

ESTUDO DA ADESÃO DE *Chlorella vulgaris* (SAG 211- 12) A DIFERENTES SUBSTRATOS E DESENVOLVIMENTO DE UM REATOR DE BIOFILME FOTOSSINTÉTICO

Miguel Correia Melo

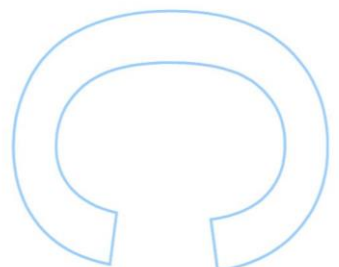
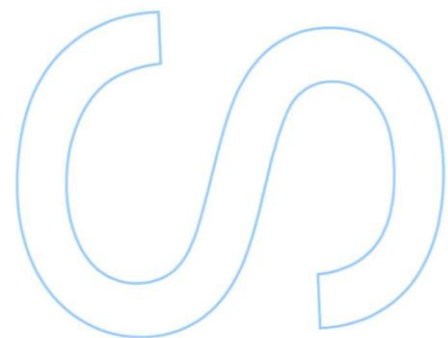
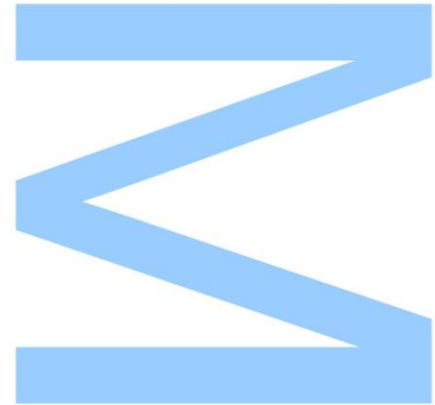
Ciências e Tecnologia do Ambiente
Ciências e Tecnologia do Ambiente
2014

Orientador

Maria Teresa Borges, Professora Auxiliar,
Departamento de Biologia, FCUP

Coorientador

Nídia Caetano, Professora Coordenadora,
ISEP, IPP



Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.
O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____

3

5

6

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer à Professora Doutora Maria Teresa Borges por toda a sua sapiência e motivação que me transmitiu na orientação deste mestrado, pela sua enorme paciência e bondade, pelo rigor científico e pela sua amizade.

Agradeço à Professora Doutora Nídia Sá Caetano do ISEP a sua jovialidade, prontidão em ajudar e insights que permitiram o desenvolvimento do modelo descrito nesta tese.

Agradeço também à Professora Maria João Santos, ao Professor Paulo Santos, à Doutora Francisca Cavaleiro, ao Professor Nuno Formigo e ao Professor Jorge Teixeira do Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto pelo apoio científico dado durante o Mestrado.

Agradeço ao Ricardo Branco-Boga do CIIMAR o apoio técnico para a condução de algumas experiências. À Professora Sónia Figueiredo do ISEP a cedência de material biológico essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à D. Helena Moreira, à Lilyana Stevenko e à Teresa Mendes o sorriso, a prontidão e todo o apoio prestado sem o qual muitas experiências não teriam sido possíveis.

Agradeço aos meus pais António e Elizabeth e às minhas irmãs o amor, carinho e tudo o que me permitiram ser. Se me fosse alongar nas palavras teria que escrever um novo capítulo...

E um agradecimento muito especial à Sílvia, a minha namorada, minha equipa para todas as aventuras, mulher sem a qual os últimos anos não teriam a vida que tiveram nem este mestrado seria possível, todo o seu apoio, discussão de ideias e revisão deste texto. Aqui para agradecer teria que escrever uma nova tese.

RESUMO

Na produção de microalgas em grande escala a colheita e processamento da biomassa a partir de culturas em suspensão é difícil e onerosa. Uma forma de se obterem grandes quantidades de biomassa naturalmente concentrada para processamento biotecnológico, consiste na produção dos organismos em biofilme.

A microalga *Chlorella vulgaris* tem sido muito usada em sistemas de produção a nível comercial, essencialmente na forma suspensa. Sendo assim, a avaliação da sua capacidade de adesão e formação de biofilme é importante no sentido de promover uma produção e colheita de biomassa mais económica para a produção a jusante de biocombustíveis e bioprodutos mais baratos.

Neste trabalho, foi estudada a capacidade de *Chlorella vulgaris* (SAG 211-12), uma estirpe não muito referida na literatura mas promissora para produção de biocombustíveis, crescer inicialmente em suspensão em condições padrão. Foram desenvolvidos depois protocolos no sentido de testar a adesão inicial da microalga a diferentes substratos (Aço Inoxidável, Inox, Polipropileno, PP, Polietileno, PE e Policloreto de Vinilo, PVC) e estudar as condições de formação de biofilme. O PVC mostrou ser o substrato com a maior adesão e formação de biofilme, seguido pelo PP, PE e Inox respectivamente.

Foi também desenvolvido e preliminarmente testado um novo biorreator para a produção da estirpe de *Chlorella* em estudo sob a forma de biofilme, com o intuito de maximizar a utilização da luz incidente e facilitar a colheita e processamento da biomassa. Os testes iniciais indicam que o fotobiorreator de biofilme desenvolvido se mostrou robusto, promoveu a formação do biofilme, a sua operação foi simples e a recolha da biomassa foi prática, como se esperava. A produção média de biomassa seca atingiu $3,28 \text{ gm}^{-2}$ sob condições ainda não optimizadas, traduzindo-se numa produtividade de $2,98 \text{ g.d}^{-1}$ por m^2 de solo ocupado, sendo no entanto necessária uma avaliação mais detalhada da sua produtividade a longo prazo.

PALAVRAS-CHAVE

Microalgas; *Chlorella*; adesão; biofilme; reator biofilme fotossintético.

ABSTRACT

In large scale microalgal production the harvest and processing of the biomass from suspended cultures is a difficult and costly process. One way of obtaining significant amounts of biomass naturally concentrated for biotechnological processing consists in the production of organisms as biofilms.

The microalga *Chlorella vulgaris* has been largely used in commercial production systems, essentially as suspended culture. So, an evaluation of its capacity of adhesion and biofilm formation is important in order to promote more economical production and biomass harvest for the downstream production of biofuels and bioproducts.

In the present work the capacity of *Chlorella vulgaris* (SAG 211-12), a strain not much referred in the literature but promising for biofuel production, to grow initially in suspended culture under standard conditions was studied. Protocols to test its capacity of initial adhesion to different substrates (Stainless steel, Inox, Polypropylene, PP, Polyethylene, PE and Polyvinyl chloride, PVC) and to test the conditions for biofilm formation were developed. PVC was shown to be the substrate with higher adhesion and biofilm formation, followed by PP, PE and Inox.

It was also developed and preliminarily tested a new bioreactor for the production of the *Chlorella* strain under study as a biofilm, aiming at maximizing the utilization of the incident light and promoting an easy biomass harvesting and processing. The initial tests show that the biofilm photobioreactor developed was robust, promoted the biofilm development, had a simple operation, and the biomass harvest process was easy, as expected. The average dry biomass production, under non optimized conditions, was 3,28 g.m⁻² and a productivity of 2,98 g.d⁻¹ per m² of occupied soil was reached, but a more detailed evaluation of the bioreactor long term maximum productivity is still needed.

KEYWORDS

Microalgae; *Chlorella*; adhesion; biofilm; Photosynthetic biofilm reactor

ÍNDICE GERAL

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. ESTADO DA ARTE..... | 3 |
| 2.1 – A microalga <i>Chlorella vulgaris</i> e o seu cultivo..... | 3 |
| 2.2 - Cultura de Microalgas em grande escala (fotobioreatores abertos e fechados). 8 | |
| 2.3 – Biofilmes microalgais e reatores de biofilme fotossintético | 12 |
| 2.3.1 – Características dos biofilmes fotossintéticos..... | 12 |
| 2.3.2 – Estudos de adesão a substratos com microalgas | 14 |
| 2.3.3 - Reatores de biofilme microalgal..... | 15 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 20 |
| 3.1 – Reagentes..... | 20 |
| 3.2 – Origem do inóculo | 20 |
| 3.3– Instalações experimentais e condições de crescimento | 21 |
| 3.4 - Meios e condições de manutenção das culturas | 22 |
| 3.5 – Estudo da cinética de crescimento em condições padrão | 23 |
| 3.6 - Substratos testados e ensaios de adesão | 24 |
| 3.6.1 – Substratos utilizados..... | 24 |
| 3.6.2 – Ensaios preliminares..... | 24 |
| 3.6.3 – Ensaios de imobilização em batch em condições controladas | 26 |
| 3.7 – Protótipo de reator de biofilme microalgal..... | 29 |
| 3.8 - Métodos Analíticos..... | 31 |
| 3.8.1 – Contagem celular..... | 31 |
| 3.8.2 – Densidade Ótica (DO)..... | 31 |
| 3.8.3 – Medida da biomassa seca | 31 |
| 3.8.4 – Medição da intensidade luminosa | 32 |
| 3.8.5 – Avaliação da adesão celular aos substratos e formação de biofilme..... | 32 |
| 3.9 - Análise estatística efetuada..... | 32 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 34 |
| 4.1 – Aclimação de <i>Chlorella vulgaris</i> ao meio BBM..... | 34 |
| 4.2 – Cinética de crescimento em BBM e aumento de escala | 35 |
| 4.3 – Avaliação da biomassa seca e sua relação com a absorvância..... | 38 |
| 4.4. Ensaios de adesão e formação de biofilme | 39 |
| 4.4.1 Observação inicial da capacidade de adesão | 39 |
| 4.4.2 Ensaios preliminares de adesão sob condições mais controladas | 40 |
| 4.4.3 Ensaios controlados de imobilização de <i>Chlorella vulgaris</i> em <i>coupons</i> | 43 |

| | |
|--|------|
| 4.4.4 - Avaliação preliminar da formação de biofilme em placa de PVC | 48 |
| 4.5 – Biorreator de biofilme fotossintético | 5349 |
| 4.5.1 – Construção do protótipo de reator de biofilme..... | 49 |
| 4.5.2 – Ensaio em protótipo de reator de biofilme | 53 |
| 5 – CONCLUSÕES FINAIS E PROPOSTAS TRABALHO FUTURO | 56 |
| 6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 58 |
| Anexos | II |

ÍNDICE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Composição elementar de <i>Chlorella vulgaris</i> (por peso)..... | 7 |
| Tabela 2. Produtividade em fotobiorreatores fechados..... | 9 |
| Tabela 3. Quantificação do rendimento em biomassa ao fim de 15 dias de crescimento de biofilme no biorreator..... | 53 |

ÍNDICE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Fig. 1 Imagem microscópica de <i>Chlorella vulgaris</i> | 4 |
| Fig. 2 Imagem ilustrativa de um sistema do tipo raceway | 8 |
| Fig. 3 Imagem ilustrativa de um fotobiorreator em sistema fechado com luz artificial. 9 | |
| Fig. 4 Biorefinaria para produção de biomassa com microalgas. Figura ilustrativa de um sistema de produção de biomassa utilizando a componente lipídica, carboidratos e proteínas da biomassa. Adaptado de Irving, 2011, | 10 |
| Fig. 5 Exemplo de um ATS – <i>Algae Turf Scrubber</i> antes da colonização (à esquerda) e após a | 16 |
| Fig. 6 Esquema simplificado de Reatores..... | 18 |
| Fig. 7 <i>Chlorella vulgaris</i> SAG 211-12 (DIC, 400x1,6)..... | 20 |
| Fig. 8 Imagem ilustrativa da câmara de iluminação de bancada laboratorial | 22 |
| Fig. 9 Culturas de <i>Chlorella vulgaris</i> em volumes crescentes, sem arejamento à esquerda e..... | 23 |
| Fig. 10 Montagem para avaliação preliminar da capacidade de adesão de | 25 |
| Fig. 11 Ensaio preliminares de adesão. Da esquerda para a direita: PVC (1), Espuma de Poliuretano (2) e Vidro (3). O recipiente 4, ao fundo, é o controlo sem substrato. .. | 26 |
| Fig. 12 Montagem experimental para estudo da adesão a diferentes substratos..... | 27 |
| Fig. 13 Obtenção de amostras dos ensaios de adesão em <i>coupons</i> para contagem celular..... | 27 |
| Fig. 14 Ensaio de adesão a PVC e PP sob diferentes condições de intensidade | 28 |
| Fig. 15 Ensaio preliminares de colonização de PVC em maior escala. | 29 |
| Fig. 16 Construção do protótipo de Bioreator de Biofilme Microalgal em Placas e ensaios de estanquicidade e robustez..... | 30 |
| Fig. 17 Aclimação das algas <i>Chlorella vulgaris</i> SAG 211-12 ao meio BBM | 34 |
| Fig. 18 Variação da concentração celular em função do tempo (esquerda) e recta do logaritmo da concentração de células em função do tempo (direita), para os matrizes de 100 mL com 50 mL de cultura | 35 |
| Fig. 19 Variação da concentração de células em função do tempo (escala aritmética à esquerda e escala logarítmica à direita), para os matrizes de 500 mL com 250 mL de cultura..... | 36 |
| Fig. 20 Variação da concentração de células em função do tempo (esquerda) e recta do logaritmo da concentração de células em função do tempo (direita), para os matrizes de 1000 mL com 500 mL de cultura. | 36 |
| Fig. 21 Relação entre concentração celular e absorvância das suspensões celulares em volumes de 250 e 500 mL de meio, inoculados em matrizes de 500 mL (esquerda) e 1000 mL (direita). | 37 |
| Fig. 22 Evolução do pH da cultura em função do tempo para..... | 38 |
| Fig. 23 Relação entre o peso seco e a absorvância (DO_{680nm}) da biomassa da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> SAG 211-12 em BBM. | 38 |
| Fig. 24 Adesão de <i>Chlorella vulgaris</i> SAG 211-12 ao vidro dos | 39 |
| Fig. 25 Resultados da avaliação preliminar da capacidade de adesão de <i>Chlorella vulgaris</i> SAG 211-12 ao vidro. À esquerda observa-se o aspeto no início do ensaio, e à direita o aspeto após verificada a colonização. | 40 |
| Fig. 26 Avaliação preliminar da adesão de <i>Chlorella vulgaris</i> a PVC, Poliuretano e Vidro, através da evolução da absorvância da suspensão da cultura nas tinas com os diferentes materiais, em função do tempo. | 41 |

| | |
|--|----|
| Fig. 27 Exemplos elucidativos da capacidade de adesão de <i>Chlorella vulgaris</i> SAG 211-12 a PVC (cima à esquerda), Poliuretano (cima à direita) e Vidro (em baixo) (Setas). | 42 |
| Fig. 28 Detalhe da capacidade de adesão e formação de biofilme de <i>Chlorella vulgaris</i> através de imagens digitalizadas dos suportes PVC, PU e Vidro, da esquerda para a direita, respetivamente. | 42 |
| Fig. 29 Quantificação da adesão de <i>Chlorella vulgaris</i> SAG 211-12 aos diferentes substratos às 72h (A) e às 144h (B). A quantificação foi feita através da contagem do número de células por coupon, diluídas num mililitro. Em A, “sem dados” diz respeito à amostra utilizada preliminarmente às 48h para quantificação celular. Para cada substrato foram efetuadas 6 contagens independentes. | 44 |
| Fig. 30 Quantificação da densidade celular no biofilme de <i>Chlorella vulgaris</i> formado em diferentes substratos às 240h (A) e às 312h (B). A quantificação foi feita através da contagem do número de células por coupon, diluídas num mililitro. | 45 |
| Fig. 31 Evolução da densidade de células aderidas a cada substrato, ao longo do tempo da experiência (esquerda). À direita, encontra-se representada graficamente a evolução da absorvância do meio contendo as células em suspensão, ao longo do tempo da experiência e para cada substrato. | 46 |
| Fig. 32 Quantificação da adesão e crescimento de <i>Chlorella vulgaris</i> para os substratos PP e PVC às 72h (A) e às 144h (B). A quantificação foi feita através da contagem do número de células por coupon, diluídas num mililitro. Em B, também estudo da variação da intensidade luminosa no desenvolvimento do biofilme às 144h, em PVC (barra escura-PVC, mais luz; barra quadriculada-PVC*, menos luz). | 47 |
| Fig. 33 Representação gráfica da relação inversa entre a concentração das células aderidas aos diferentes substratos e a concentração das células em suspensão. | 48 |
| Fig. 34 Aspeto do ensaio preliminar de desenvolvimento de uma cultura de <i>Chlorella vulgaris</i> aderida a uma placa de PVC (à esquerda o início e à direita o fim do ensaio). | 49 |
| Fig. 35 Representação esquemática da incidência luminosa nos discos de um RBC durante a maior parte do dia (A); variação da posição do sol em relação ao RBC, ao longo do dia (B); projeção da quantidade de discos necessária para um RBC para igualar a área exposta à luz existente num bioreator FBPR. | 50 |
| Fig. 36 Representação esquemática de um bioreator FBPR e variação da posição do sol ao longo do dia (A); incidência da radiação luminosa nas diferentes placas do bioreator (B). | 50 |
| Fig. 37 Representação esquemática das partes e dimensões do bioreator FBPR. | 51 |
| Fig. 38 Representação do bioreator FBPR construído, ainda em fase de testes. | 51 |
| Fig. 39 Representação esquemática da posição relativa de oito placas num bioreator FBPR, observadas em diferentes perspetivas (A e B). | 52 |
| Fig. 40 – Imagens fotográficas representativas do processo de colheita de <i>Chlorella vulgaris</i> , após remoção das placas de PVC e raspagem do biofilme do FBPR. | 53 |
| Fig. 41 Imagens fotográficas sequenciais do <i>regrowth</i> de <i>Chlorella vulgaris</i> no FBPR ao longo de 8 dias. | 54 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Âmbito do trabalho efetuado

Chlorella vulgaris é uma microalga muito utilizada em diversas áreas Biotecnológicas, sendo de elevado interesse na atualidade a possibilidade de extração de lípidos para produção de biocombustível.

