESP (Brazil) and Alfa Polylife (European Union). The authors are also grateful to Dr. M.I. Queiroz (FURG, Brazil) for providing the microalgae.

Appendix A. Nomenclature

β	parameters of the statistical model
μ_{\max}	maximum specific growth rate (day ^{−1})
[CO ₂]	carbon dioxide concentration (mg L ^{−1})
k	reaction rate constant (min ^{−1})
k_1	reaction rate constant for carbon dioxide absorption (min ^{−1})
k_2	reaction rate constant for carbon dioxide desorption (min ^{−1})
k_1/k_2	ratio between the rate constants for the absorption and desorption of CO ₂
k_R	resulting rate constant of the reaction (min ^{−1})
n	reaction order
r_{CO_2}	rate of carbon dioxide removal (mg L ^{−1} min ^{−1})

R^2	coefficient of determination
t	residence time (min)
X_1, X_2, X_3	independent variables of the statistical model
Y	variable response

References

- [1] D.A. Bryant, N.U. Frigaard, Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated, *Trends Microbiol.* 14 (2006) 488–496.
- [2] K.O. Buesseler, C.H. Lamborg, P.W. Boyd, P.J. Lam, T.W. Trull, R.R. Bidigare, J.K.B. Bishop, C.F. Dehairs, M. Elskens, M. Honda, D.A. Karl, D. Siegel, M.W. Silver, D.K. Steinberg, J. Valdes, V.M. Mooy, S. Wilson, Revisiting carbon flux through the ocean's twilight zone, *Science* 316 (2007) 567–570.
- [3] P.G. Falkowski, Photosynthesis: the paradox of carbon dioxide efflux, *Curr. Biol.* 7 (1997) 637–639.
- [4] M. Cuaresma, I. Garbayo, J.M. Vega, C. Vílchez, Growth and photosynthetic utilization of inorganic carbon of the microalga *Chlamydomonas acidophila* isolated from Tinto river, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2006) 158–162.
- [5] L. Cheng, L. Zhang, H. Chen, C. Gao, Carbon dioxide removal from air by microalgae cultured in a membrane-photobioreactor, *Sep. Purif. Technol.* 50 (2006) 324–329.
- [6] E. Molina Grima, F.G.A. Fernández, F.G. Camacho, Y. Chisti, Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scale up, *J. Biotechnol.* 70 (1999) 231–247.
- [7] E. Ono, J.L. Cuello, Carbon dioxide mitigation using thermophilic cyanobacteria, *Biosyst. Eng.* 96 (2007) 129–134.
- [8] H.Y. Lin, J.Y. Leu, C.R. Lan, P. Lin, F. Chang, Kinetics of inorganic carbon utilization by microalgal biofilm in a flat plate photoreactor, *Chemosphere* 53 (2003) 779–787.
- [9] I. Eroglu, K. Aslan, U. Gündüz, M. Yücel, L. Türker, Substrate consumption rates for hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides* in a column photobioreactor, *J. Biotechnol.* 70 (1999) 103–113.
- [10] J. Beltran-Heredia, J. Torregrosa, R. Dominguez, J. Garcia, Treatment of black-olive wastewaters by ozonation and aerobic biological degradation, *Water Res.* 34 (2000) 3515–3522.
- [11] R. Rippka, J. Deruelles, J.B. Waterbury, M. Herdman, R.Y. Stanier, Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria, *J. Gen. Microbiol.* 111 (1979) 1–61.
- [12] G.E.P. Box, W.G. Hunter, J.S. Hunter, *Statistics for Experiments*, John Wiley and Sons, New York, 1978.
- [13] *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA), 20th ed., American Public Health Association, D.C., 1998.
- [14] M. Berenguel, F. Rodriguez, F.G. Acién, J.L. Garcia, Model predictive control of pH in tubular photobioreactors, *J. Process Control* 14 (2004) 377–387.
- [15] S.R. Chae, E.J. Hwang, H.S. Shin, Single cell protein production of *Euglena gracilis* and carbon dioxide fixation in an innovative photo-bioreactor, *Bioresource Technol.* 97 (2006) 322–329.
- [16] L. Fridlyand, A. Kaplan, L. Reinhold, Quantitative evaluation of the role of a putative CO₂-scavenging entity in the cyanobacterial CO₂-concentrating mechanism, *BioSystems* 37 (1996) 229–238.
- [17] R. De Philippis, M. Vincenzini, Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications, *FEMS Microbiol. Rev.* 22 (1998) 151–175.
- [18] A. Otero, M. Vincenzini, Extracellular polysaccharide synthesis by *Nostoc* strains as affected by N source and light intensity, *J. Biotechnol.* 102 (2003) 143–152.
- [19] A. Parikh, D. Madamwar, Partial characterization of extracellular polysaccharides from cyanobacteria, *Bioresource Technol.* 97 (2006) 1822–1827.
- [20] B.D. Lee, W.A. Apel, M.R. Walton, Calcium carbonate formation by *Synechococcus* sp. strain PCC 8806 and *Synechococcus* sp. strain PCC 8807, *Bioresource Technol.* 97 (2006) 2427–2434.
- [21] G.L. Rorrer, R.K. Mullikin, Modeling and simulation of a tubular recycle photobioreactor for macroalgal cell suspension cultures, *Chem. Eng. Sci.* 54 (1999) 3153–3162.

- [22] Y. Marcus, Distribution of inorganic carbon among its component species in cyanobacteria: do cyanobacteria in fact actively accumulate inorganic carbon? *J. Theor. Biol.* 185 (1997) 31–45.
- [23] D. Tchernov, M. Hassidim, B. Luz, A. Sukenik, L. Reinhold, A. Kaplan, Sustained net CO₂ evolution during photosynthesis by marine microorganism, *Curr. Biol.* 7 (1997) 723–728.
- [24] T. Wendel, F. Juttner, Lipoyxygenase-mediated formation of hydrocarbons and unsaturated aldehydes in freshwater diatoms, *Phytochemistry* 41 (1996) 1445–1449.
- [25] J. Muñoz, S.M. Mudge, A. Sandoval, Effects of ionic strength on the production of short chain volatile hydrocarbons by *Dunaliella salina* (Teodoresco), *Chemosphere* 54 (2004) 1267–1271.
- [26] P. Talbot, J. De La Noue, Tertiary treatment of wastewater with *Phormidium bonheri* (Schmidle) under various light and temperature conditions, *Water Res.* 27 (1993) 153–159.
- [27] N.N. Bich, M.I. Yaziz, N. Kakti, Combination of *Chlorella vulgaris* and *Andichhormia crassipes* for wastewater nitrogen removal, *Water Res.* 33 (1999) 2357–2362.
- [28] M.I. Queiroz, E. Jacob-Lopes, L.Q. Zepka, R. Bastos, R. Goldbeck, The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor, *Bioresource Technol.* 98 (2007) 2163–2169.
- [29] A.P. Lei, Z.L. Hu, Y.S. Wong, N.F.Y. Tam, Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species, *Bioresource Technol.* 98 (2007) 273–280.
- [30] J.X. Tang, D.D. Hoagland, B.D. Siegeried, Uptake and bioconcentration of atrazine by selected freshwater algae, *Environ. Toxicol. Chem.* 17 (1998) 1085–1090.



Biomass production and carbon dioxide fixation by *Aphanothece microscopica Nægeli* in a bubble column photobioreactor

Eduardo Jacob-Lopes, Lucy Mara Cacia Ferreira Lacerda, Telma Teixeira Franco*

School of Chemical Engineering, State University of Campinas, UNICAMP, P.O. Box 6066, 13083-970, Campinas-SP, Brazil

Received 2 March 2007; received in revised form 29 October 2007; accepted 18 November 2007

Abstract

The objective of the present study was to evaluate the growth kinetics of *Aphanothece microscopica Nægeli* under different conditions of temperature, light intensity and CO₂ concentration. The growth kinetics of the microorganism and carbon biofixation were evaluated using a central composite design, considering five different temperature levels (21.5, 25, 30, 35 and 38.5 °C), light intensities (0.96, 3, 6, 9 and 11 klux) and carbon dioxide concentrations (3, 15, 25, 50 and 62%). The results obtained showed the effects of temperature, light intensity and CO₂ concentration ($p < 0.05$) on the photosynthetic metabolism of the microorganism. Response surface methodology was adequate for process optimisation, providing a carbon fixation rate to the order of 109.2 mg L⁻¹ h⁻¹ under conditions of 11 klux, 35 °C and 15% carbon dioxide, representing an increase of 58.1% as compared to the conditions tested initially.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Carbon dioxide sequestration; Photobioreactor; Cyanobacteria

1. Introduction

Innumerable research projects have suggested that the biofixation of CO₂ by cyanobacteria in photobioreactors is a sustainable strategy, since carbon dioxide can be incorporated into the molecular structure of cells in the form of proteins, carbohydrates and lipids by way of photosynthetic reactions. The advantages of these processes are related to the greater photosynthetic efficiency of these systems when compared to higher plants, the resistance of these microorganisms to high carbon dioxide concentrations and the possibility of controlling the culture growth conditions. In addition, the biomass produced by the bioconversion of carbon dioxide allows one to obtain products of high added value, such as, fatty acids, biodiesel, biogas and organic fertilizers, as a function of the microalgal species used and the effluent to be treated [1–3].

According to Lee et al. [4] and Jacob-Lopes et al. [5], only a small fraction of the carbon dioxide injected into the photobioreactors is incorporated into the microalgal biomass. According to these authors, other products of photosynthetic metabolism, such as the formation of extracellular biopolymers, precipitates of chemical species such as carbonates and bicarbonates and

volatile organic compounds (VOCs), are more highly represented in the carbon dioxide transformation processes of these systems, substantially increasing the fixation rates.

Aphanothece microscopica Nægeli is a cyanobacterium characteristic of the estuaries in southern Brazil, belonging to the family *chroococaceae* and forming blue-green colonies adapted for floating. It shows a macroscopic, amorphous structure with abundant, firm and rigid mucilage, and non-cylindrical elliptical adult cells measuring 9.0–9.5 μm × 4.0–4.2 μm, approximately 2.2 times longer than they are wider [6]. Previous studies have shown the potential of applying this microorganism in bioremediation and for the production of single-cell protein (SCP) [7–9].

Thus the objective of the present study was to evaluate distinct operational conditions for photobioreactors, expressed in terms of the temperature, light intensity and carbon dioxide concentration, aimed at maximizing carbon fixation in the cells of the cyanobacterium *Aphanothece microscopica Nægeli*.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism and culture medium

Unialgal cultures of *Aphanothece microscopica Nægeli* (RSM92) were originally isolated from the Patos Lagoon

* Corresponding author.

E-mail address: franco@feq.unicamp.br (T.T. Franco).