Embora o uso de uma microalga autóctone seja preferível quando se pretendem desenvolver metodologias de produção para aplicação em situações reais envolvendo, por exemplo, tratamento e valorização de efluentes, para realizar trabalho de investigação fundamental nesta área é preferível utilizar uma espécie conhecida. Sendo assim, no presente trabalho o inóculo de *Chlorella vulgaris* utilizado foi obtido da Coleção Alemã de Culturas SAG (estirpe 211-12).

Como um dos principais constrangimentos na produção de microalgas para biocombustíveis é a colheita da biomassa, a imobilização das células permitiria contornar esta limitação. Dado que na literatura da especialidade se encontram trabalhos que referem a capacidade de adesão de microalgas do género *Chlorella* a superfícies [1, 2], testar a capacidade de imobilização da estirpe originária da SAG foi uma das forças motivadoras desta dissertação. Do mesmo modo, a facilidade de separação da matriz de imobilização constitui um desafio importante, pelo que um bioreactor adequado à produção de *Chlorella vulgaris* em biofilme deve também permitir a sua recolha de modo simples. Sendo assim, uma proposta de novo bioreator fotossintético, constitui também um desafio a considerar neste trabalho.

1.2 – Objetivos

Tendo os pressupostos anteriores em mente, o trabalho efetuado teve como objetivo principal desenvolver um método simples e eficaz de imobilização da microalga *Chlorella vulgaris* SAG 211-12, e um sistema para a sua produção em biofilme, obtendo-se assim biomassa de um modo que permita um processamento posterior mais eficaz.

Os objetivos específicos incluíram:

- i) Desenvolvimento e construção de um sistema simples para cultura de microalgas em bancada de laboratório e para realização de testes de adesão
- ii) Caracterização do crescimento de *Chlorella vulgaris* SAG 211-12 em meio standard (BBM)
- iii) Seleção de um substrato de imobilização adequado para cultura de *Chlorella vulgaris* em biofilme
- iv) Estudo da influência da variação de algumas condições ambientais na imobilização
- v) Desenho e implementação de um protótipo de reator de biofilme para produção de *Chlorella vulgaris*

2. ESTADO DA ARTE

Neste capítulo apresenta-se informação sobre a microalga objeto deste estudo, *Chlorella vulgaris*, assim como sobre os métodos de produção mais utilizados, em especial para obtenção de biomassa para biocombustíveis. São também abordadas as características dos biofilmes fotossintéticos, os principais estudos sobre adesão com microalgas e as tecnologias envolvendo reatores de biomassa microalgal imobilizada.

2.1 – A microalga *Chlorella vulgaris* e o seu cultivo

As microalgas são microrganismos fotossintéticos capazes de utilizar a energia solar para produzir biomassa. Podem encontrar-se em praticamente todos os biótopos devido à sua elevada adaptabilidade fisiológica, sendo muito comuns em meios aquáticos, onde têm acesso mais eficiente à água, CO₂, e nutrientes. Nas cadeias alimentares funcionam essencialmente como produtores primários e também fornecem oxigénio necessário ao metabolismo aeróbio de vários organismos.

Do ponto de vista sistemático podem referir-se como algas organismos Procarióticos das Divisões Cyanophyta (algas azuis ou cianobactérias) e Prochlorophyta, e organismos Eucarióticos, pertencentes a várias Divisões como Glaucophyta, Rhodophyta (algas vermelhas), Heterokontophyta (algas castanhas, douradas e amarelo-esverdeadas), Haptophyta, Cryptophyta, Dinophyta, Euglenophyta e Chlorophyta (algas verdes). Neste último grupo incluem-se diversas Classes, entre as quais Chlorophyceae e Trebouxiophyceae [3]. As espécies de microalgas do género *Chlorella* distribuem-se pelas duas Classes referidas, pertencendo a microalga objeto deste trabalho, *Chlorella vulgaris* SAG 211-12, à Classe Trebouxiophyceae, de acordo com estudos taxonómicos baseados na sequenciação do gene 18S-rRNA [4]. O género *Chlorella*, **Fig.1**, está incluído na Ordem das Chlorellales e compreende células esféricas, não móveis, com um cloroplasto em forma de taça. Possuem parede celular com baixo teor em celulose e a forma de reprodução é assexuada, por fissão binária, com formação de autospóros [3].

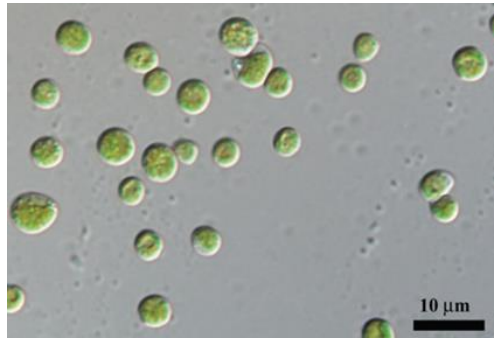


Fig. 1 Imagem microscópica de *Chlorella vulgaris*.
Fonte: <http://www.biotek.com/resources/articles/nile-red-dye-algal.html>

As algas do género *Chlorella* podem ser encontradas tanto em água doce, como em água salgada. Estas microalgas têm um ciclo de vida e exigências nutricionais simples. Podem crescer fotoautotroficamente, heterotroficamente ou mixotroficamente [5, 6].

Chlorella é a microalga eucariótica mais cultivada, uma vez que é amplamente usada tanto como suplemento alimentar, como na indústria farmacêutica e cosmética. Contém proteínas, lipídios, carotenoides, compostos imunoestimuladores, polissacarídeos, vitaminas, anti-oxidantes e minerais. O seu crescimento depende de diversos factores como, nutrientes, pH, salinidade, temperatura e luz (duração e intensidade). Alterações nestes factores influenciam a produção de biomassa, teor de óleo e respectiva composição [7, 8].

A espécie *Chlorella vulgaris* é uma das algas mais atraentes para produção de biocombustíveis, devido ao seu rápido crescimento e fácil cultivo. O aumento do conteúdo lipídico nesta espécie é, portanto, uma área de pesquisa importante. Os requisitos para maximizar a produção de biomassa e de lipídios são, no entanto, difíceis de alcançar. De acordo com a literatura, o armazenamento de lipídios aumenta em condições de stress ambiental [9]. Nestas condições, a produção de biomassa é também afetada. A produtividade de biomassa e a produtividade de lipídios de *Chlorella vulgaris* podem ser maximizadas se certas condições específicas de cultura forem aplicadas [10]. Por exemplo, o conteúdo lipídico em *Chlorella vulgaris* pode ser aumentado até 56,6% do peso seco da biomassa, através da adição de $1,2 \times 10^{-5}$ mol·L FeCl_3 [11, 12]. O conteúdo lipídico desta espécie é também significativamente afetado pela variação nas condições de crescimento. Por exemplo, o teor de óleo diminuiu de 14,71% para 5,90% quando a temperatura de crescimento aumentou de 25 a 30 ° C [13]. Sabe-se também que a sua cultura em meios pobres em azoto resulta no aumento de lipídios; no entanto, o crescimento nestas condições é mais lento ou até mesmo nulo [9, 14].

Sendo a luz a fonte de energia mais importante para as algas fotoautotróficas, muitos estudos têm-se centrado sobre o efeito da intensidade da luz e do fotoperíodo. Alguns estudos mostraram que com *Chlorella vulgaris*, para um fotoperíodo de oito ou nove horas por dia, se obteve uma densidade celular aproximadamente 40% maior do que sob iluminação contínua, tendo-se atingido uma produtividade em biomassa final de 1,43 g.L.d⁻¹ [15]. Para além disso, investigação realizada pelos mesmos autores revelou que a taxa de crescimento da *Chlorella vulgaris* sob fotoperiodicidade é maior do que sob iluminação contínua. Na produção de biomassa de *Chlorella vulgaris*, o fotoperíodo considerado ótimo para o crescimento é de 12hD:12hN (Dia e Noite, respetivamente, verificando-se que a fase exponencial de crescimento se prolonga por mais tempo [16]. Para além do efeito no crescimento da alga, a fotoperiodicidade permite também economizar energia luminosa, aumentando assim a eficiência energética da cultura [15].

Alguns autores procuraram determinar o comprimento de onda ótimo para a actividade fotossintética de *Chlorella vulgaris*, tendo sido testadas a luz vermelha, verde, azul e branca. Uma taxa de absorção de luz mais elevada poderia permitir ao cloroplasto uma maior produção de energia química utilizável, resultando num aumento do crescimento das algas (biomassa). Assim, verificaram que o uso da luz branca resultou numa percentagem superior de absorção ao longo do estudo, estando de acordo com a maior densidade de algas na cultura, e com a taxa de crescimento mais alta. Por outro lado, os comprimentos de onda do verde e vermelho foram os menos absorvidos por *Chlorella vulgaris*, resultando em percentagens mais baixas de densidade celular e de taxas de crescimento. Este estudo demonstrou que o comprimento de onda da luz tem um efeito significativo sobre as taxas de crescimento das algas, sendo a luz branca a que resulta em taxas de crescimento superiores [17].

Outro aspeto importante em *Chlorella vulgaris* é a sua capacidade para crescer sob elevadas concentrações de dióxido de carbono [18]. É muito eficaz na retenção deste gás, sendo que por cada kg de biomassa seca produzida são utilizados cerca de 1,83 kg de dióxido de carbono [19]. A concentração de CO₂ desempenha também um papel importante no aumento do teor de lípidos, uma vez que o crescimento também é afectado pela concentração de CO₂. Uma maior concentração de CO₂ no meio, para o mesmo meio de cultura, resulta numa maior produtividade lipídica. Combinando estes dois factores, a diminuição da concentração de N com o aumento da concentração de CO₂, consegue-se obter um teor lipídico mais elevado, sem comprometer tanto o crescimento. O cultivo de *Chlorella vulgaris* sob níveis elevados de dióxido de carbono

e sob stress de azoto resultou num teor de óleos superior a 50% do peso seco das algas [9].

Diferentes algas têm diferentes temperaturas de crescimento ideais. A espécie *Chlorella vulgaris* tem uma taxa de crescimento reduzida se a temperatura do meio for superior a 25 °C; contudo ainda cresce até 40 °C [20].

O pH do meio afecta também o crescimento de *Chlorella vulgaris*. Enquanto a pH 4 o crescimento é reduzido, a pH 2 a alga não é capaz de crescer. A pH 6, o crescimento é mais rápido do que a pH 8, mas, após 18 dias as culturas apresentavam a mesma concentração celular. A pH superior o crescimento foi reduzido. Embora *Chlorella* possa crescer numa ampla gama de valores de pH, o pH ideal para o crescimento e produção de biomassa é aproximadamente 6,5; por outro lado, a produção de lípidos é maior a pH entre 7,5 e 8 [21].

A otimização do meio de cultura é um passo crítico para desenvolver uma produção comercial sustentável de biomassa algal [16]. Para além disso, o potencial de um fotobioreactor só é atingido se as limitações biológicas estiverem ultrapassadas, como é o caso da concentração de nutrientes disponível e da produção de metabolitos tóxicos. É conhecido, no entanto, que *Chlorella vulgaris* não produz nenhuma substância autoinibitória capaz de inibir ou retardar o seu próprio crescimento [22].

A formulação de um meio equilibrado é essencial para obtenção de culturas de elevada densidade, sabendo-se que os elementos necessários para o crescimento de algas verdes são (para além do Carbono) N, P, K, Mg, Ca, S, Fe, Cu, Mn and Zn. Para além disso, encontra-se igualmente descrito na literatura que a captação/absorção de nutrientes depende de vários factores como a densidade da cultura, a luz, a temperatura e o pH do meio. Ainda assim, a composição elementar de *Chlorella* varia consoante a fase de crescimento e as condições da cultura (deficiência em N, etc) [16, 22, 23].

Ao longo dos anos de investigação com esta espécie, várias composições de meio de cultura têm sido propostas, estando algumas das quais descritas por exemplo, no manual de métodos ficológicos de Stein [24]. A composição do meio pode ser formulada tendo em conta vários parâmetros como a estequiometria celular ou metabólica. A composição elementar da espécie *Chlorella vulgaris*, encontra-se descrita na **Tabela 1**.

Tabela 1. Composição elementar de *Chlorella vulgaris* (por peso)

| Elemento | % Composição |
|------------|--------------|
| Carbono | 51,4–72,6 |
| Oxigénio | 11,6–28,5 |
| Hidrogénio | 7,0–10,0 |
| Nitrogénio | 6,2–7,7 |
| Fósforo | 1,0–2,0 |
| Potássio | 0,85–1,62 |
| Magnésio | 0,36–0,80 |
| Enxofre | 0,28–0,39 |
| Ferro | 0,04–0,55 |
| Cálcio | 0,005–0,08 |
| Zinco | 0,0006–0,005 |
| Cobre | 0,001–0,004 |
| Manganês | 0,002–0,01 |

Adaptado de Mandalam, 1998 [22].

O nutriente que mais contribui para a produção de biomassa é o carbono. O carbono é geralmente adicionado na forma de compostos inorgânicos como o dióxido de carbono, já referido acima, mas podem ser utilizados compostos orgânicos, como a peptona ou o ácido acético. O azoto é também um dos nutrientes mais importantes para a produção de biomassa de algas, sendo que mais de 10% da biomassa pode ser constituída por azoto. Como fontes de azoto podem usar-se, por exemplo, amónia, nitrato ou ureia. A falta de azoto pode causar uma diminuição na clorofila, um aumento na acumulação de carotenóides e de compostos orgânicos de carbono, tais como polissacarídeos e certos óleos [6].

O fósforo é necessário em muitos processos celulares para o crescimento, como a transferência de energia e biossíntese de ADN. Por outro lado, o teor de lípidos e de carboidratos também é afetado pelo fósforo [9].

Muitos outros nutrientes como S, K, Na, Fe, Mg e Ca são importantes para a nutrição das algas. Oligoelementos, tais como B, Cu, Mn, Zn e Mo são também necessários, uma vez que muitos deles são utilizados em reações enzimáticas. Normalmente a produção de microalgas é efetuada em meio líquido, utilizando-se na elaboração do meio de cultura para algas de água doce geralmente água destilada. Contudo, em instalações em grande escala é utilizada água subterrânea ou água canalizada [6, 22].

Finalmente, em culturas em meio líquido, a existência de agitação mantém as células em suspensão e evita parcialmente a sua deposição. Deste modo é favorecida a disponibilidade de luz para a suspensão celular e é eliminado o excesso de oxigénio dissolvido produzido pela fotossíntese, diminuindo o risco de foto-oxidação [6].

2.2 - Cultura de Microalgas em grande escala (fotobioreatores abertos e fechados)

Nenhum sistema desenvolvido até ao presente permitiu a produção de grandes quantidades de biomassa microalgal ao baixo custo exigido para tornar a obtenção de produtos como o biocombustível economicamente viável. Ao longo dos anos de investigação nesta área, vários tipos de fotobiorreatores têm sido propostos, sendo que praticamente todos resultam na produção de suspensões de algas em água [5].

Os sistemas mais simples e de menor custo para a produção de biomassa de microalgas consistem em tanques ao ar livre. Estes são geralmente pouco profundos (0,2-0,5 m de profundidade), e construídos em betão ou em terra compactada e revestidos com telas plásticas. Muitos destes sistemas são do tipo *raceway* onde a homogeneização da cultura é feita por rodas de pás (**Fig.2**). Embora estes sistemas exijam grandes áreas, podem ser construídos em terras não agrícolas, minimizando a concorrência com as culturas alimentares [25].



Fig. 2 Imagem ilustrativa de um sistema do tipo raceway homogeneizado por uma roda de pás.

Fonte: <http://www.sandia.gov/index.html>

As principais desvantagens dos sistemas abertos são a falta de controlo sobre as condições climáticas e o risco acrescido de contaminação. Estes sistemas são, por isso, eficazes em climas quentes, e para espécies que crescem em ambientes altamente seletivos, tais como pH elevado (como *Spirulina*) ou alta salinidade (como *Dunaliella salina*) [26]. Este modo de produção é utilizado amplamente em todo o mundo, sendo a instalação operada na Califórnia pela *Earthrise Farms* para a microalga *Spirulina*, com 440.000 m² de área, um bom exemplo deste sistema. Outros exemplos são também as instalações para produção de *Dunaliella* operadas pela Cognis Health and Nutrition na Austrália ou para a produção de *Spirulina* pela

Cyanotech no Hawaii. No entanto, deve notar-se que a produtividade em biomassa e em densidade celular na cultura final são baixas em sistemas abertos. Os valores típicos para a produtividade são inferiores a $0,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, enquanto os valores de concentração em biomassa são inferiores a $1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente [5, 27].

Os sistemas fechados referem-se aos fotobiorreatores feitos de material permeável à luz, que contêm a suspensão de algas. Estes sistemas proporcionam um maior controlo sobre as condições de cultura (temperatura, pH, intensidade da luz, etc) que os sistemas abertos e não são tão predispostos a contaminações. Embora alguns sistemas tenham sido projetados para usar a luz natural, a maioria depende de iluminação artificial [27-29] (**Fig.3**).