Nomenclature

C_c	percent carbon in the biomass (%)
(L)	linear effect
M_{CO_2}	molecular weight of CO_2
M_C	molecular weight of carbon
(Q)	quadratic effect
R^2	coefficient of determination
R_C	carbon fixation rate ($mg\ L^{-1}\ h^{-1}$)
t	residence time in $t=n$ (h)
t_0	residence time in $t=0$ (h)
t_g	generation time (h)
t_{log}	duration of logarithmic growth phase (h)
X_m	maximum cell concentration ($mg\ L^{-1}$)
X_0	initial cell concentration ($mg\ L^{-1}$)
X_1, X_2, X_3	independent variables of the statistical model
Y	variable response

Greek letters

β	parameters of the statistical model
μ_{max}	maximum specific growth rate (h^{-1})

ammonium and iron citrate ($0.006\ g\ L^{-1}$), pH 8.0. The conditions used were $25\ ^\circ C$, 1 klux of light intensity and a photoperiod of 12 h.

2.2. Photobioreactor

The diagram of the experimental apparatus used in this study is shown in Fig. 1. Measurements were made in a bubble column photobioreactor. The system was built in 4 mm thick glass, an internal diameter of 7.5 cm, height of 75 cm and nominal working volume of 3.0L. The dispersion system for the reactor consisted of a 1.5 cm diameter air diffuser located in the centre of the column. The reactor was continuously illuminated with sixteen 20 W fluorescent lamps connected in parallel, located in a photoperiod chamber. Different numbers of lamps on each side of the photoperiod chamber were combined to give the desired light intensity. Airflow into the photobioreactor was provided via filtered air and pure CO_2 cylinder through Teflon tubing. The CO_2 /air mixture was adjusted to achieve the desired concentration of carbon dioxide in the airstream, through three rotameters that measured the flow rates of the carbon dioxide, the air and the mixture of gases, respectively.

2.3. Obtaining and analysis of the kinetic data in an experimental photobioreactor

The experiments were carried out in bioreactors operating with an intermittent regime, fed on 3.0L synthetic BGN medium. The test conditions were: initial cell concentration of $100\ mg\ L^{-1}$, isothermal reactor operating under different temperatures and light intensities and continuous aeration of

estuary, Rio Grande do Sul State, Brazil ($32^\circ 01'S-52^\circ 05'W$). Stock cultures were propagated and maintained on synthetic BGN medium [10] with the following composition: $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ($0.040\ g\ L^{-1}$), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ($0.075\ g\ L^{-1}$), EDTA ($0.001\ g\ L^{-1}$), H_3BO_3 ($2.860\ g\ L^{-1}$), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ($1.810\ g\ L^{-1}$), $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ($0.222\ g\ L^{-1}$), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ($0.390\ g\ L^{-1}$), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ($0.079\ g\ L^{-1}$), $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ ($0.040\ g\ L^{-1}$), $NaNO_3$ ($150\ g\ L^{-1}$) $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ ($0.006\ g\ L^{-1}$),

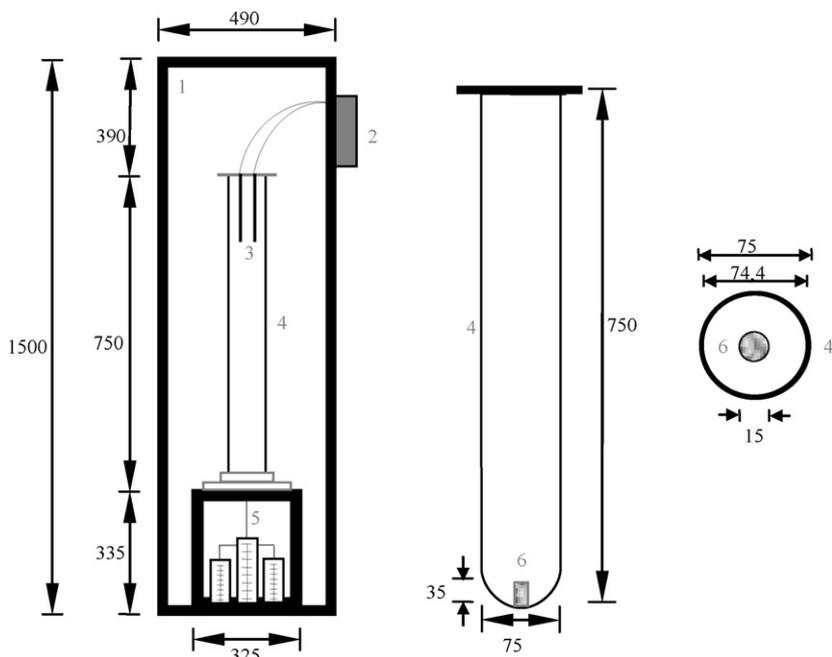


Fig. 1. Photobioreactor diagram. 1: Photoperiod chamber; 2: pH, temperature and CO_2 analyser; 3: pH, temperature and CO_2 sensors; 4: photobioreactor; 5: system controlling the flow rate and mixture of the gases; 6: gas diffuser. All dimensions in mm.

Table 1
Values of the independent variables for the different levels of the design

Independent variable	Symbol	Level				
		-1.68	-1	0	1	+1.68
Temperature (°C)	X_1	21.5	25	30	35	38.5
Light intensity (klux)	X_2	0.96	3	6	9	11
CO ₂ concentration (%)	X_3	3	15	25	50	62

3 L min⁻¹ of air supplemented with CO₂. The cell concentration was monitored every 12 h during the microbial growth phases. Residence times of up to 156 h were considered for all the experiments.

Response surface methodology was used to determine the optimal conditions for carbon fixation as a function of three experimental factors (temperature, light intensity and concentration of carbon dioxide enriched air). This methodology is widely used for controlling the effects of parameters in many processes. Its usage decreases the number of experiments, reducing time and material resources. Furthermore, the analysis performed on the results is easily carried out and experimental errors are minimized. The statistical method measures the effects of changes in operating variables and their mutual interactions on the process by way of an experimental design. The three steps used in the experimental design included statistical design experiments, estimation of coefficient using a mathematical model and an analysis of model applicability [11].

A five level, central composite design was used to evaluate the relationship between the culture conditions (independent variables) and the carbon fixation rate (dependent variable). Three replicates at the central point were used to estimate the experimental error.

The experimental design and the statistical analyses were carried out using the Statistica 7.0 software (Statsoft, USA). Table 1 shows the levels of the experimental variables used:

For a 3-factor system, the statistical model is defined by Eq. (1):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (1)$$

The process was optimised from an analysis of the experimental design initially proposed, carried out in triplicate.

The calculated cell biomass values were used to calculate the maximum cell concentration (X_m , mg L⁻¹), maximum specific growth rate (μ_{max} , h⁻¹) and generation time (t_g , h). The carbon fixation rate was calculated from the elemental analysis of the biomass, as shown in Eq. (2) [12]:

$$R_C = C_c \times \left(\frac{X_m - X_0}{t - t_0} \right) \times \left(\frac{M_{CO_2}}{M_c} \right) \quad (2)$$

2.4. Analytical methods

The cell concentration was evaluated gravimetrically by filtering a known volume of culture medium through a 0.45 μm filter and drying at 60 °C for 24 h. The measurements of light intensity incident on the reactor were carried out on the external column surface using a digital luximeter (Minipa MLM 1010). The temperature was controlled using thermostats, and measured using a polarographic sensor (Mettler Toledo InPro5000 series). The flow rates of the carbon dioxide, air and CO₂ enriched air were determined using rotameters (AFSG 100 Key Instruments). The elemental composition of the *Aphanothece microscopica* Nägeli cells was determined using a Perkin Elmer 2400 CHNS/O element analyser. Two-milligram samples of biomass were oxidised at 1000 °C and the resulting gases were determined using a thermal conductivity probe for carbon, nitrogen and hydrogen. The standard used was acetanilide, with a composition of 71.09% carbon, 11.84% oxygen, 6.71% hydrogen and 10.36% nitrogen.

Table 2
Kinetic parameters for *Aphanothece microscopica* Nägeli

Condition				Kinetic parameter			
X_1 (°C)	X_2 (klux)	X_3 (%)	μ_{max} (h ⁻¹)	R^2	t_g (h)	t_{log} (h)	X_m (mg L ⁻¹)
35.0	3	15	0.027	0.99	25.67	60	1672
35.0	9	15	0.034	0.94	20.38	72	3000
35.0	9	50	0.025	0.97	27.72	72	600
35.0	3	50	0.022	0.99	31.50	72	500
25.0	3	15	0.010	0.97	69.31	36	270
25.0	9	15	0.013	0.90	53.31	108	455
25.0	3	50	0.023	0.98	30.13	108	600
25.0	9	50	0.023	0.98	30.13	96	905
21.5	6	25	0.024	0.99	28.88	84	730
38.5	6	25	0.003	0.98	231.1	36	230
30.0	11	25	0.030	0.98	23.10	72	2300
30.0	0.96	25	0.008	0.94	86.64	72	360
30.0	6	62	0.023	0.98	30.13	72	1135
30.0	6	3	0.021	0.97	33.01	48	1600
30.0	6	25	0.028	0.99	24.75	108	1760

3. Results and discussion

3.1. Preliminary tests

Fig. 2 shows representative growth curves for the cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli under the different photosynthetic culture conditions. A comparison of the growth curves shows the lack of an adaptation phase for this microorganism, reaching the logarithmic growth phase as from 12 h of cultivation, followed by a stationary phase, and, under some conditions, a declining phase. According to Guerrero et al. [13], the absence of an adaptation phase in microalgal growth curves

is characteristic of culture media with high carbon and inorganic nutrient availability. For all the cultures, after a maximum residence time of 5 days, the growth curves already indicated characteristics of the stationary phase, the maximum cell densities being obtained in this period. Similar results were obtained by Yue and Chen [14] and Hsueh et al. [15] in the photosynthetic cultivation of the microalgae *Chlorella* ZY-1 and *Nannochloopsis oculata*, obtaining positive growth rates in residence times below 120 h.

Table 2 shows the growth kinetics of *Aphanothece microscopica* Nägeli. An analysis of these results shows that the maximum specific growth rates were obtained at 35 °C, 9 klux and 15%