Fig. 3 Imagem ilustrativa de um fotobiorreator em sistema fechado com luz artificial.
 Fonte: <http://www.algaeindustrymagazine.com/schott-glass-tubing-for-photobioreactors/>

Foi proposta uma grande variedade de configurações de reactores, incluindo os de placas planas, os tubos verticais, os reactores de transporte aéreo, e até mesmo de desenhos helicoidais. Alguns projetos recentes, e as respectivas produtividades, encontram-se resumidos na **Tabela 2**. Em geral, a produtividade de biomassa em sistemas fechados é maior do que em sistemas abertos, embora os valores típicos geralmente não excedam $1,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$. Do mesmo modo, a concentração de biomassa final não excede $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, e é geralmente inferior a $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ [27].

Tabela 2. Produtividade em fotobiorreatores fechados.

| Espécie | Configuração do bioreator | Fonte luminosa | V (L) | Produtividade de máxima ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) | Referência |
|------------------------------|---------------------------|----------------|-------|--|-----------------------------------|
| <i>Chlorella sp.</i> | Placas planas | Sol | 400 | 3,8 | <i>Doucha et al., 2005,[30]</i> |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | Placas planas | Artificial | 1,5 | 2,6 | <i>Degen et al., 2001,[31]</i> |
| <i>Spirulina platensis</i> | Tubular | Artificial | 5,5 | 0,62 | <i>Converti et al, 2006,[32]</i> |
| <i>Chlorella sorokiniana</i> | Tubular inclinado | Sol | 6 | 1,47 | <i>Ugwu et al., 2002, [33]</i> |
| <i>Spirulina platensis</i> | Helicoidal | Artificial | 21 | 0,40 | <i>Travieso et al, 2001, [34]</i> |

Adaptado de *Irving, 2011 [35]*

As principais limitações dos sistemas fechados são os elevados custos com a energia necessária para o bombeamento, homogeneização, troca gasosa, iluminação e outros processos dispensáveis em sistemas abertos. Assim, são conseguidas produtividades mais elevadas mas com um maior custo por kg de biomassa produzida [27].

Recentemente foi desenvolvido um conceito designado de “Biorefinaria” como se encontra ilustrado na **Fig.4**. Essencialmente, o conceito de biorrefinaria visa maximizar a sustentabilidade dos processos de utilização de microalgas através do aproveitamento de todos os constituintes com interesse, de uma forma integrada, sendo produzidos, desde produtos de elevado valor acrescentado (nutraceuticos, farmaceuticos, etc) até biocombustíveis. Este sistema pode ser adaptado para utilização de recursos de custo reduzido, como águas de esgotos, luz solar e CO₂, tornando-se um sistema de produção economicamente vantajoso. De entre as vantagens da utilização deste sistema salientam-se a utilização/sequestro de carbono; melhoramento da qualidade da água por remover o azoto e fósforo necessários para o crescimento das algas, e o facto da biomassa resultante da separação do biocombustível ser biodegradável, o que faz com que este sistema não produza desperdícios [35]. Contudo, a optimização dos custos de colheita é ainda necessária.

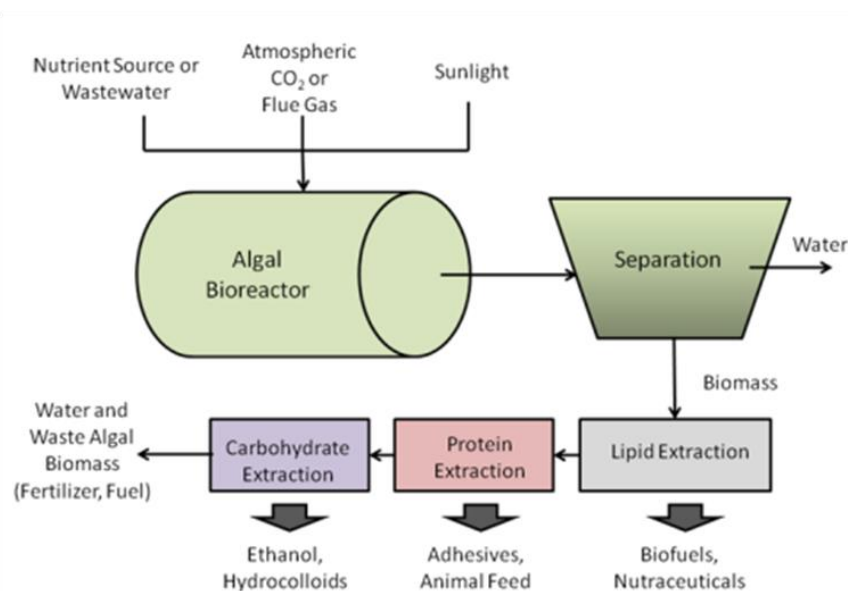


Fig. 4 Biorefinaria para produção de biomassa com microalgas. Figura ilustrativa de um sistema de produção de biomassa utilizando a componente lipídica, carboidratos e proteínas da biomassa. Adaptado de *Irving, 2011*,

Para que um sistema deste tipo possa ser construído, é necessária uma abordagem multidisciplinar. Questões como a seleção de espécies, o uso eficiente da

luz, e a extração do produto final vão exigir a aplicação de conhecimentos em áreas como a biologia molecular, a biotecnologia, a fotónica e a química. Grande parte desse trabalho está fora do âmbito desta dissertação. No entanto, o desenho de um biorreator eficiente para a produção das microalgas é fundamental, sendo uma das tarefas do presente estudo.

Conforme referido acima, tanto os sistemas fechados como os sistemas abertos resultam na produção de uma suspensão de algas com um teor de água superior a 90%. Assim, a separação da biomassa do meio de cultura é um passo crucial no processo de produção. A biomassa pode ser separada por floculação, filtração, ou centrifugação [5, 36].

As microalgas têm uma carga negativa à superfície, o que inibe a sua agregação em suspensão. Sais metálicos, como o sulfato de alumínio (alúmen) têm-se mostrado eficazes na floculação de algas em processos de tratamento de águas residuais [37]. No entanto, a acumulação de metais na biomassa das algas torna o seu uso inadequado para muitas aplicações. Alternativas como a adição de polímeros, como por exemplo Magnafloc LT-25 [38] ou substâncias naturais, tais como quitosano [39] demonstraram ser também eficazes, apesar de serem aditivos de custo muito elevado.

Métodos de filtração ou prensagem podem ser usados na produção de *Spirulina* e de outras espécies cujo diâmetro celular seja grande. No entanto, a filtração é ineficaz para as células que se aproximam das dimensões bacterianas, tal como acontece com *Chlorella*, *Scenedesmus*, ou *Dunaliella* [40]. A microfiltração pode ser utilizada nestes casos mas apresenta custos elevados. No caso de grandes volumes, a microfiltração é considerada mais barata do que a centrifugação [41].

A centrifugação é o método preferido para produtos como os nutracêuticos e alimentos para aquacultura, devido à sua capacidade de preservar a integridade celular. No entanto, também é o método que consome mais energia, necessitando cerca de 1-8 kWh por metro cúbico de suspensão processada [40].

Independentemente do método utilizado, a separação da biomassa a partir de uma suspensão é um processo dispendioso, quer energética quer economicamente, representando cerca de um quarto do custo total de produção de biomassa, acrescido ainda de outros passos, como a secagem da biomassa, a extração dos lipídios, e a transformação em biocombustível [26].

2.3 – Biofilmes microalgais e reatores de biofilme fotossintético

Os reatores referidos acima para a produção de microalgas utilizam células em suspensão. Contudo, existe também a possibilidade de cultura de microalgas em reatores de biofilme, à semelhança dos sistemas bacterianos utilizados em áreas de intervenção como o tratamento biológico de águas residuais [42].

Sabe-se que as algas desenvolvem-se naturalmente como biofilmes aderidos a substratos, tais como pedras, madeira ou folhas [6]. Os biofilmes fotossintéticos podem formar-se em qualquer superfície com humidade e luz suficientes, mas nestas condições os filmes são comunidades complexas de organismos autotróficos e heterotróficos. O termo “biofilme fotossintético” pode utilizar-se para distinguir os filmes referidos, daqueles que usam diversos substratos como principal fonte de energia [43].

2.3.1 – Características dos biofilmes fotossintéticos

Os biofilmes dominados por microalgas (ou por cianobactérias) apresentam uma espessura que pode variar de micrômetros a milímetros, podendo até incluir espécies visíveis macroscopicamente. Quando desenvolvido num rio ou riacho, este biofilme é muitas vezes chamado de perífiton e em estuários e zonas costeiras, é denominado de tapete de algas (“*microbial mats*”), sendo constituído por muitos grupos funcionais de microrganismos, distribuídos em camadas [44]. O perífiton é constituído por uma mistura complexa de algas, cianobactérias, espécies heterotróficas e detritos, que se encontram aderidos a superfícies submersas na maioria dos ecossistemas aquáticos. O perífiton tem a capacidade de absorver contaminantes e nutrientes da coluna de água impedindo, desta forma, a sua circulação pelo meio ambiente. Para além disso, em sistemas experimentais para estudos de toxicologia e tolerância a poluentes, o perífiton é usado como indicador da qualidade da água [45].

Os biofilmes fototróficos desenvolvem-se em superfícies expostas à luz numa grande diversidade de habitats terrestres e aquáticos. Os microrganismos fototróficos como diatomáceas, algas verdes e cianobactérias são os principais produtores primários e redutores de dióxido de carbono, fornecendo ao sistema substratos orgânicos e oxigénio. Para além disso, os microrganismos que constituem o biofilme, quer sejam autotróficos quer sejam heterotróficos, segregam polímeros (*extracellular polymeric substances*, EPS) com a função de promover a coesão do mesmo [46].

A intensidade de luz diminui com o aumento da espessura do biofilme, restringindo a atividade fototrófica apenas às camadas superiores do mesmo. Verifica-se um acentuado gradiente decrescente de oxigénio até às camadas inferiores, onde se encontram os organismos anóxicos e anaeróbios. Para além disso, verifica-se que a utilização de CO₂ na fotossíntese induz igualmente um gradiente decrescente de pH [46].

Independentemente da sua origem (rios, riachos, massas de água artificiais ou mesmo de biorreactores em laboratórios) [47, 48], o exame da estrutura dos filmes biológicos é sempre complexo. De facto, muitos dos métodos padronizados usados para avaliar a biomassa (por exemplo, as medições de peso seco), são destrutivos para a estrutura do biofilme, e exigem uma quantidade significativa de biomassa acumulada. De entre os métodos não destrutivos de análise de biofilmes fotossintéticos destaca-se a microscopia, nomeadamente microscopia de luz simples e confocal a laser (CLSM), modulação por amplitude de pulso (PAM), bem como o uso de microelétrodos e métodos moleculares (incluindo Hibridação *in situ* Fluorescente – FISH e a Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante- DGGE) [49].

A estrutura do biofilme e a distribuição das espécies no mesmo podem variar consideravelmente, dependendo das condições de cultura. Sabe-se que os biofilmes desenvolvidos sob alta radiação luminosa tendem a atingir uma maior espessura e são dominados por algas verdes, por oposição àqueles que se desenvolvem sob baixa radiação que são mais finos e compactos, sendo compostos por uma maior variedade de espécies. Em relação ao desenvolvimento de algas verdes unicelulares, sabe-se ainda que estas se desenvolvem melhor em condições laminares, em detrimento de condições de fluxo turbulento [35]. Ainda no que diz respeito à influência de factores como a velocidade da corrente/agitação/homogeneização no desenvolvimento do biofilme, *Passy e colaboradores (43)* verificaram que estes têm uma ação secundária em sistemas em que o meio é rico em nutrientes. Contudo, se os nutrientes forem o factor limitante para o crescimento da cultura, verifica-se que a velocidade da corrente/agitação/homogeneização assume um papel importante, por proporcionar uma maior absorção dos nutrientes existentes [50].

Ao longo dos anos, vários investigadores observaram padrões de sucessão de algas em superfícies recém-expostas. Algas verdes pequenas, como as dos géneros *Chlorella* e *Scenedesmus*, mostraram ser espécies pioneiras, estando entre os primeiros organismos a fixar-se no biofilme. Os biofilmes maduros são dominados por diatomáceas e, finalmente, por organismos filamentosos (incluindo tanto algas como cianobactérias) [47, 51-53].

A complexidade em termos de riqueza específica é um aspecto extremamente importante na biodiversidade metabólica e adaptabilidade dos biofilmes fototróficos. Para além disso, a utilização de culturas puras ou comunidades bem definidas parece menos atrativa do ponto de vista comercial, uma vez que são mais caras e há menos conhecimento disponível. Assim sendo, a compreensão da ecologia das comunidades de biofilme em culturas de sistemas abertos é essencial para otimizar a produção de biomassa e produtos associados. Com base no objetivo pretendido, é importante selecionar as espécies, e mesmo estirpes, que devem fazer parte do biofilme, como é o caso da produção de lípidos para biocombustíveis.

2.3.2 – Estudos de adesão a substratos com microalgas

Muitos estudos têm sido realizados acerca da influência das propriedades da superfície do substrato utilizado na colonização por algas, contudo, quase sempre com o intuito de evitar a sua adesão e não de a promover. Com efeito, verificam-se consequências negativas quando os biofilmes se formam, por exemplo, nos sistemas de distribuição de água, nos cascos de barcos e nas fachadas de edifícios [2, 54].

A eficácia de qualquer superfície potencialmente anti-incrustante em relação a um agente em particular é caracterizada pelo nível e força de adesão desse agente a essa superfície. O nível de adesão é avaliado através do número de células ligadas à superfície, após um determinado período de tempo. A força de adesão, por outro lado, é determinada pela sujeição dessas células a uma força de corte (muitas vezes os meios que fluem através de uma câmara de escoamento superficial), e calculando a percentagem de células que permanece aderida após um certo período de tempo [55]. A força de adesão varia com a estirpe e com a superfície do substrato, mas sabe-se que uma grande quantidade de microalgas permanece aderida a taxas de fluxo de 200/s [1].

O desenvolvimento eficaz de superfícies anti-incrustantes é desafiante, uma vez que os organismos incrustantes (incluindo algas), produzem substâncias poliméricas extracelulares (EPS) contendo resíduos tanto hidrofóbicos como hidrofílicos. Além disso, as microalgas são capazes de manipular rapidamente a produção destas substâncias em resposta a alterações ambientais [56]. Assim, apesar da hidrofobicidade do substrato ser um factor importante na adesão das microalgas, uma variedade de outros factores tem de ser tida em consideração [57]. Neste contexto, alguns autores tentaram prever a adesão das microalgas a um substrato

através da caracterização da energia livre da membrana de várias estirpes de algas e das superfícies a que se ligariam. Neste trabalho, observou-se a adesão a três dos quatro materiais em estudo (vidro, superfícies revestidas com octadeciltriclorosilano (OTS), hexametildisilazano (HMDZ) e aminopropiltriétoxissilano (APS), de acordo com o esperado. No entanto, verificou-se que a adesão ao APS ocorreu de forma diferente do expectável, tendo sido concluído que as interações eletrostáticas apresentam um papel muito importante em superfícies carregadas positivamente, independentemente da sua hidrofobicidade [1]. Outra possibilidade é de que a produção de EPS por parte das algas pode ter variado de acordo com superfície de adesão, fator que não foi explorado no trabalho citado. Para além disso, noutro estudo onde se procurou relacionar a produção de EPS por parte de diatomáceas com a adesão a diferentes superfícies, desde hidrofóbicas (PTFE) a hidrofílicas (vidro), não foi possível estabelecer essa relação, uma vez que todas as superfícies foram colonizadas [35].

Dada a dificuldade em prever a adesão das microalgas às superfícies, uma abordagem possível passa pelo despiste de uma larga variedade de materiais e/ou fatores que condicionem a adesão. Em 2004, esta experiência foi efetuada utilizando duas espécies: *Chlorella vulgaris* (alga verde) e *Nitzschia amphibia* (diatomácea) [2]. Verificou-se que ambas as espécies aderiram rapidamente ao titânio, aço inoxidável, Perspex, e vidro, enquanto no latão e no cobre se observaram menos células ligadas. De uma maneira geral, a espécie *Nitzschia amphibia* mostrou maior adesão comparativamente a *Chlorella vulgaris*. Experiências posteriores com *Nitzschia amphibia* revelaram que as células aderiam melhor a superfícies rugosas suavemente lixadas, principalmente se fossem colhidas na fase log de crescimento, sendo a adesão mais rápida do que aquelas colhidas na fase estacionária [2].

2.3.3 – Reatores de Biofilme Microalgal

A dificuldade em separar as algas da suspensão é um desafio não só para os sistemas que visam produzir microalgas para fins comerciais, mas também para sistemas projetados para o tratamento de águas residuais. Uma maneira de evitar este problema são os sistemas onde as algas crescem aderidas a uma superfície.

De facto, manter as algas como um biofilme em fotobiorreatores apresenta muitas vantagens. O uso deste tipo de sistema pode diminuir as necessidades energéticas da produção, operar com tempos de retenção hidráulicos (TRH) curtos sem perda de biomassa, facilitar a separação da biomassa das algas a partir da suspensão e, dependendo do material usado como substrato e da configuração do

reactor, pode potencialmente aumentar-se a densidade de células no reactor. Para além disso, a adesão da biomassa a um substrato pode também permitir que o crescimento e a colheita tenham lugar num único reactor, diminuindo assim a área do projecto [58]. Como desvantagens podem referir-se a formação de gradientes para fatores como o pH, os nutrientes e a luz [59].