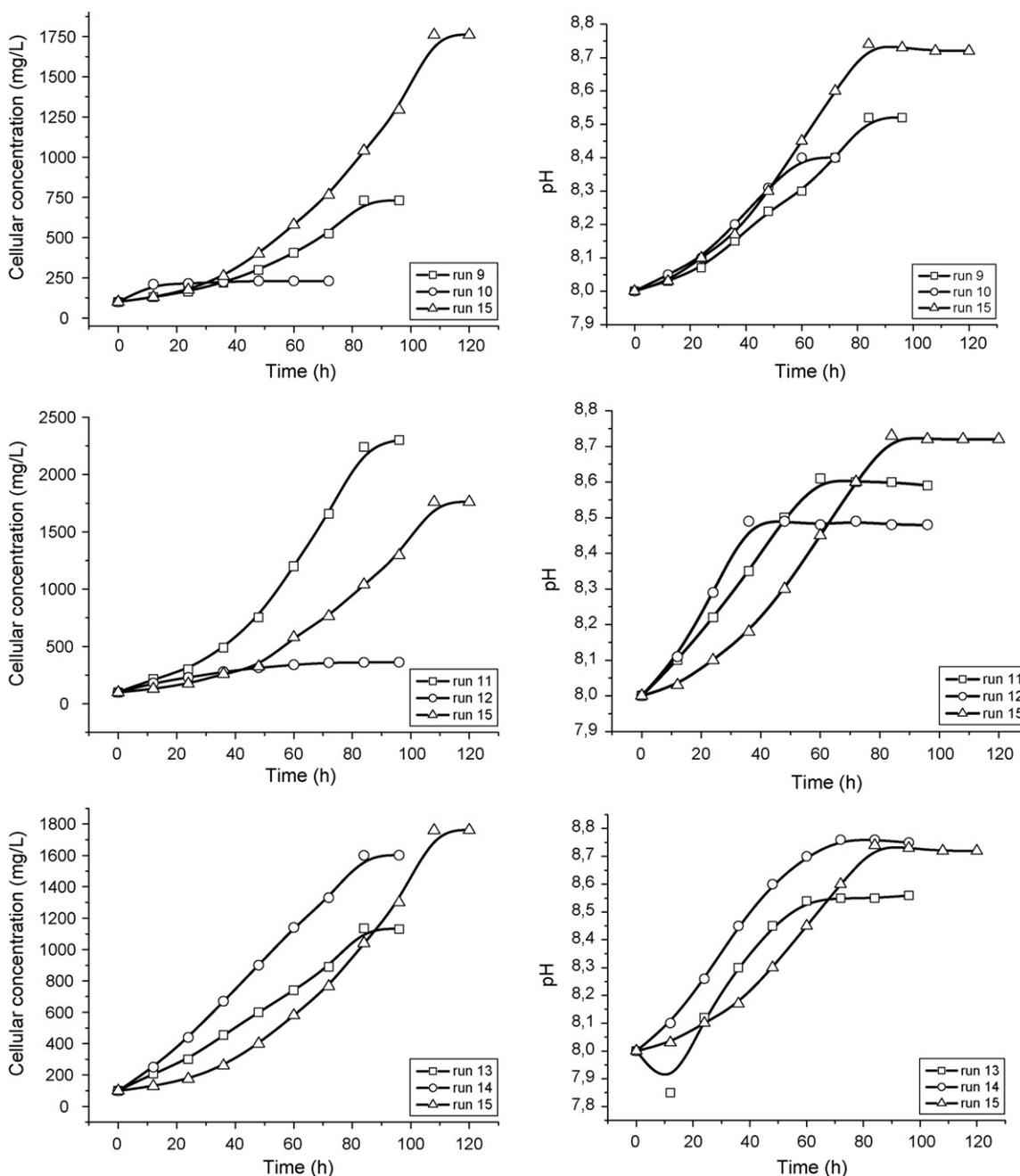


Fig. 2. Representative growth and pH curves as a function of temperature, light intensity and CO₂ concentration. Effect of temperature (run 9, 10 and 15); Effect of light intensity (run 11, 12 and 15) and effect of carbon dioxide concentration (run 13, 14 and 15).

CO₂, not differing significantly, according to the Tukey test ($p < 0.05$), from the cultures grown at 30 °C, 11 klux and 25% CO₂. The maximum values obtained for μ_{\max} were similar to those obtained by other authors for the species *Euglena gracilis* and *Anabaena variabilis*, cultivated using photosynthetic metabolism [16,17]. However the maximum concentration of carbon dioxide enrichment used for these cultures was 13% (v/v), suggesting that the *Aphanothece microscopica Nægeli* is more tolerant to gases enriched with high levels of CO₂, since high growth rates were obtained with up to 62% (v/v) of carbon dioxide. With respect to the generation times, a variation between 23.1 and 231.1 h was observed, as a function of the different cultivation conditions, indicating a dependence of cell growth on the conditions of temperature, light intensity and concentration of carbon dioxide enriched air in the operation of the photobioreactor. The logarithmic growth phases, determined by linear regression of the data, indicated exponential growth between 35 and 108 h. The maximum cell density of 3.0 g L⁻¹, was obtained by cultivating in air enriched with 15% carbon dioxide at a temperature of 35 °C, with a light intensity of 9 klux. Of the conditions evaluated, the results suggest these experimental conditions as the most adequate to produce biomass by the cyanobacterium *Aphanothece microscopica Nægeli*.

Cell growth associated with carbon dioxide assimilation from the medium coincided with an increase in pH values. Fig. 2 shows the representative variation in pH of the culture medium as a function of residence time. The pH range observed in the culture medium varied from 6.0 to 9.9, indicating that the species HCO₃⁻ was the predominant form of carbon in the cultures.

The gradual increase in pH of the culture media, independent of the conditions, indicated that cultivation occurred in an alkaline pH range. Reductions in the initial pH value of the culture medium were only observed when cultivated with carbon dioxide concentrations equal or greater than 50%. On the other hand, the highest pH values (9.9) were found for the cultures

with the highest cell densities (3.0 g L⁻¹), suggesting predominance of the photosynthetic metabolism of the microorganism under the experimental conditions used. According to Arnon [18] and Zuber [19], the increase in pH in photosynthetic cultures is an indication of the consumption of inorganic carbon due to cell growth. These authors reported that the increment in pH in the culture medium could be attributed to two main mechanisms: firstly the transport of hydroxide ions to outside the cell occurs by way of a reaction catalysed by the enzyme carbon anhydrase during the conversion of bicarbonate ions inside the cell to provide CO₂ for the photosynthetic reaction, raising the pH of the culture medium. A second potential mechanism would be the increase in pH due to activity of the enzyme ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase, whose activity is considerably dependent on pH, increasing with increase in pH. This enzyme is present in the photosynthetic apparatus of the cyanobacteria, where the H⁺ ions are sequestered to the inside of the thylacoid membrane with a simultaneous transfer of Mg²⁺ to the environment. These light energy induced fluxes result in an increase in pH and in the Mg²⁺ concentration, activating the RubisCO enzyme and resulting in efficient carbon dioxide fixation.