Apesar dos potenciais benefícios, muito poucos reatores de biofilmes de algas se encontram descritos na literatura, estando essencialmente ligados ao tratamento de águas residuais. Além disso, mesmo a nível laboratorial, poucos sistemas permitem estudar o desenvolvimento e controlo do biofilme através da manipulação de fatores como o inóculo, o tipo de substrato, condições de cultura, etc. Compreender e controlar o impacto desses fatores é fundamental para o desenvolvimento de fotobiorreatores, quer assentes em biofilmes, quer com a biomassa em suspensão. Outras aplicações podem beneficiar deste controlo, nomeadamente aquelas em que a formação de biofilmes de algas é considerada prejudicial [52, 54].

Alguns estudos sugeriram a retenção das células em alginato ou carragenina como uma forma de separar a biomassa da suspensão no tratamento de águas residuais [60, 61]. Contudo, para além de confirmarem a colonização desses materiais com algas, estes estudos não fornecem uma visão mais profunda sobre o desenvolvimento do biofilme. A sua aplicabilidade em sistemas de cultura em grande escala também não se encontra estabelecida.

Um exemplo de reactor de biofilme de algas para o tratamento de águas residuais é o sistema conhecido como um ATS – *Algae Turf Scrubber* (Fig.5).

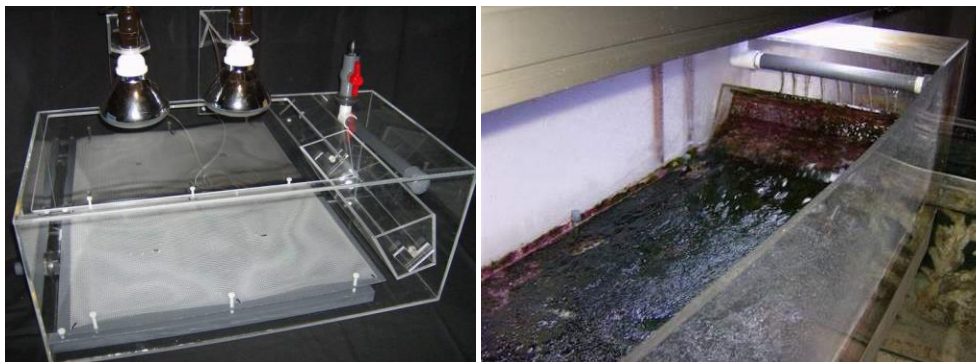


Fig. 5 Exemplo de um ATS – *Algae Turf Scrubber* antes da colonização (à esquerda) e após a colonização com algas (à direita).

Fonte: *The Reef Tank* - <http://www.thereeftank.com/forums/f20/algae-turf-scrubber-108853.html>

Este sistema é composto por um plano inclinado no sentido do fluxo, com um revestimento de polietileno (substrato para a adesão), onde o biofilme que se

desenvolve é colhido por raspagem e por aspiração. O sistema mostrou ser capaz de remover eficazmente o fósforo em efluentes municipais [62]. Um sistema laboratorial semelhante demonstrou não só a redução de azoto e fósforo, mas também de *Escherichia coli* e outros coliformes fecais do efluente municipal testado. Foi sugerido que o aumento do pH e O₂ dissolvido, inerentes à fotossíntese, eram responsáveis tanto pela precipitação do fósforo como pela redução de organismos patogénicos [63]. Contudo, a aplicação do modelo ATS nalguns setores económicos já foi estudada e demonstra não ser rentável, uma vez que os custos associados à circulação da água e à secagem da biomassa algal são maiores do que os proveitos [64].

Enquanto alguns autores usaram inóculos de uma única espécie para desenvolver um biofilme, a maioria simplesmente deixou os microrganismos presentes nas águas residuais formarem o biofilme. Por exemplo, foi desenhado um biorreactor capaz de efetuar a modelação ecológica do biofilme natural. O sistema consiste em vários canais abertos onde o meio circula a uma taxa controlada, com fotodíodos incorporados na base do sistema para medição da atenuação da luz em toda a extensão do reactor. Desta forma, os fotodíodos permitem indicar em tempo real o desenvolvimento do biofilme. Para além disso, este sistema fornece uma imagem completa do desenvolvimento do biofilme, contudo, não faz distinção entre os processos de adesão e crescimento celulares no biofilme [48].

Poucos são os sistemas para produção de óleos a partir de biofilmes de microalgas específicas que se encontram descritos na literatura. Um estudo testou vários materiais como substrato (poliuretano, poliestireno, papelão, etc), imersos numa suspensão de *Chlorella sp.* e efluente de uma vacaria como meio de cultura. Verificou-se neste estudo que as algas aderiram a todos os materiais ao fim de alguns dias, sendo o crescimento mais evidente em espuma de poliestireno. A colheita da biomassa foi realizada por raspagem, e as colónias que permaneciam aderidas no final do processo forneciam o inóculo para novo crescimento (“*regrowth*”) [65]. A máxima produtividade de biomassa foi de 2,57 g.m⁻² d⁻¹, que é baixa quando comparada com o sistema ATS referido acima que mostrou chegar a uma produtividade de 20 g.m⁻² d⁻¹ [35, 63, 65]. No mesmo sistema, a produtividade máxima de ácidos gordos foi determinada como sendo de 0,23 g.m⁻².d⁻¹. Neste estudo, a composição final em espécies da biomassa algal produzida não foi examinada. Uma vez que o efluente não foi esterilizado, não é conhecida a quantidade final de biomassa que resultou da espécie inoculada ou das outras presentes nas águas residuais [65].

Um outro tipo de reator de biofilme muito conhecido é o Reator de Biodiscos ou RBC (Rotating Biological Contactor), o qual tem sido utilizado em águas residuais urbanas e industriais, em sistemas que permitem combinar diminuição da carência bioquímica de oxigénio (CBO), nitrificação e desnitrificação [42]. São considerados sistemas de desenho e operação simples, com pouca ocupação de espaço, baixos custos de operação, manutenção e energia, e de elevada eficiência de tratamento [66]. Um RBC, é normalmente, um sistema de biofilme formado a partir de inóculo natural sobre discos de material liso ou rugoso, colocados em série, e montados sobre um eixo horizontal. Os discos podem estar parcialmente ou totalmente submersos, sendo sujeitos a um movimento rotativo que proporciona ao biofilme um contacto alternadamente com o ar e com a água residual, permitindo a remoção de poluentes e o crescimento do biofilme (**Fig.6**).

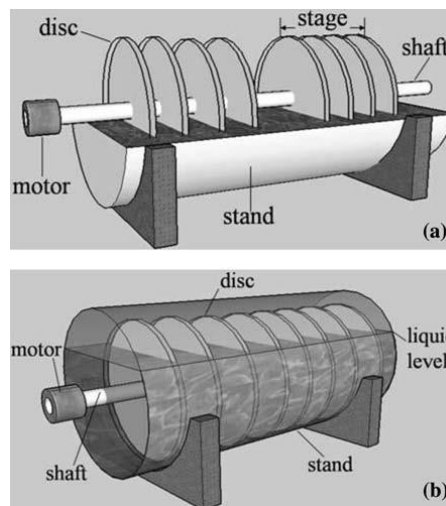


Fig. 6 Esquema simplificado de Reatores de Biodiscos, parcialmente (a) ou quase totalmente submersos (b)

Fonte: Cortez *et al.*, 2008, [66]

Podem controlar-se parâmetros de operação como a velocidade de rotação, as cargas orgânicas e hidráulicas aplicadas, o tempo de retenção hidráulico (TRH), a recirculação, o tipo de discos e a sua submersão, o tipo de biofilme formado, a oxigenação, entre outros [42, 66]. As velocidades de rotação empregues são normalmente baixas (por exemplo 1-10 rpm para discos com 1-4 m diâmetro, montados em eixos com 5-10 m de comprimento [66]), e os RBC estão normalmente dispostos por módulos em série, aumentando-se significativamente a sua eficiência [42].

A utilização deste princípio em reatores de biofilmes fotoautotóxicos encontra-se referida em vários estudos, nomeadamente para a remoção de metais de efluentes

da indústria mineira [67], para tratamento de águas residuais urbanas e produção de biomassa [68] e para obtenção de parâmetros relevantes para o aumento de escala (*scale-up*) com máxima produtividade de biomassa [69]. Estes sistemas basearam-se em biofilmes naturalmente desenvolvidos (microrganismos autóctones e biofilmes multiespecíficos) ou foram inoculados com microalgas específicas [67-69].

Apesar das diferenças em nomenclatura (PRBC – *Photorotating biological contactor*, RABR – *Rotating algal biofilm reactor* ou *Algidisk reactor*), todos os sistemas referidos empregam discos que efetuam uma entrada vertical no tanque onde se encontra a água residual ou o meio nutritivo, à semelhança dos RBC dos sistemas de tratamento de águas residuais. Uma variante encontra-se no sistema RAB (*Rotating algal biofilm*) descrito por Gross e colaboradores [70]. Diversos aspetos foram estudados, especialmente ligados ao estabelecimento do biofilme e ao crescimento das microalgas aderidas aos suportes. Destacam-se parâmetros como o material dos discos utilizados e sua rugosidade, velocidade de rotação usada, intensidade luminosa, meio nutritivo, concentração de CO₂ e colheita da biomassa produzida [67-70].

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos de fontes especializadas (Merck, Sigma-Aldrich, Panreac), de modo a minimizar fontes de variabilidade nas características dos meios de cultura e, logo, das condições de crescimento.

3.2 – Origem do inóculo

O inóculo utilizado foi a espécie *Chlorella vulgaris* fo. *viridis* [71] obtida inicialmente por compra a partir da algoteca SAG - Sammlung von Algenkulturen (Culture Collection of Algae) Göttingen, Alemanha, sendo fornecida como cultura axénica, em meio ESP Ag. A microalga usada, catalogada como estirpe SAG 211-12 (**Fig.7**), foi isolada antes de 1934 de local desconhecido, depositada por E. G. Pringsheim em 1954, e está considerada como sendo idêntica às estirpes CCAP 221/12, UTEX 30 e ATCC 16487. Pertence à Divisão Chlorophyta, Classe Trebouxiophyceae e é uma estirpe autêntica de *Chlorella vulgaris* com habitat geral de água doce [72].

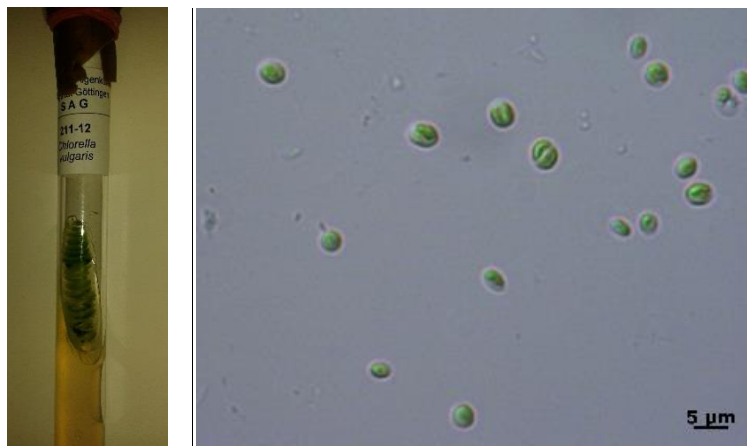


Fig. 7 *Chlorella vulgaris* SAG 211-12 (DIC, 400x1,6)

Trata-se de uma estirpe cuja utilização tem sido referenciada em trabalhos de âmbito muito diverso, desde testes de toxicidade [73], fouling de edifícios [74], e produção de lípidos [75]. Foi objeto de vários estudos no ISEP, Instituto Superior de

Engenharia do Porto, Departamento de Engenharia Química, no âmbito da produção de lípidos para biocombustíveis, sendo mantida em meio BBM-3N para maior produção de biomassa [76].

Não foram encontradas referências a estudos sobre adesão desta microalga a substratos nem sobre a sua produção em reatores de biofilme microalgal.

Uma vez trazida para o DB-FCUP, foi aclimatada ao meio sintético BBM (Bold Basal Medium, menos rico em N [24], composição no **Anexo I**, aconselhado para manutenção de Clorófitas. Esta modificação no meio de cultura da espécie foi efetuada no pressuposto de que, por um lado, a adesão é favorecida pelo stress nutricional e que, por outro, com um nível mais baixo de N a produção de lípidos pela microalga seria mais facilmente induzida [75]. Finalmente, sendo o meio BBM muito referido na literatura, seria mais fácil a comparação com estudos de outros autores. Um aspeto da microalga em estudo, após aclimação, pode encontrar-se na fotografia da **Fig.7** acima (microscópio Axiophot-Zeiss-Germany, com Contraste por Interferência Diferencial-DIC).

3.3– Instalações experimentais e condições de crescimento

Todos os ensaios foram efetuados em laboratório, em pequena e média escala, tendo havido necessidade de desenvolver um sistema de bancada, portátil, que garantisse iluminação adequada às culturas de pequeno e médio volume nas diferentes fases de experimentação.

A iluminação, colocada de modo a incidir superiormente nas culturas, foi conseguida com 2 lâmpadas fluorescentes de 18W T12 Cool White Sylvania inicialmente, sendo depois colocadas mais 2 lâmpadas 18 W Duralight tld (T8). Para garantir o máximo aproveitamento da luz incidente, foram colocados reflectores curvos na parte superior da câmara (inicialmente um refletor pequeno e depois um de maiores dimensões) e as paredes laterais, amovíveis, foram revestidas a papel de alumínio. A base, normalmente um agitador oscilante, não foi revestida para não se perder o efeito antiderrapante. A versão final do sistema encontra-se na **Fig.8**.

Foi colocado um recipiente fechado contendo água e um termómetro de aquário no interior da incubadora de bancada, para permitir uma aproximação à temperatura existente no interior das culturas líquidas (**Fig.8**, ao fundo).



Fig. 8 Imagem ilustrativa da câmara de iluminação de bancada laboratorial construída para ensaios com microalgas. Notar os painéis refletivos laterais amovíveis e o defletor superior para maximização da iluminação.

3.4 - Meios e Condições de manutenção das culturas

O meio de cultura utilizado foi BBM [24], conforme referido acima, com força total ou diluído a 1/10 ou 1/2 quando necessário. Posteriormente foi ensaiado um efluente cervejeiro simulado, segundo Mata e colaboradores [77], mas devido a problemas de contaminação das culturas num período de temperatura muito elevada, a sua utilização não foi continuada.

As culturas microalgais de stock foram mantidas em BBM, em tubos com tampa roscada de volume 15 mL, com repicagens frequentes sob condições de assepsia, utilizando um volume de inóculo de 10%. Para arranque rápido de culturas em maior volume foram também mantidos stocks em matrizes Erlenmeyer de 100 mL com tampas de celulose (Plugs Roth para tubos, Ref PC21.1) e 50 mL de cultura.

Os stocks microalgais foram colocados à luz e temperatura ambiente, sem agitação, e quando era necessário um arranque rápido os stocks em matrizes foram mantidos com agitação a 40 r.p.m. em plataforma oscilante STUART SCIENTIFIC (modelo 5STR8), à temperatura ambiente. Este conjunto foi colocado na câmara de iluminação referida anteriormente (**Fig.8**). Foi fixado um ciclo nictemeral de 12h D:12hN com auxílio de um temporizador (Coati-SimonBrico, S. L., Barcelona). Os valores de intensidade luminosa ao nível da plataforma oscilante variaram entre 2500 a 3000 lux (2 lâmpadas) e 4000 a 6000 lux (4 lâmpadas). A temperatura ambiente média mensal no laboratório variou entre 19 ± 2 °C nos períodos mais frios e 22 ± 2 °C

nos períodos mais quentes. Pontualmente foram registados valores extremos de 16,5 °C (inverno) e 26 °C (verão).

Para evitar contaminações, todo o material laboratorial e material de vidro foi lavado com água e detergente comercial, seguido de água destilada e autoclavagem a 121 °C por 20 min.

3.5 – Estudo da cinética de crescimento em condições padrão

Para o estudo da cinética de crescimento em batch em meio BBM foram utilizados sequencialmente matrizes de volume 100 mL, 500 mL e 1000 mL, cheios até metade do seu volume. Estes ensaios foram feitos em triplicado ou quadruplicado e inoculados com volumes definidos de inóculo de modo a que a concentração inicial das culturas fosse de $1,5 \times 10^6$ células por mL. Os matrizes foram mantidos nas condições ambientais referidas acima, exceto quanto a agitação, que foi conseguida com a plataforma oscilante para o volume mais baixo ensaiado e para os maiores volumes com arejamento contínuo por ar filtrado (Filtros MILLIPORE FG, diâmetro 6 cm $0,2 \mu\text{m}$ de poro). O ar foi fornecido por uma bomba para aquariologia (RESUN – Air Pump, AC-9904), e o volume de ar injectado variou entre 11,4 e 17,5 mL/s), conforme **Fig.9**.

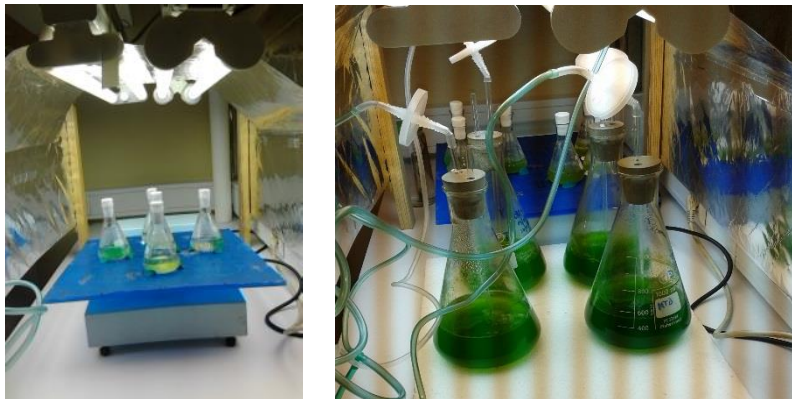


Fig. 9 Culturas de *Chlorella vulgaris* em volumes crescentes, sem arejamento à esquerda e com arejamento à direita .

A concentração das algas nos inóculos e a evolução das culturas foram avaliadas por densidade ótica (DO), contagem celular e biomassa seca, conforme será descrito na seção referente aos métodos analíticos. Foi feita a análise do

crescimento através de gráficos de concentração celular, DO e de pH em ordem ao tempo e a taxa de crescimento (μ , d^{-1}) foi avaliada.

3.6 - Substratos testados e ensaios de adesão

3.6.1 – Substratos utilizados

Os materiais utilizados nos ensaios de adesão foram selecionados atendendo a características como comportamento hidrofílico/hidrofóbico, não toxicidade, facilidade de obtenção e de manuseamento. Os materiais escolhidos foram: vidro borossilicato (VD, transparente), espuma de poliuretano (PU, branco, opaco, poroso), policloreto de vinilo (PVC, cinzento escuro, opaco), aço inoxidável (IX, chapa lisa 0,5 Inox 25x50 FM, opaco, brilhante), polietileno (PE, transparente) e polipropileno (PP, transparente). À exceção do vidro (lâminas com dimensões padrão de 7,6 cm x 2,6 cm x 0,1 cm), os restantes materiais foram cortados no laboratório em coupons com dimensões de 2 cm x 2 cm e com espessura variando entre 0,05 cm e 0,4 cm. Quanto à sua origem, o inox foi especificamente adquirido atendendo a ser referenciado por diversos autores, sendo os restantes materiais ou consumíveis de laboratório (lâminas de microscopia em vidro ou placas de Petri em PE) ou de reutilização (caixas de PP alimentar, PVC de montagens laboratoriais anteriores e PU de desperdício de material de embalagens). Estes materiais sendo reutilizados, fáceis de obter e de manipular, e não tóxicos, reuniam características adequadas a possível utilização em reatores de biofilme como são os sistemas de Biodiscos.

3.6.2 – Ensaios preliminares

Ensaio 1 - De modo a obter uma avaliação preliminar da capacidade de adesão da estirpe de *Chlorella vulgaris* em estudo foram empregues lâminas de vidro borossilicato, sem e com bordo esmerilado, em duplicado, colocadas numa tina de coloração, também de vidro. Usaram-se 80 mL de meio BBM, o inóculo foi de 1 mL de células de cultura em fase exponencial e o conjunto foi tapado com parafilme perfurado e colocado na incubadora de bancada iluminada, em plataforma oscilante, a 50 rpm, sob 12hD:12hN, e temperatura ambiente ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), **Fig.10**. O ensaio teve a duração de 30 dias e a existência de adesão foi avaliada visualmente e à lupa (Leica MZ75). Outros possíveis substratos de adesão foram também avaliados, sem agitação

(Fig.10), sendo escolhidos, face à observação visual dos resultados obtidos, o vidro e o PVC para continuação dos trabalhos. Deste modo, foi ensaiada em paralelo a capacidade de adesão ao vidro (lâminas de microscopia de bordo esmerilado) e ao PVC (cinzento, 6 mm espessura) em placas de Petri com BBM. As condições do ensaio foram idênticas às anteriormente referidas, tendo todo o material sido previamente esterilizado com álcool ou em autoclave, quando aplicável.



Fig. 10 Montagem para avaliação preliminar da capacidade de adesão de *Chlorella vulgaris* a diferentes substratos (vidro, centro da plataforma oscilante) e outros materiais (à direita).

Ensaio 2 - Numa segunda fase de testes foram usados como substratos Policloreto de Vinilo (PVC,), espuma de poliuretano (PU) e Vidro (VD, lâminas de microscopia). Estes substratos foram esterilizados com álcool a 70% e fixados individualmente com silicone para aquariologia, marca Soudal Silicone Aquário Transparente, em tinas de vidro, também esterilizadas com álcool. Foram usados 40 mL de meio BBM/10 (para limitar o crescimento e favorecer a adesão [2]), inoculados de forma a obter-se uma densidade ótica (DO_{680nm}) inicial de 0,03, sendo as tinas colocadas em plataforma oscilante a 40rpm, sob 12hHD:12hN e 21-23 °C (ar) ou 19-21 °C (água) (**Fig.8**). Um controlo sem substrato foi colocado nas mesmas condições. O ensaio teve a duração de 6 dias e a existência de adesão foi avaliada por observação direta dos substratos e por avaliação da variação da DO_{680} dos meios (amostras de 1 mL e leitura em cuvetes com 10mm trajeto ótico em espectrofotómetro THERMO SCIENTIFIC, Genesys 6).

Foram também obtidas imagens finais dos substratos colonizados por digitalização em Scanner EPSON WF-3520, segundo metodologia baseada em [46].



Fig. 11 Ensaio preliminares de adesão. Da esquerda para a direita: PVC (1), Espuma de Poliuretano (2) e Vidro (3). O recipiente 4, ao fundo, é o controlo sem substrato.

3.6.3 – Ensaio de imobilização em batch em condições controladas

Ensaio 1 - Face aos resultados preliminares obtidos, e ainda com base na literatura consultada e na possibilidade de utilização futura num Bioreator, para os ensaios de adesão sob condições controladas foram escolhidos os substratos Policloreto de Vinilo (PVC), aço inoxidável (INOX), Poliestireno (PE) e Polipropileno (PP). A avaliação da adesão foi efetuada seguindo um protocolo adaptado de [2, 35, 65], monitorizando-se a variação da Densidade Ótica no meio e contando o número de células firmemente aderidas aos coupons após determinados períodos de tempo. Este ensaio foi dividido em duas fases, uma destinada à avaliação da adesão e a outra à avaliação do crescimento do biofilme microalgal.

1ª Fase: Para estudo da adesão, quatro coupons de cada material foram colocados em Placas de Petri de vidro (10 cm Ø, 1,5 cm profundidade), com tampa, em duplicado (colocadas aleatoriamente, atingindo-se a lotação máxima da plataforma oscilante). Para a fixação dos coupons às placas usou-se uma gota de silicone para aquariologia, da marca Sovetal (**Fig.12**). Todo o material usado foi previamente desengordurado com detergente comercial e desinfetado com álcool a 70%. Verteram-se 30 mL de meio BBM/10 em cada placa, sendo a inoculação efetuada com 1×10^6 células/mL (DO_{680nm} inicial de 0,05, de acordo com o descrito em [2]),

provenientes de cultura aclimatada a BBM nas condições referidas anteriormente. Prepararam-se igualmente brancos sem coupons. Amostragens foram efetuadas ao fim de 48h (só coupons PE), 72h e 144h (todos os substratos) de incubação, medindo-se a DO_{680nm} .

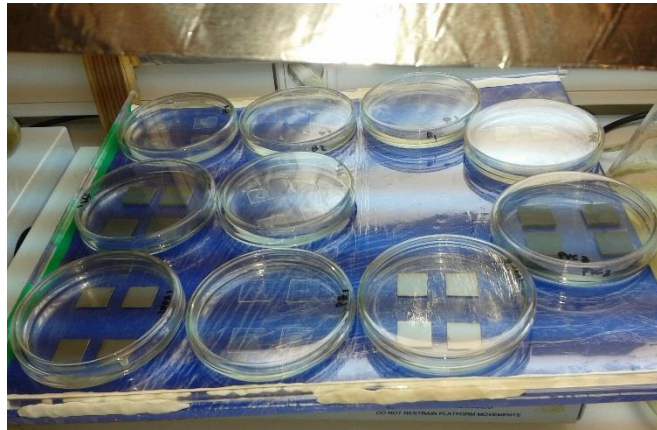


Fig. 12 Montagem experimental para estudo da adesão a diferentes substratos.

Após verificação ao microscópio ótico (Leitz, Germany), da existência de células firmemente aderidas (i.e., fixas ao suporte mesmo após lavagem vigorosa com água desionizada), as células aderidas à parte superior de cada coupon foram removidas com um raspador (VWR) para 1 mL de água desionizada, em placas de Petri (Fig.13) e daí transferidas para tubos Eppendorf. Após homogeneização em vórtex (VWR, velocidade máxima/10 s) foram efetuadas contagens das células aderidas em câmara de Neubauer. Quando necessário, as amostras foram fixadas com Lugol, concentradas por centrifugação (10 000 r.p.m./3 min, [78]) em centrífuga (ScanFuge Mini), e guardadas a 4°C para posterior processamento (Fig.13)



Fig. 13 Obtenção de amostras dos ensaios de adesão em *coupons* para contagem celular.

2ª Fase: De seguida, o desenvolvimento do biofilme formado sobre os coupons foi promovido renovando duas vezes o meio contido em cada placa (ao 6º dia de experiência e ao 10º dia), sendo usado BBM na concentração normal e continuando a incubação dos coupons sobranes da experiência anterior, nas mesmas condições referidas, com amostragens às 240h e 312 h.

Ensaio 2 – Neste ensaio, o efeito do aumento do número de replicados foi avaliado para os substratos PVC e PP. Utilizaram-se as condições experimentais referidas no ensaio anterior-1ª Fase, mas com placas de Petri em triplicado. Também o efeito da diminuição da intensidade luminosa na adesão foi testado para o substrato PVC, em placas com (2000 lux) e sem (3000 lux) cobertura de plástico adicional (**Fig.14**). Efetuaram-se amostragens para DO_{680nm} e contagem de células firmemente aderidas às 72h e 144h.

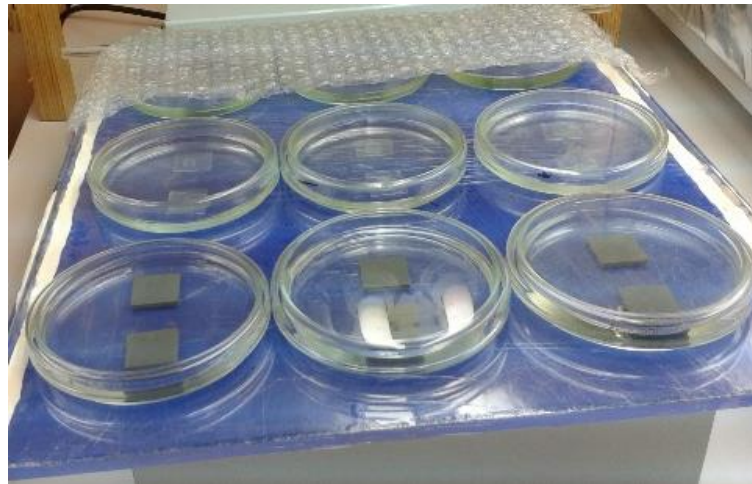


Fig. 14 Ensaio de adesão a PVC e PP sob diferentes condições de intensidade luminosa para o substrato PVC.

Ensaio 3 – O substrato com boa capacidade de adesão e com maior potencial para uso em Bioreator, o PVC, foi utilizado num ensaio preliminar, em maior escala, com placas de 10,6 cm x 21 cm x 0,4 cm (**Fig.15**), colocadas nas condições ambientais anteriormente referidas e sujeitas a um movimento de vai-e-vem na plataforma oscilante (apenas a 15 rpm, para evitar derrame do meio). Seguiu-se protocolo idêntico ao dos ensaios com coupons: inoculação em BBM/10 e mudança posterior para BBM, com raspagem no final da experiência e pesagem da biomassa obtida

(após secagem em estufa, a 80 °C, durante a noite). Com estes ensaios procurou-se obter informações úteis para o desenvolvimento de um bioreator de biofilme microalgal.



Fig. 15 Ensaios preliminares de colonização de PVC em maior escala.

3.7 – Protótipo de reator de biofilme microalgal

Uma vez observada a adesão e formação de biofilme, o objetivo seguinte deste trabalho era o desenvolvimento de um bioreator onde *Chlorella vulgaris* SAG 211-12 crescesse imobilizada e de tal forma que fosse fácil a colheita posterior da biomassa. Dado que o modo de crescimento iria ser fotoautotrófico, a maximização da exposição à luz era uma questão importante a considerar. O meio de crescimento escolhido foi BBM para uniformização das condições experimentais. Os ensaios preliminares decorreram à temperatura ambiente (época de verão, 22 ± 2 °C), e nas condições de iluminação referidas nas experiências anteriores.

Com base nos resultados das experiências anteriores e após estudo da literatura da especialidade, optou-se pelo desenho de um bioreator do tipo Biodisco, mas com Placas retangulares de PVC, em vez de discos. Criou-se também um sistema de fixação que permitia a fácil retirada das placas. Testaram-se 2 tipos de placas, de 43 cm (C) x 8,3 cm (L) x 0.5 cm (E), em duplicado: em PVC normal e em PVC lixado (lixa de areia nº 120), de modo a tornar a superfície de adesão mais rugosa.

A construção do bioreator e o seu ensaio foram efetuadas em várias fases, melhorando-se o desenho por experiência e erro, já que não existiam “guidelines” apropriadas na literatura. Uma amostra dos trabalhos efetuados pode ver-se na Fig.16.



Fig. 16 Construção do protótipo de Bioreator de Biofilme Microalgal em Placas e ensaios de estanquicidade e robustez.

Uma avaliação preliminar da adesão e crescimento do biofilme foram efetuados seguindo o protocolo desenvolvido nos ensaios com coupons.

Assim, numa 1ª Fase, preparou-se um inóculo de *Chlorella vulgaris* em fase exponencial de crescimento por aumento sequencial de volume de cultura em meio BBM. Desinfetou-se o bioreator com álcool a 70%, colocou-se na incubadora sob luz fluorescente e regime 12hD:12hN e encheu-se com 8 L de meio BBM/10. Para inoculação, usaram-se 600 mL da cultura de *Chlorella vulgaris* com $DO_{680nm} = 0,05$. Ligou-se o motor, que proporcionou um movimento rotativo das 4 placas da ordem das 2,8 rpm. Nesta fase inicial, por motivos logísticos, o motor do bioreator era desligado 15 min em cada hora de funcionamento (por meio de um temporizador) e também durante a noite. Esta paragem coincidia com a fase OFF da iluminação. Foi colocado arejamento no reator (ar filtrado a 0,2 μm , em bolha fina), para melhorar as condições de fornecimento de CO_2 às microalgas e diminuir a sua sedimentação. A existência de adesão foi verificada, nesta fase, apenas por observação e registo fotográfico do aspeto das placas ao longo do tempo. Numa 2ª Fase, esvaziou-se o reator, lavou-se com água destilada e encheu-se com BBM/2. As placas foram retiradas com cuidado, não foram lavadas e recolocaram-se no sistema. Efetuou-se nova inoculação (500 mL cultura com DO_{680nm} de 0,05) e mantiveram-se as condições ambientais da fase anterior. Ao longo deste ensaio foram efetuadas adições regulares de meio BBM/2 (200 mL) e compensada a evaporação observada com água destilada autoclavada. A formação do biofilme foi registada fotograficamente. Ao fim de 18 dias as placas de PVC foram raspadas, a sua biomassa seca em estufa a 80°C durante 24 horas e determinado o seu peso.

3.8 - Métodos Analíticos

3.8.1 – Contagem Celular

As contagens celulares foram realizadas em hemocitómetro com a profundidade de 0,1 mm (câmara de Neubauer com Improved Brightline) e um microscópio Leitz, com ampliação de 400x. A câmara foi enchida com amostra diluída (ou concentrada por centrifugação), homogeneizada em vortex (VWR, velocidade máxima) e, de acordo com a densidade existente, o número de células no quadrado central ou em toda a câmara foram avaliados, sendo o cálculo da densidade final efetuado de acordo com [24]. As contagens foram efetuadas em cada amostragem até a obtenção de pelo menos três valores que não diferissem mais de 10% entre si.

3.8.2 – Densidade Ótica (DO)

Amostras das culturas microalgais foram diluídas sempre que necessário e colocadas em cuvettes de volume 5 mL ou 1 mL e 1 cm de trajeto ótico, lidas num espectrofotómetro Thermo Scientific, modelo Genesys 6. O crescimento foi seguido medindo a absorvância a 680 nm (comprimento de onda da clorofila a, segundo [24, 78]).

O valor de absorvância foi correlacionado com a concentração celular obtida por contagem. Os dados selecionados para a construção das retas de calibração para os diferentes matrizes encontram-se no **Anexo II**.

Em cada série experimental efetuada as densidades celulares dos inóculos utilizados foram avaliadas de acordo com esta reta.

3.8.3 – Medida da Biomassa seca

Medidas do Peso seco das culturas e do biofilme produzido foram realizadas quando necessário segundo um protocolo adaptado de (72). Filtros de fibra de vidro Whatman GF/F (0,45 µm) foram utilizados, dado o pequeno diâmetro das células. Foram filtrados em duplicado 10-20 mL de suspensão microalgal, com lavagem com água destilada, secos em estufa a 80°C durante a noite até peso constante, arrefecidos em exsiccador e pesados em balança analítica (KERN ABS 220-4). Brancos foram preparados segundo o mesmo protocolo.

A reta de calibração peso seco - densidade ótica foi obtida pesando em triplicado o filtrado de 3 diluições diferentes de solução da cultura, sendo a densidade ótica

medida para cada diluição. Desta forma procurou-se diminuir o erro associado à pesagem de uma única concentração, seguindo as instruções de [78]. Os dados usados para a reta de calibração obtida podem ser observados no **Anexo III**.

3.8.4 – Medição da intensidade luminosa

A intensidade da luz utilizada foi medida com recurso a um luxímetro (LUTRON Bioblock Scientific) e a um medidor PAR (Universal Light Meter ULM-500, WALZ, com Spherical Micro Quantum Sensor US-SQS/L).