An analysis of the elements in the *Aphanothece microscopica Nægeli* cells at the end of cultivation showed that 1 g of biomass could contain between 0.48 and 0.52 g of carbon as a function of the cultivation conditions used. These values were used to estimate the carbon fixation rates (Table 3).

Table 4 shows the results for the effects of and the interactions between the factors of temperature, light intensity and carbon dioxide concentration, as also the coefficients of the model. An analysis of this table shows that in the range evaluated, the carbon fixation rate was controlled by the factors of light intensity (L), temperature (Q), interaction between temperature (L) and carbon dioxide concentration (L), and by the carbon dioxide concentration (L), in this order of importance. The other factors and interactions showed a lower proportion of statistical importance.

Table 3
Coded matrix of the effects of temperature, light intensity and CO₂ concentration on the carbon fixation rate

Run	Temperature (X ₁)	Light intensity (X ₂)	CO ₂ (X ₃)	R _C (mg L ⁻¹ h ⁻¹)
1	+1	-1	-1	24.80
2	+1	+1	-1	45.78
3	+1	+1	+1	11.84
4	+1	-1	+1	11.36
5	-1	-1	-1	3.45
6	-1	+1	-1	6.30
7	-1	-1	+1	8.88
8	-1	+1	+1	16.30
9	-1.68	0	0	12.78
10	+1.68	0	0	4.61
11	0	+1.68	0	39.07
12	0	-1.68	0	6.15
13	0	0	+1.68	21.01
14	0	0	-1.68	30.44
15	0	0	0	26.20
16	0	0	0	25.96
17	0	0	0	26.04

Table 4
Coefficients of the model estimated by linear regression

Factor	Effects	Standard error	t(2)	p	Coefficients	Estimates per interval	
						–95%	+95%
Mean	26.22	0.07	372.47	0.00000	26.22	25.92	26.53
X ₁ (L)	6.60	0.06	99.88	0.00010	3.30	3.16	3.44
X ₁ (Q)	–13.39	0.07	–183.95	0.00003	–6.69	–6.85	–6.53
X ₂ (L)	12.75	0.06	192.85	0.00002	6.37	6.23	6.51
X ₂ (Q)	–3.55	0.07	–48.78	0.00042	–1.77	–1.93	–1.61
X ₃ (L)	–7.00	0.06	–105.86	0.00008	–3.50	–3.64	–3.35
X ₃ (Q)	–1.34	0.07	–18.52	0.00290	–0.67	–0.83	–0.51
X ₁ (L) × X ₂ (L)	2.79	0.08	32.37	0.00095	1.39	1.21	1.58
X ₁ (L) × X ₃ (L)	–15.70	0.08	–181.72	0.00003	–7.85	–8.03	–7.66
X ₂ (L) × X ₃ (L)	–3.98	0.08	–46.08	0.00047	–1.99	–2.17	–1.80

Eq. (3) represents the statistical model for the variable response carbon fixation rate:

$$Y = 26.2 + 3.3X_1 - 6.7X_1^2 + 6.4X_2 - 1.77X_2^2 - 3.5X_3 - 0.67X_3^2 + 1.4X_1X_2 - 7.85X_1X_3 - 2.0X_2X_3 \quad (3)$$

Contour curves (Fig. 3) show the variation in the carbon fixation rate as a function of the factors studied. Thus an increase in carbon fixation rate is obtained not only by fixing the light intensity at the highest level, that is, carrying out the cultivation under high light intensities, but also by fixing the temperature in the central region and the carbon dioxide concentration at the lowest level (reduced proportions of CO₂ enrichment in the air entering the photobioreactor).

The carbon fixation rate varied from 3.45 to 45.78 mg L^{–1} h^{–1} under the different culture conditions. These results are higher than those obtained by Kajiwara et al. [12] when cultivating the cyanobacterium *Synechoccus* (PCC 7942) in photobioreactors at 30 °C with 8 klux and air enriched with carbon dioxide at 5%, obtaining maximum carbon fixation rates to the order of 25 mg L^{–1} h^{–1} and Yun et al. [20], who obtained rates of 23.4 mg L^{–1} h^{–1} for the microalga *Chlorella vulgaris* (UTEX 259) under conditions of 27 °C, 15% of CO₂ and 110 μE m^{–2} s^{–1}.

These results reflect the adaptation of the microorganism under study to the experimental conditions, suggesting the importance of optimising the photobioreactor operational conditions in order to obtain higher rates of biological carbon fixation.

Different authors have reported the importance of the environmental conditions on the growth of cyanobacteria.

Parameters such as temperature, light intensity, pH and carbon dioxide concentration have been indicated as being of fundamental importance in the development of these microorganisms [21]. Thus it was shown that cultivation conditions in the temperature range from 30 to 35 °C, with 9–11 klux and 15–25% CO₂, favoured cell growth, associated with carbon fixation. These results agreed with those of Munoz and Guieysse [22], who reported that the efficiency of systems using microalgae normally decreased at low and higher temperatures, justifying the low cell performance of the cultures incubated at 21.5 and 38.5 °C, when compared to those incubated at 30 °C under the same conditions of light intensity and CO₂ concentration. According to Grossman et al. [23], the optimum temperature range for the development of cyanobacteria is from 25 to 35 °C.

With respect to light intensity, it was shown that the maximum intensity used was insufficient to promote the phenomenon of cell photoinhibition, since even at 11 klux high growth rates were recorded. On the other hand, at 0.96 klux there was a pronounced reduction in cell growth, suggesting limitation of the energy required for the sequence of photosynthetic reactions that would result in carbon fixation under these conditions.

The effect of different carbon dioxide concentrations in the gases entering the photobioreactor was analysed by Yue and Chen [14], who found photosynthetic activity for concentrations of up to 70% (v/v) enrichment of the air with CO₂, which is usually the main source of carbon in photosynthetic cultures of cyanobacteria. According to Cuaresma et al. [24], the way in which cyanobacteria adapt themselves to use CO₂ as the carbon source is related to the carbon concentration mechanisms (CCM). The photosynthetic mechanism developed

Table 5
Analysis of variance (ANOVA) for the quadratic model

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean squared	F _{calculated}
Regression	1938.8	9	215.42	2.83 ^a
Residues	532.66	7	76.09	
Lack of fit	532.63	5	106.52	
Pure error	0.03	2	0.015	
Total	2741.44	16		

^a Statistical significance (p < 0.1).

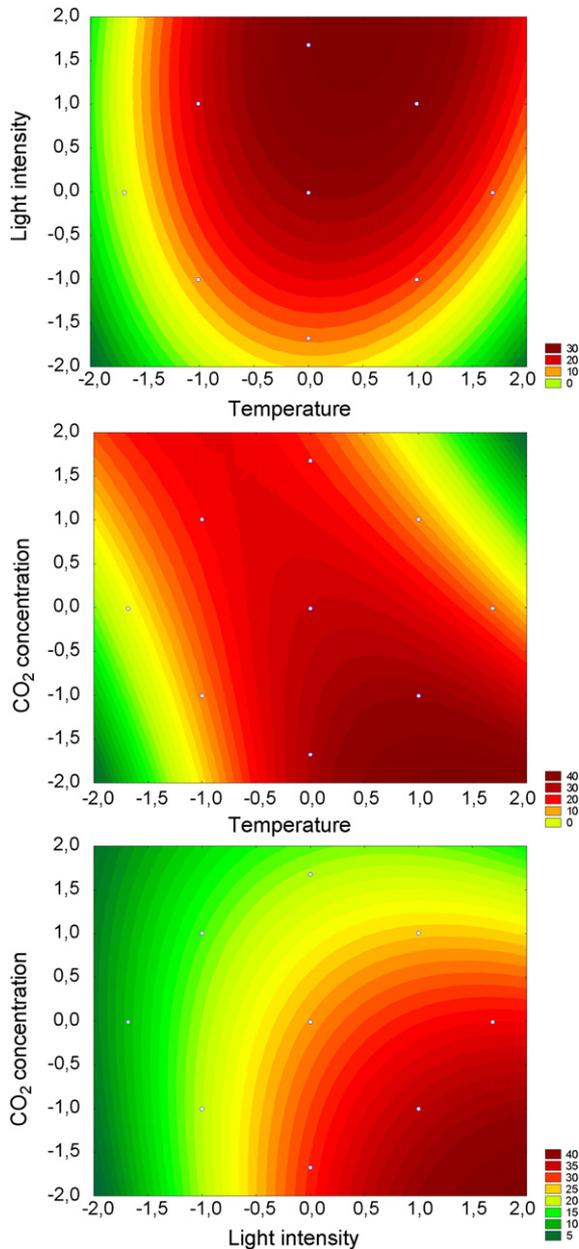


Fig. 3. Contour curves for the variable carbon fixation rate.

by these organisms allowed for the transport of free CO₂ and of bicarbonate ions through a fine plasmatic membrane, being accumulated in the cell as a carbon reservoir, making it possible to assimilate inorganic carbon in the form of bicarbonate or free carbon dioxide. With respect to cell growth and carbon fixation rate, the best results were obtained with air enriched with 15% CO₂, reduced efficiency of the photobioreactor being observed with flow rates below or above 0.45 L_{CO₂} min⁻¹.

The model was validated from the *F* distribution (Table 5), which suggested the existence of a quadratic relationship between the variables, indicating that the proposed model fitted the experimental data. The statistical model obtained explained a maximum of 99.99% of the variation.

Table 6
Kinetic parameters for process optimization

Kinetic variable	Value ^a
μ_{\max} (h ⁻¹)	0.04
t_g (h)	17.3
t_{\log} (h)	120
X_m (mg L ⁻¹)	5100
R_C (mg L ⁻¹ h ⁻¹)	109.2

^a Mean of three replicates are shown.

3.2. Process optimisation

As from the statistical model and an analysis of the contour diagrams, which suggested a displacement of the operational conditions to the region of high light intensities (11 klux), maintaining the conditions of temperature at 35 °C and injection of air enriched with 15% CO₂, cultures were carried out under these conditions in order to optimise the fixation of carbon by the cyanobacterium *Aphanothece microscopica Nageli*. Table 6 shows the kinetic parameters obtained for the process under these conditions. A significant increase in the kinetic variables of growth and carbon fixation was observed, obtaining carbon fixation rates 58.1% higher than those obtained under the best conditions initially evaluated (9 klux, 35 °C, 15% of CO₂), showing the importance of the factors studied and the adjustment of the methodology used.

4. Conclusions

The carbon dioxide concentration, temperature and light intensity are determinant factors in the carbon fixation process by the cyanobacterium *Aphanothece microscopica Nageli*.

Under operational conditions of 11 klux, 35 °C and 15% CO₂, the microorganism performed better, obtained maximum specific growth rates and carbon fixation rates of 0.04 h⁻¹ and 109.2 mg L⁻¹ h⁻¹, respectively.

Response surface methodology was adequate to determine the effects of the factors and optimise the process.