3.8.5 – Avaliação da adesão celular aos substratos e formação de biofilme

Conforme referido anteriormente, a avaliação da existência de adesão celular aos substratos foi efetuada contando as células firmemente aderidas aos vários materiais após um certo período de tempo. Estas medidas foram acompanhadas da avaliação da densidade ótica das suspensões obtidas após raspagem dos suportes, para confirmação de tendências.

A medida da densidade ótica da biomassa ainda em suspensão nos recipientes experimentais foi também efetuada, para os mesmos períodos de tempo utilizados para as contagens, de modo a avaliar o comportamento das células não aderidas.

Efetuaram-se também digitalizações de suportes e de coupons colonizados para melhor visualização da adesão.

O biofilme acumulado em ensaios preliminares em maior escala e no bioreator desenvolvido foi avaliado como biomassa seca.

3.9 - Análise estatística

Os ensaios efetuados foram realizados em duplicado ou triplicado e os resultados encontram-se representados graficamente. No caso dos ensaios realizados em duplicado, os resultados encontram-se representados por pontos ou sob a forma da média dos valores obtidos para os diferentes parâmetros analisados. Os resultados dos ensaios realizados em triplicado encontram-se expressos como média \pm desvio padrão, e a análise estatística foi realizada com recurso ao *software GraphPad Prism 6* (Graphpad Software, Sorrento Valley, CA, USA). Após a realização do teste preliminar à normalidade dos dados (teste *Shapiro Wilk*), foram usados os testes não paramétricos de *Mann-Whitney* para a comparação entre dois grupos de amostras

independentes, e o teste de *Kruskal-Wallis* seguido do teste *post hoc* de *Dunn* para comparações múltiplas. Todos os testes foram usados para analisar os dados com um intervalo de confiança de 95%, para um nível de significância (p) de 0,05.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 – Aclimação de *Chlorella vulgaris* SAG 211-12 ao meio BBM

As microalgas *Chlorella vulgaris*, estirpe 211-12, foram sujeitas a um processo de aclimação ao meio BBM em tubos de ensaio de 15 mL e em matrizes de 100 mL, (Fig.17). Em ambos os volumes, foram realizadas 3 repicagens até que a aclimação das algas fosse considerada completa (cerca de 1 mês). Os tubos de ensaio ficaram expostos à luz natural e sem agitação, enquanto os matrizes foram deixados na câmara de iluminação com fotoperíodo de 12hD:12hN e com agitação constante (40 oscilações por minuto).



Fig. 17 Aclimação das algas *Chlorella vulgaris* SAG 211-12 ao meio BBM

Este procedimento foi necessário devido ao facto de a microalga em estudo provir de um meio de cultura diferente do utilizado neste estudo. A mudança das características do meio de cultura de uma microalga requer a depleção das suas reservas intracelulares iniciais para os diferentes nutrientes e a adaptação da sua maquinaria fisiológica ao novo meio [79]. No presente caso, o meio de origem diferia essencialmente no teor de N, e por isso 3 repicagens foram consideradas suficientes para aclimação. A aclimação decorreu como esperado, e após as 3 repicagens efetuadas foi dado início ao aumento de escala das culturas.

4.2 – Cinética de crescimento em BBM e aumento de escala

O crescimento das algas foi avaliado pela variação do número de células e pela variação da absorvância das suspensões microalgais ao longo do tempo. Foram usados matrizes de 100, 500 e 1000 mL de capacidade com 50, 250 e 500 mL de meio, respetivamente e a mesma concentração celular inicial em cada um (**Fig.18** a **Fig.20**). A densidade celular na fase exponencial foi usada para calcular a taxa de crescimento (μ , d^{-1}), de acordo com [24].

A fase exponencial de crescimento das algas ocorreu nos dois a três dias seguintes à inoculação, para os matrizes de 500 mL e 1000 mL; no entanto, para os matrizes de 100 mL isto só se observa após uma semana (**Fig.18**).

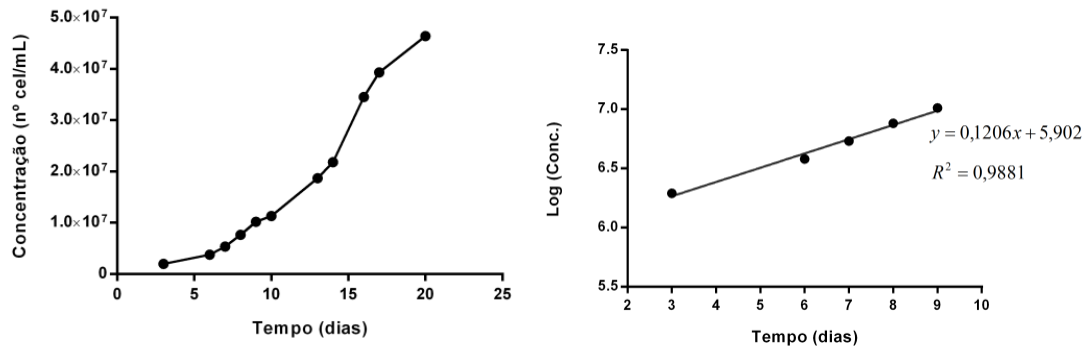


Fig. 18 Variação da concentração celular em função do tempo (esquerda) e recta do logaritmo da concentração de células em função do tempo (direita), para os matrizes de 100 mL com 50 mL de cultura

As algas inoculadas em 50 mL de meio (matrizes de 100 mL) mostraram um crescimento lento, mas por um longo período de tempo, bastante superior ao que acontece com outros volumes, de acordo com o que seria expectável, já que não foram mantidas com arejamento. As concentrações celulares máximas obtidas no decorrer de cada experiência para os diferentes volumes de cultura foram de 4.6×10^7 células/mL aos 20 dias de cultura nos matrizes 100 mL, 9.3×10^6 células/mL ao 6º dia para os matrizes de 500 mL e 4.64×10^7 células/mL, 6 dias após o início da cultura nos matrizes de 1000 mL.

De realçar que em todos os casos se verifica uma taxa crescimento sucessivamente maior à medida que o volume do matraz utilizado para o crescimento aumenta (**Fig.18** a **Fig.20**), tendo-se obtido o μ máximo de $0.15 d^{-1}$ para os matrizes de 100 mL ao 8º dia, μ máximo de $0.26 d^{-1}$ para as culturas nos matrizes de 500 mL e μ máximo de $0.68 d^{-1}$ para as culturas nos matrizes de 1000 mL, ambos ao 2º dia de

cultura. Os dados que serviram de base para a construção das rectas das **Fig.18** a **Fig.20** encontram-se no **Anexo II**.

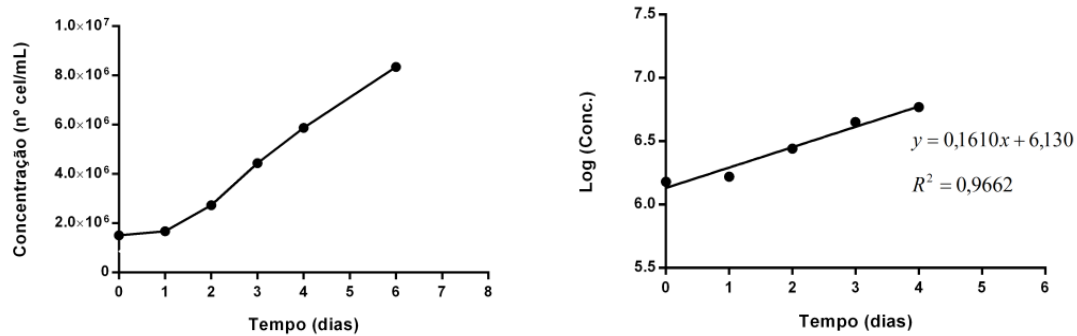


Fig. 19 Variação da concentração de células em função do tempo (escala aritmética à esquerda e escala logarítmica à direita), para os matrazes de 500 mL com 250 mL de cultura

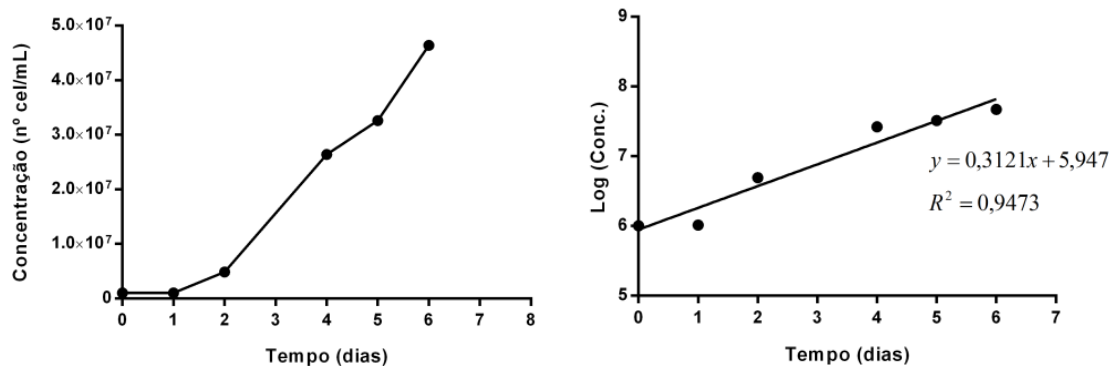


Fig. 20 Variação da concentração de células em função do tempo (esquerda) e recta do logaritmo da concentração de células em função do tempo (direita), para os matrazes de 1000 mL com 500 mL de cultura.

Uma análise comparativa dos valores de crescimento obtidos neste trabalho com a literatura é dificultada pelo fato de serem geralmente usadas estirpes diferentes da usada neste trabalho e condições de cultura igualmente diferentes. Contudo, um estudo recente usou também a estipe *Chlorella vulgaris* SAG 211-12 em matrazes de 2000 mL (inoculados até metade da sua capacidade), arejamento com 5% CO_2 , iluminação de $250 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 20°C , sendo que culturas em efluente sintético mostraram μ de $0,648 \text{ d}^{-1}$ e em efluente real, μ igual a $0,48 \text{ d}^{-1}$. Estes dados apontam para uma maior capacidade de crescimento desta microalga sob condições de cultura mais favoráveis como as que se verificam quando se utiliza um efluente sintético [80].

Para os matrizes de maior volume, e que evidenciaram uma maior taxa de crescimento, foi avaliada a correlação entre a concentração de algas e a absorvância (a 680_{nm}) medida no meio. Com os dados adquiridos foi possível construir uma recta que pode servir de base, em cada uma das situações, para extrapolar valores de concentração de células a partir da leitura da absorvância das suspensões celulares (**Fig.21**). Os dados utilizados encontram-se no **Anexo II**.

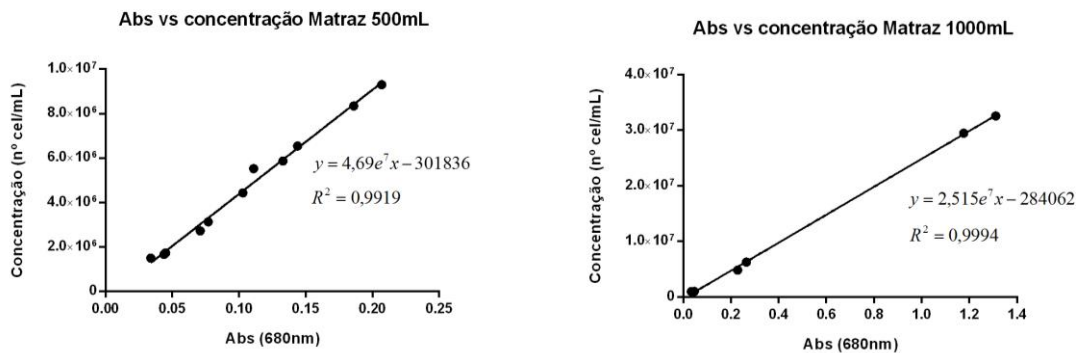


Fig. 21 Relação entre concentração celular e absorvância das suspensões celulares em volumes de 250 e 500 mL de meio, inoculados em matrizes de 500 mL (esquerda) e 1000 mL (direita).

Avaliou-se também a evolução do pH do meio de cultura ao longo do tempo nos matrizes de 1000 mL de modo a determinar a partir de que dia o pH poderia ser um fator limitante para o crescimento uma vez que, como está descrito na literatura, em meio de cultura com pH acima de 8 a microalga *Chlorella* apresenta menor taxa de crescimento. Verificou-se que a partir do dia 4, o pH do meio de cultura era superior a 8 e no dia 6 este era superior a 9, de acordo com o gráfico representado na **Fig.22**. Estes dados mostram que rapidamente a cultura atinge valores de pH desfavoráveis ao crescimento das algas. Um outro estudo revelou que o pH ótimo para o crescimento das algas é de 6,5, sendo reduzido acima e abaixo destes valores. Contudo, de acordo com o mesmo autor, a produção de lípidos é favorecida quando o pH do meio atinge valores próximos de 8 [21].

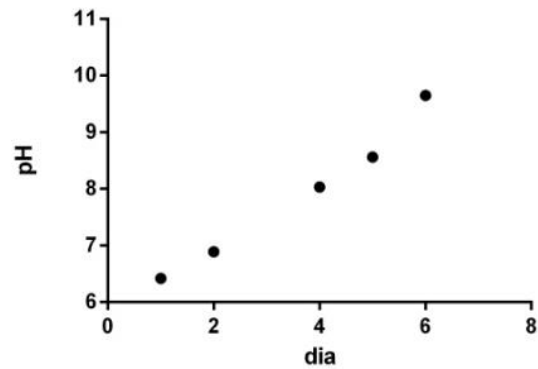


Fig. 22 Evolução do pH da cultura em função do tempo para os matrazes de 1000 mL.

4.3 – Avaliação da biomassa seca e sua relação com a absorvância

O peso seco da biomassa obtida nos matrazes de 1000 mL foi medido e relacionado com respetiva a absorvância, e encontra-se traduzido no gráfico da **Fig.23**. Esta relação é importante para posteriormente se poder determinar de forma rápida e eficaz o peso seco das culturas a partir dos valores de DO_{680nm} . De notar que os coeficientes da recta obtida comparam favoravelmente com a recta descrita na literatura por outros autores para a mesma estirpe cultivada em efluente sintético (Y (Biomassa, g/L) = $0,31 DO_{680} + 0,003$, $R^2 = 0,994$) [80].

Os dados que serviram de base para a construção da referida relação encontram-se no **Anexo III**.

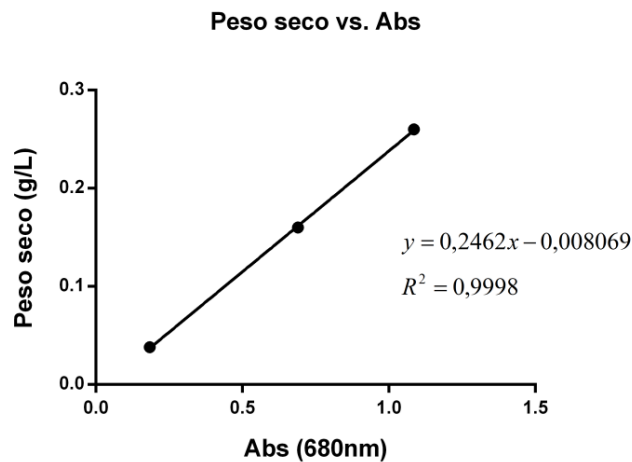


Fig. 23 Relação entre o peso seco e a absorvância (DO_{680nm}) da biomassa da microalga *Chlorella vulgaris* SAG 211-12 em BBM.

4.4. Ensaios de Adesão e formação de Biofilme

4.4.1 Observação inicial da capacidade de adesão

Conforme referido anteriormente, não havia conhecimento prévio acerca da capacidade de adesão a substratos da estirpe de *Chlorella vulgaris* utilizada. Contudo, durante os ensaios de crescimento em volumes crescentes observou-se a sua aderência ao vidro dos matrizes de cultura (**Fig.24**). Sendo o vidro um material de baixa hidrofobicidade, quando comparado com materiais plásticos como, por exemplo, polietileno ou polipropileno [35] a adesão de microrganismos à sua superfície é mais difícil, podendo mesmo não ocorrer. Neste caso, a adesão ao vidro foi logo desde início verificada, sendo este material um substrato de adesão a explorar.



Fig. 24 Adesão de *Chlorella vulgaris* SAG 211-12 ao vidro dos matrizes de 100 mL.

Assim, o passo seguinte consistiu na confirmação da capacidade de adesão ao vidro pela microalga utilizada, usando lâminas de microscopia e condições mais controladas. Confirmou-se à lupa a existência de colonização (o que pressupõe adesão inicial e crescimento), logo ao 3º dia de incubação, estando as microalgas aderidas principalmente na interface meio BBM-ar e principalmente nas lâminas com bordo esmerilado (superfície mais rugosa). Uma amostra do aspeto das lâminas antes e após colonização pode ser observada na **Fig.25**.