Thus the results obtained in the present study suggest the potential of applying this type of process to obtain carbon credits. Nevertheless one must remember that the definition of the ideal process conditions only helps in terms of the magnitude of the variables involved in the system, with the objective of applying the process under complex real conditions. In addition, the carbon fixed in the biomass only represents a fraction of the total carbon dioxide transformed by the system.

Acknowledgements

Funding for this research was provided by the Fundaao de Amparo a Pesquisa no Estado de Sao Paulo – FAPESP (Brazil) and by the ALFA Programme, II-0259-FA-FC - POLYLIFE (European Union). The authors are grateful to Dra. Maria Isabel Queiroz (Fundacao Universidade Federal do Rio Grande) for providing the microalgal cultures.

References

- [1] H. Yamada, N. Ohkuni, S. Kajiwara, K. Ohtaguchi, CO₂-removal characteristics of *Anacystis nidulans* R2 in airlift bioreactors, *Energy* 22 (1997) 349–352.
- [2] H.W. Yen, D.E. Brune, Anaerobic co-digestion of algal sludge and waste paper to produce methane, *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 130–134.
- [3] Y. Chisti, Biodiesel from microalgae, *Biotechnol. Adv.* 25 (2007) 294–306.
- [4] B.D. Lee, W.A. Apel, M.R. Walton, Calcium carbonate formation by *Synechococcus* sp. strain PCC 8806 and *Synechococcus* sp. strain PCC 8807, *Bioresour. Technol.* 97 (2006) 2427–2434.
- [5] E. Jacob-Lopes, C.H.G. Scoparo, T.T. Franco, Rates of CO₂ removal by *Aphanothece microscopica* Nägeli in tubular photobioreactors, *Chem. Eng. Process.*, doi:10.1016/j.cep.2007.06.004.
- [6] F.A. Esteves, in: Rio de Janeiro (Ed.), *Fundamentos de limnologia*, Internacional, 1988.
- [7] E. Jacob-Lopes, L.Q. Zepka, L.A.A. Pinto, M.I. Queiroz, Characteristics of thin-layer drying of the cyanobacterium *Aphanothece microscopica* Nägeli, *Chem. Eng. Process.* 46 (2006) 63–69.
- [8] M.I. Queiroz, E. Jacob-Lopes, L.Q. Zepka, R. Bastos, R. Goldbeck, The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor, *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 2163–2169.
- [9] L.Q. Zepka, E. Jacob-Lopes, R. Goldbeck, M.I. Queiroz, Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica* Nägeli submitted to different drying conditions, *Chem. Eng. Process.*, doi:10.1016/j.cep.2007.04.013.
- [10] R. Rippka, J. Deruelles, J.B. Waterbury, M. Herdman, R.Y. Stanier, Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria, *J. Gen. Microbiol.* 111 (1979) 1–61.
- [11] G.E.P. Box, W.G. Hunter, J.S. Hunter, *Statistics for Experiments*, John Wiley and Sons, New York, 1978.
- [12] S. Kajiwara, H. Yamada, O. Narumasa, Design of the bioreactor for carbon dioxide fixation by *Synechococcus* PCC7942, *Energy Conv. Manage.* 38 (1997) 529–532.
- [13] L. Guerrero, F. Omil, R. Mendez, J.M. Lema, Anaerobic hydrolysis and acidogenesis of wastewaters from food industries with high content of organic solids and protein, *Water Res.* 33 (15) (1999) 3250–3281.
- [14] L. Yue, W. Chen, Isolation and determination of cultural characteristics of a new highly CO₂ tolerant fresh water microalgae, *Energy Conv. Manage.* 46 (2005) 1846–1896.
- [15] H.T. Hsueh, H. Chu, S.T. Yu, A batch study on the bio-fixation of carbon dioxide in the absorbed solution from a chemical wet scrubber by hot springs and marine algae, *Chemosphere* 66 (2007) 878–886.
- [16] S.R. Chae, E.J. Hwang, H.S. Shin, Single cell protein production of *Euglena gracilis* and carbon dioxide fixation in an innovative photo-bioreactor, *Bioresour. Technol.* 97 (2006) 322–329.
- [17] J.H. Yoon, High cell density culture of *Anabaena variabilis* using repeated injections of carbon dioxide for the production of hydrogen, *Int. J. Hydrogen Energy* 27 (2002) 1265–1270.
- [18] H. Zuber, Structure of light-harvesting antenna complexes of photosynthetic bacteria, cyanobacteria and red algae, *Trends Biochem. Sci.* 11 (1986) 414–419.
- [19] D.I. Arnon, The discovery of photosynthetic phosphorylation, *Trends Biochem. Sci.* 9 (1984) 258–262.
- [20] Y.S. Yun, S.B. Lee, J.M. Park, C. Lee, J. Yang, Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 69 (1997) 451–455.
- [21] G. Subramanian, N. Thajuddin, Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology, *Curr. Sci.* 89 (2005) 47–57.
- [22] R. Muñoz, B. Guieysse, Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review, *Water Res.* 40 (2006) 2799–2815.
- [23] A.R. Grossman, M.R. Schaefer, G.G. Chiang, J.L. Collier, The responses of cyanobacteria to environmental conditions: light and nutrients, in: D.A. Bryant (Ed.), *The Molecular Biology of cyanobacteria*, Kluwer Academic Publishers, 1994, pp. 641–668.
- [24] M. Cuaresma, I. Garbayo, J.M. Vega, C. Vélchez, Growth and photosynthetic utilization of inorganic carbon of the microalga *Chlamydomonas acidophila* isolated from Tinto river, *Enzyme Microb. Technol.* 40 (2006) 158–162.