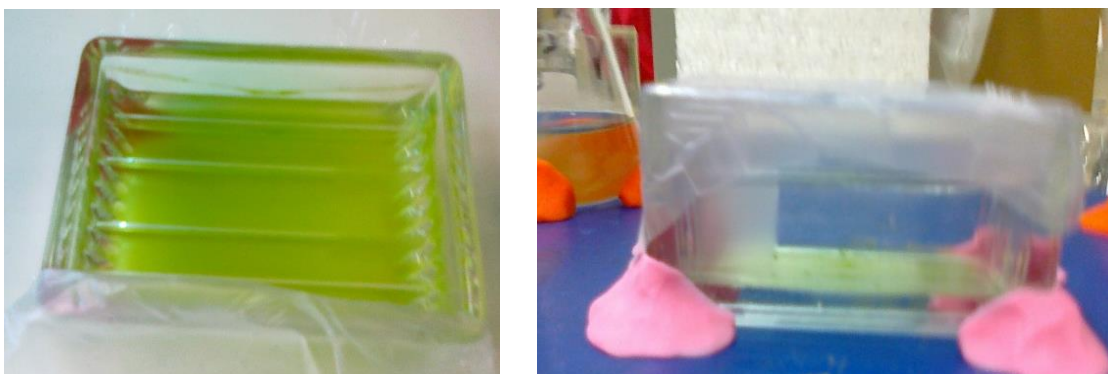


Fig. 25 Resultados da avaliação preliminar da capacidade de adesão de *Chlorella vulgaris* SAG 211-12 ao vidro. À esquerda observa-se o aspeto no início do ensaio, e à direita o aspeto após verificada a colonização.

Como se tinha observado a existência de evaporação considerável no ensaio anterior, os ensaios seguintes de escolha preliminar de substratos foram realizados em placas de *Petri* fechadas. A evaporação foi negligenciável, embora se observasse condensação na tampa das placas, o que poderia limitar a penetração da luz. Verificou-se, à lupa, a existência de colonização quer do vidro, quer do PVC, e não dos outros materiais ensaiados, aos 9 dias, nas condições do ensaio efetuado. De notar que, neste ensaio, devido a ter sido ligado o aquecimento geral do edifício, a temperatura ambiente subiu consideravelmente.

4.4.2 Ensaio preliminar de adesão sob condições mais controladas

Face aos resultados anteriores, procurou-se testar substratos de imobilização em condições mais controladas. As tinas de vidro abertas foram novamente utilizadas, de modo a evitar possíveis limitações de iluminação devido a condensação. Esta situação também permitiria uma maior aproximação a situações reais, em que são usados bioreatores abertos. Utilizaram-se como substratos PVC, Vidro e Poliuretano em meio BBM inoculado com *Chlorella vulgaris* e, como forma de avaliar a ocorrência de adesão, a absorvância da suspensão (DO_{680} nm) foi medida no início da experiência, e passadas 2:30h, 4:30h e 5:30h. Seria de esperar que, se houvesse adesão, os valores deste parâmetro diminuíssem face ao valor inicial devido à passagem das microalgas da forma suspensa no meio para a forma aderida aos substratos.

Os resultados obtidos encontram-se na **Fig.26** e pode observar-se que a densidade ótica do meio subiu inicialmente em todas as condições ensaiadas,

incluindo o controlo, o que pode estar relacionado com a multiplicação das células na suspensão, já que as condições em que o ensaio ocorreu favoreciam o crescimento e, neste caso (controlo), não havia sombreamento porque não havia um substrato colocado na tina. Contudo, após as duas horas e meia iniciais, a DO decresceu sempre no controlo, possivelmente por alguma sedimentação e sobretudo por colonização das paredes de vidro da tina. Já nas tinas com os substratos o comportamento foi diferente, com algum crescimento inicial da suspensão, seguido de estabilização mais rápida no Vidro e Poliuretano, e estabilização mais lenta no PVC. Após este período, observou-se decréscimo da absorvância nos dois primeiros substratos (possível indício de adesão), não tendo sido, contudo, o tempo de ensaio suficiente para avaliar a ocorrência desse comportamento na tina com o PVC.

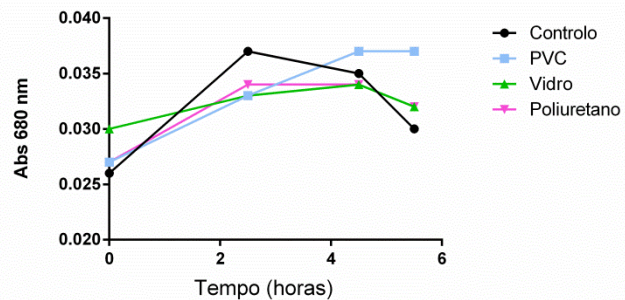


Fig. 26 Avaliação preliminar da adesão de *Chlorella vulgaris* a PVC, Poliuretano e Vidro, através da evolução da absorvância da suspensão da cultura nas tinas com os diferentes materiais, em função do tempo. Os dados encontram-se apresentados graficamente como a média dos valores obtidos para cada condição experimental.

Existem muito poucos estudos deste tipo na literatura e, nos trabalhos consultados, geralmente são utilizados métodos mais precisos de avaliação da adesão microalgal, por exemplo com contagem direta das algas aderidas ao suporte através de fluorescência [2, 35]. No entanto, estes métodos são morosos e caros. Face aos resultados obtidos neste ensaio, é de pensar que o indicador de adesão usado (densidade ótica), de modo similar ao que é normalmente realizado com estudos de adesão bacteriana [81, 82], poderá ter aplicação em estudos do mesmo tipo com microalgas. Contudo, esta experiência foi apenas preliminar, devendo-se realizar ensaios posteriores com replicados e aumentando o tempo de amostragem para confirmação desta hipótese.

Após a fase de colonização inicial, o passo seguinte deveria ser a promoção do desenvolvimento e manutenção do biofilme microalgal. No caso em estudo, mantiveram-se os substratos por 6 dias nas condições ambientais usadas para a colonização, mas adicionando-se meio nutritivo (BBM/10) e repondo o volume perdido

por evaporação sempre que necessário. Ao 3º dia do ensaio, a $DO_{680\text{ nm}}$ era a seguinte: Controlo = 0,58; PVC e PU = 0,50; Vidro = 0,53. Estes valores indiciam algum crescimento das microalgas em suspensão, talvez devido às células que ainda teriam permanecido nesta forma (não aderidas) ou eventualmente a células desprendidas do biofilme. Contudo, mais uma vez, os valores mais baixos de células suspensas foram encontrados nas tinas com substratos, confirmando a possibilidade de manutenção das células aderidas aos substratos ao longo do tempo. No último dia de ensaio, o aspeto dos suportes permitiu afirmar que a colonização dos substratos ensaiados foi conseguida, conforme mostram as fotografias da **Fig.27**.



Fig. 27 Exemplos elucidativos da capacidade de adesão de *Chlorella vulgaris* SAG 211-12 a PVC (cima à esquerda), Poliuretano (cima à direita) e Vidro (em baixo) (**Setas**).

Imagens digitalizadas dos substratos utilizados foram efetuadas para melhor visualização, e mostram de modo mais claro que *Chlorella vulgaris* SAG 211-12 pode ser imobilizada em materiais tão diversos como PVC, Poliuretano e Vidro em condições simples, em laboratório **Fig.28**.

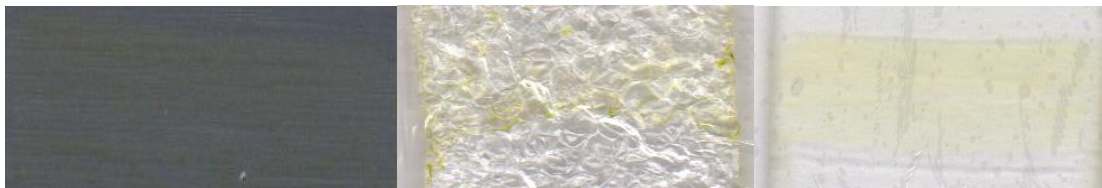


Fig. 28 Detalhe da capacidade de adesão e formação de biofilme de *Chlorella vulgaris* através de imagens digitalizadas dos suportes PVC, PU e Vidro, da esquerda para a direita, respetivamente.

De referir que a aquisição de imagens de superfícies colonizadas, seguida da utilização de *software* apropriado [46], constitui um método de avaliação quantitativa da adesão e seria interessante testar a sua eficácia neste contexto.

4.4.3 Ensaio controlados de imobilização de *Chlorella vulgaris* em *coupons*

Para estes ensaios foram escolhidos os substratos PVC, Inox, Polipropileno (PP) e Poliestireno (PE). Foram excluídos o Vidro (devido à maior dificuldade de obtenção de *coupons* e à não adequação para utilização em futuro bioreator) e o Poliuretano pela dificuldade em obter *coupons* cujas dimensões se mantivessem constantes após manipulação. Foram incluídos o PP e o PE porque se observou adesão de *Chlorella vulgaris* a materiais de laboratório utilizados feitos nestes materiais (ex: placas de *Petri* e pipetas) e porque são referidos na literatura da especialidade, e também o Inox pela razão anterior. Este foi um conjunto de ensaios onde a quantificação das células aderidas era um dos objetivos a atingir.

1º Ensaio de Adesão

1ª Fase – Avaliação da adesão com BBM (1/10)

Às 48h após a inoculação, na tentativa de avaliar a concentração de algas aderidas aos diferentes substratos, foi feito um teste inicial com o substrato PE, tendo-se verificado uma concentração demasiado baixa para permitir uma quantificação através da câmara de *Neubauer*.

Assim, a avaliação da concentração de microalgas aderidas aos restantes substratos foi efetuada às 72h e 144h. Verificou-se que às 72h o PVC apresentou valores de adesão significativamente mais elevados comparativamente ao PP e Inox (**Fig.29**). Atingiu-se então um valor médio de células aderidas ao PVC que é o dobro das células aderidas aos outros substratos, e da ordem de 2×10^5 células.mL⁻¹ ou 5×10^4 células.cm⁻² de substrato.

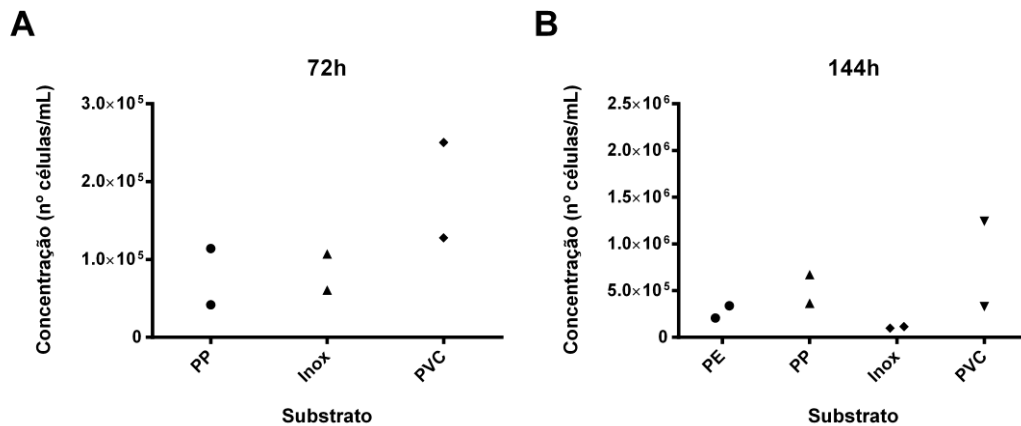


Fig. 29 Quantificação da adesão de *Chlorella vulgaris* SAG 211-12 aos diferentes substratos às 72h (**A**) e às 144h (**B**). A quantificação foi feita em duplicado, através da contagem do número de células por coupon, diluídas num mililitro. Em **A**, "sem dados" diz respeito à amostra utilizada preliminarmente às 48h para quantificação celular. Para cada substrato foram efetuadas 6 contagens independentes.

Na **Fig29B**, encontram-se representados os resultados para as 144h, verificando-se que o PVC continua a ser o substrato com maior capacidade de adesão. Verifica-se, ainda, que a concentração celular máxima obtida (cerca de 1×10^6 células/mL, no caso do PVC) foi superior à verificada às 72h para cada um dos materiais, denotando um crescimento acentuado do biofilme. Para além disso, o material com menor número de células aderidas foi o Inox (1×10^5 células/mL). Apesar dos resultados obtidos, é notório o valor de desvio padrão dos dados registados em alguns substratos. Este é um aspeto já referido noutros trabalhos [2, 83] e pode denotar uma instabilidade no desenvolvimento inicial do biofilme nas condições experimentais, a par de problemas de colheita e tratamento do material aderido, uma vez que a massa de células recolhida se tornou maior.

Relativamente aos substratos testados, a variação significativa do comportamento de *Chlorella vulgaris* com o material utilizado já tinha sido referida por [2], para uma estirpe autóctone isolada de um sistema de arrefecimento, tendo sido máxima a colonização em inox, seguida de perspex e vidro ao fim de 48h de experiência. Já para [83], os melhores resultados foram obtidos com poliuretano e os mais baixos com Polietileno e vidro para *Chlorella vulgaris* estirpe CPCC nº 90. Por outro lado, um estudo mostrou que o PVC permitiu a formação de um biofilme maduro, tendo estes então desenvolvido um biorreator neste material [67, 84]. Uma comparação mais exaustiva entre os resultados obtidos nesta parte do ensaio e a literatura é difícil porque para além das espécies (e mesmo das estirpes) usadas

serem muitas vezes diferentes, as metodologias de avaliação também diferiram das desenvolvidas neste estudo.

2ª Fase – Avaliação da densidade celular do biofilme de *Chlorella vulgaris* (BBM full strength)

Após a substituição do meio por BBM *full strength* e passadas 240h de incubação, a contagem celular efetuada revela que o substrato com maior capacidade de formar e manter um biofilme continua a ser o PVC, tal como ilustra o **Fig.30A**. No entanto, às 312h, observa-se que o biofilme formado tende a ser semelhante entre todos os substratos (**Fig.30B**).

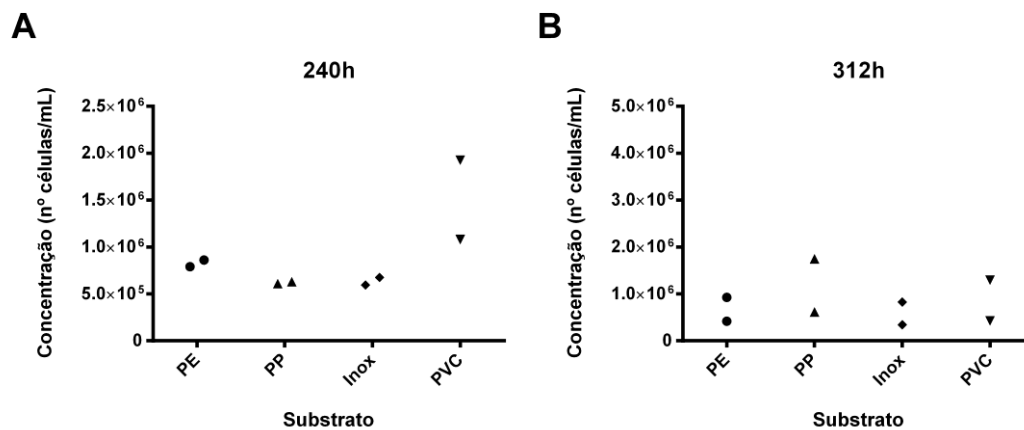


Fig. 30 Quantificação da densidade celular no biofilme de *Chlorella vulgaris* formado em diferentes substratos às 240h (**A**) e às 312h (**B**). A quantificação foi feita em duplicado, através da contagem do número de células por coupon, diluídas num mililitro. Para cada substrato foram efetuadas 6 contagens independentes.

Este comportamento seria expectável, na medida em que, uma vez formado o biofilme, a superfície de imobilização poderá deixar de ter as propriedades iniciais, podendo atenuar-se diferenças de hidrofobicidade, rugosidade, etc. entre materiais [1, 35, 83].

Outra informação importante a adquirir relaciona-se com o teor de biomassa formada nos substratos utilizados e a sua evolução ao longo do tempo. Esta avaliação foi feita, encontrando-se os resultados obtidos na **Fig.31**. Pode verificar-se que a máxima densidade celular é obtida com o PVC (1.6×10^6 células.mL⁻¹) até às 240h de crescimento do biofilme, decaindo fortemente após esta fase. Já no PP, o crescimento tende a ser mais lento mas prolongado no tempo, atingindo-se (1.1×10^6 células.mL⁻¹) às 312h.

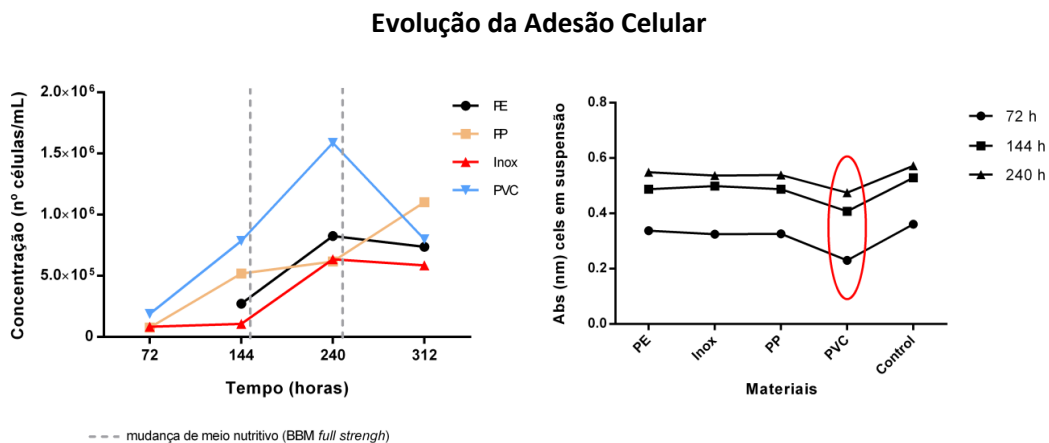


Fig. 31 Evolução da densidade de células aderidas a cada substrato, ao longo do tempo da experiência (esquerda). À direita, encontra-se representada graficamente a evolução da absorvância do meio contendo as células em suspensão, ao longo do tempo da experiência e para cada substrato. Os dados encontram-se expressos como média dos valores para cada condição experimental.

Para o PE e Inox o comportamento observado indicia a existência de uma fase lag, uma fase de crescimento curta, com máxima densidade celular baixa (entre 7.4×10^5 e 8.3×10^5 e entre e entrada em fase estacionária após as 240h.

De modo semelhante ao ensaio preliminar onde se usou a absorvância do meio como um “proxy” para avaliar a existência de adesão, neste ensaio também se foi estudar a variação deste parâmetro para as células em suspensão no meio (não aderidas e/ou eventualmente desprendidas do suporte) para cada substrato ao longo do tempo de experiência e para o controlo sem substrato. A representação gráfica da **Fig.31** mostra claramente o pico de crescimento do biofilme às 240h, especialmente para o PVC, pela acentuada diminuição das células em suspensão e também, comparando os dois gráficos da **Fig.31**, uma relação inversa entre a contagem das células aderidas (à esquerda) e a concentração (absorvância) das células em suspensão (à direita), até às 240h do estudo.

Em resumo, no trabalho efetuado, pode afirmar-se que, após a avaliação da concentração de algas aderidas aos diferentes substratos em todos os tempos de

estudo, o PVC é globalmente o melhor substrato para a adesão e desenvolvimento de uma cultura aderida de microalga *Chlorella vulgaris* SAG 211-12 e que o Inox é o substrato ao qual tende a aderir menos. Contudo, a preferência pelo PVC encontrada às 72h, 144h e 240h é diminuída com o decorrer do tempo, verificando-se valores de adesão mais semelhantes entre todos os substratos testados às 312h.

2º Ensaio de Adesão

Com base nos resultados do 1º ensaio de adesão, foi feito um novo ensaio usando os substratos PVC e PP para confirmação mais rigorosa (uso de triplicados) da existência ou não de diferenças entre estes dois substratos na fase de adesão e desenvolvimento inicial do biofilme. Para além disso, sendo a iluminação um parâmetro com grande influência no crescimento microalgal [76], o efeito da diminuição da intensidade luminosa na adesão e desenvolvimento do biofilme foi testado para o substrato PVC às 144h, em placas sem (PVC) e com (PVC*) cobertura c A ístico adicional. Os resultados B os encontram-se na **Fig.32**, A e B, respetivamente.

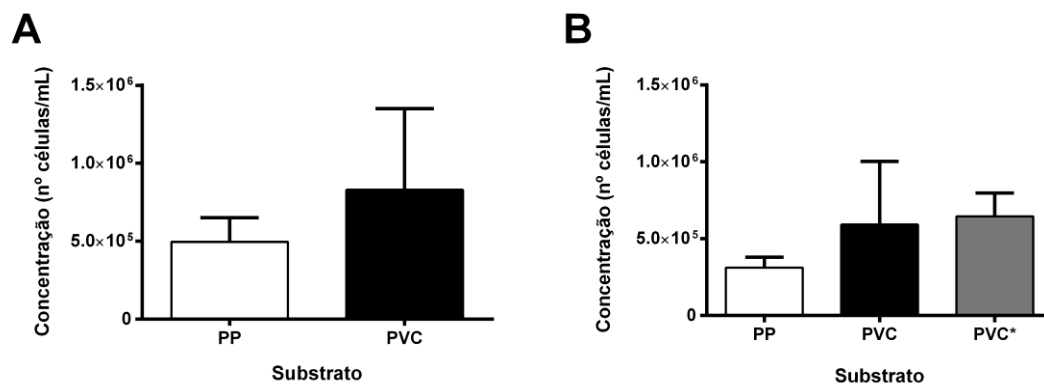


Fig. 32 Quantificação da adesão e crescimento de *Chlorella vulgaris* para os substratos PP e PVC às 72h (A) e às 144h (B). A quantificação foi feita em triplicado, através da contagem do número de células por coupon, diluídas num mililitro. Em B, também estudo da variação da intensidade luminosa no desenvolvimento do biofilme às 144h, em PVC (barra escura-PVC, mais luz; barra quadriculada-PVC*, menos luz). Para cada substrato foram efetuadas 6 contagens independentes, e os resultados encontram-se expressos como média \pm desvio padrão.

À semelhança do que foi observado no 1º ensaio de adesão, tanto às 72h (**Fig.32A**) como às 144h (**Fig.32B**), verifica-se uma tendência para adesão preferencial das algas ao PVC, contudo, sem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$). No que diz respeito ao efeito da intensidade luminosa, verifica-se que esta

variável, nas condições de experimentação, não induz qualquer tipo de alteração na concentração de algas aderidas ao PVC ($p > 0,05$, PVC (intensidade luminosa 3000 lux) vs. PVC* (intensidade luminosa 2000 lux), **Fig.32B**.

O gráfico da **Fig.33** relaciona novamente a concentração das células aderidas com a variação da concentração das células em suspensão medida como absorvância. De salientar que, para cada um dos substratos em estudo, se verifica que quanto maior a concentração de células aderidas, menor a concentração de células em suspensão no meio.

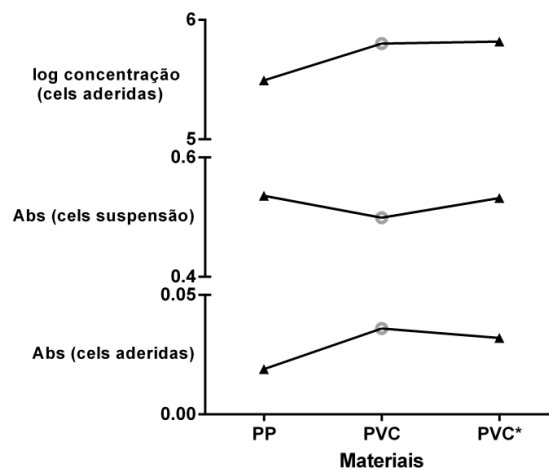


Fig. 33 Representação gráfica da relação inversa entre a concentração das células aderidas aos diferentes substratos e a concentração das células em suspensão.

Uma vez mais, seria interessante prosseguir o estudo da avaliação da utilidade real das medidas de absorvância neste contexto.

4.4.4 - Avaliação preliminar da formação de biofilme em placa de PVC

De modo a poder equacionar o desenvolvimento da produção de biomassa de *Chlorella vulgaris* na forma aderida, ensaios em maior escala foram realizados. Na **Fig.34** pode observar-se o aspeto de uma placa de PVC no início e no fim do período de crescimento do biofilme, numa experiência com 15 dias de duração e mudança de meio BBM/10 para BBM aos 8 dias. Foi efetuada a recolha da biomassa por raspagem e o peso seco da biomassa obtida foi de 3,9 mg para uma área de 220, 5 cm². Este é um valor baixo [35, 63, 65], mas esta foi uma experiência destinada apenas a apurar metodologias para o desenvolvimento de um biorreator de biofilme.



Fig. 34 Aspeto do ensaio preliminar de desenvolvimento de uma cultura de *Chlorella vulgaris* aderida a uma placa de PVC (à esquerda o início e à direita o fim do ensaio).

4.5 – Biorreator de biofilme fotossintético (FBPR)

4.5.1 – Construção do protótipo do reator de biofilme

A construção do biorreator FBPR (Foto Bioreator Placas Rotativas) baseou-se na premissa de maximizar a incidência de radiação luminosa e a área disponível para a adesão das microalgas, facilitando ainda a colheita. Este desenho também é mais favorável à utilização do bioreator em modo contínuo, pois o fluxo de líquido segue um curso entrada-saída paralelo às placas, maximizando, assim, o contato das microalgas aderidas com os nutrientes do meio.

A incidência luminosa é otimizada no modelo desenvolvido, quando comparada com o biorreator de discos verticais (RBC, **Fig.35**), pois num RBC típico o ângulo de incidência da luz é tanto maior quanto menor for o número de biodiscos, atingindo um máximo de 90° no caso de haver um único biodisco com a fonte luminosa perpendicular ao plano do mesmo. Para além disso, um ângulo máximo de 45° é obtido quando a distância entre biodiscos é igual ao seu raio. Num bioreator FBPR, ao contrário do que se verifica num RBC, a exposição à luz não constitui um fator limitante para o crescimento de microalgas. Neste modelo, e como se pode ver na **Fig.36B**, é possível, a certo momento, uma incidência da luz a 90° . Para além disso, o modelo construído permite a maximização da área exposta à luz uma vez que toda a placa recebe radiação a certa altura na sua rotação, evitando o sombreamento devido aos próprios discos colocados em série no eixo de suporte do RBC (**Fig.35A**).

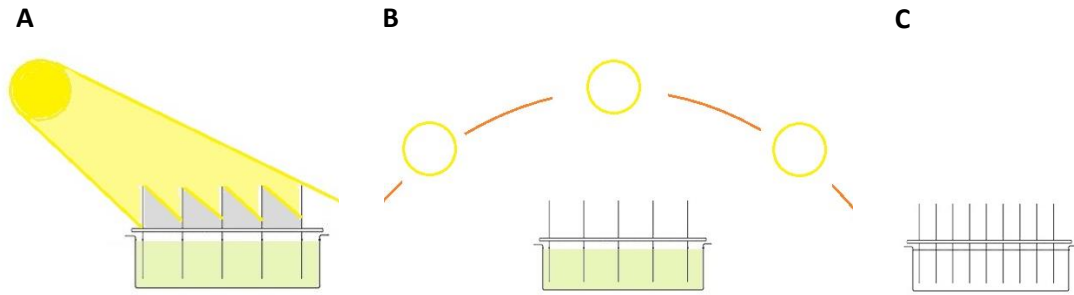


Fig. 35 Representação esquemática da incidência luminosa nos discos de um RBC durante a maior parte do dia (A); variação da posição do sol em relação ao RBC, ao longo do dia (B); projeção da quantidade de discos necessária para um RBC para igualar a área exposta à luz existente num bioreator FBPR.

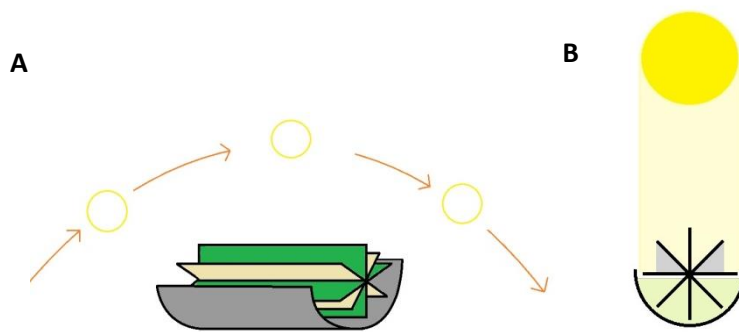
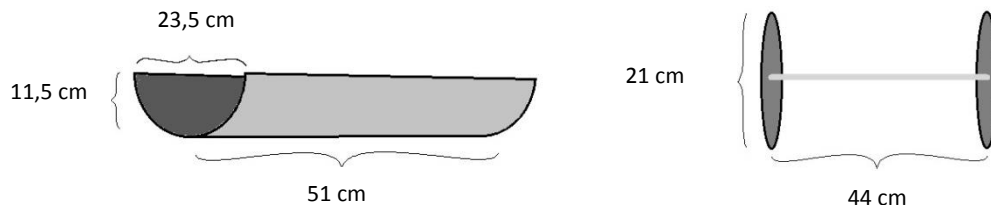


Fig. 36 Representação esquemática de um bioreator FBPR e variação da posição do sol ao longo do dia (A); incidência da radiação luminosa nas diferentes placas do bioreator (B).

O esquema (*draft*) exibido na **Fig37** descreve a construção do bioreator desenvolvido neste trabalho. O modelo FBPR criado apresenta um comprimento total de 60 cm desde o motor até à extremidade do eixo, contendo 4 placas em PVC com dimensões de 8,3 cm de largura e 43 cm de comprimento, sendo que metade das placas foi lixada com lixa de grão 120 (Rugosas) e a outra metade não (Lisas) (**Fig38**).



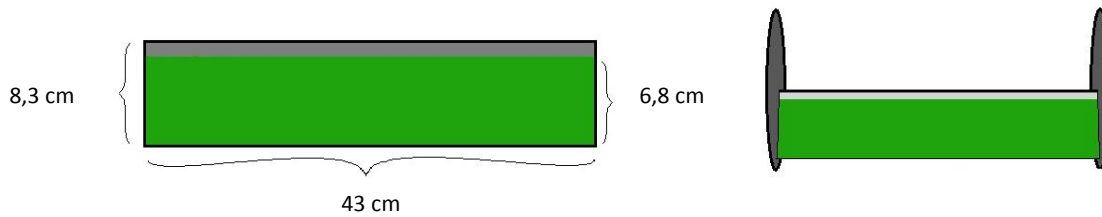


Fig. 37 Representação esquemática das partes e dimensões do bioreator FBPR.

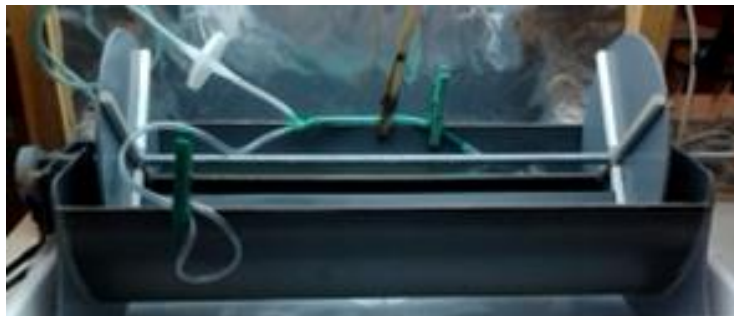


Fig. 38 Representação do bioreator FBPR construído, ainda em fase de testes.

Considerando um aumento de escala (*scale up*) para aplicação deste modelo de bioreator ao ar livre, têm de ser feitas algumas considerações, que passam a ser referidas. Relativamente a um reactor FBPR contendo oito placas, e admitindo uma largura de 1 metro e comprimento de 2 metros, **Fig.39**, é possível atingir uma área útil máxima de $2 \text{ m}^2 \times 8 \text{ placas} \times 2 \text{ faces}$, perfazendo um total de 32 m^2 de área de superfície para adesão de microalgas. Em termos comparativos, num bioreator do tipo RBC, seriam necessários 5 discos com 1 metro de raio, com uma distância de 0,4 metros entre discos, para se obter a mesma área de superfície. Contudo, como já foi mostrado acima, com o bioreator FBPR é possível haver incidência da radiação luminosa em todas as placas, quando não estão submersas, durante todo o dia. Num modelo do tipo RBC, pelo facto de uma única face se encontrar exposta a dada altura do dia, pode inferir-se que seria necessário o dobro dos discos para obtenção da mesma incidência de radiação luminosa por unidade de superfície de área ocupada pelo bioreator no solo.

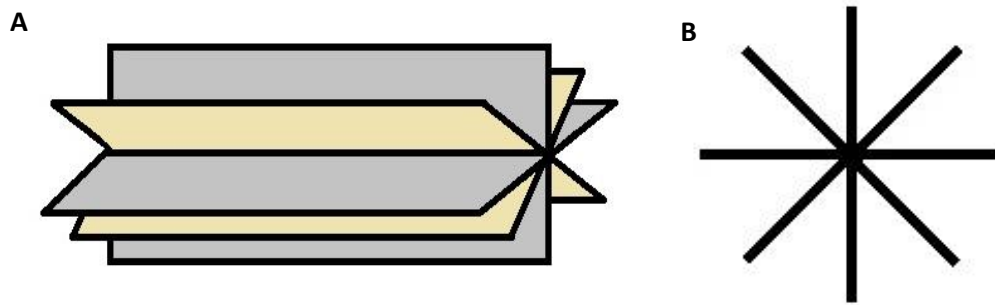


Fig. 39 Representação esquemática da posição relativa de oito placas num bioreator FBPR, observadas em diferentes perspetivas (A e B).

Outra vantagem do modelo FBPR face ao modelo RBC é o facto de ser possível tirar cada uma das placas individualmente para a extração das algas aderidas, sem ser necessário alterar ou desencaixar as placas do eixo de suporte. Deste modo, o tempo e o esforço dispendidos para a recolha da biomassa são menores, resultado em menores custos de processamento da biomassa.

A gama de comprimentos de onda usada pelas plantas é designada de radiação PAR (do inglês *Photosynthetic Active Radiation*), e é expressa em $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$. Para microalgas do género *Chlorella*, a radiação luminosa máxima é de cerca de $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, valor acima do qual o seu crescimento é inibido [85, 86].

Um outro aspeto importante a considerar numa produção no exterior é a radiação solar. Em Portugal, sabe-se que a radiação solar média anual é de $1650 \text{ kWh}/\text{m}^2$, o que se traduz numa radiação de $3113 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, valor que se revela muito superior ao valor de inibição do crescimento da alga em estudo. A radiação que atinge a área ocupada pelo protótipo de biorreactor (supondo $2\text{m} \times 2\text{m}$) é $4 \text{ m}^2 \times 3113 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, resultando num total de cerca de $12450 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ [87].

No entanto, o modelo proposto neste estudo permite minimizar este facto uma vez que é possível adicionar ou retirar placas do biorreactor e, dessa forma, controlar a radiação por unidade de superfície de crescimento. Isto é, a radiação total é dissipada pela área de superfície utilizada para o crescimento das microalgas. Ao dividir a radiação total que incide no biorreactor pela radiação máxima de crescimento da *Chlorella*, pode ser calculada a área que é necessária para “desmultiplicar” a radiação incidente. A partir destes cálculos obtém-se um valor de 62 m^2 e, tendo em conta que cada placa do FBRP teria 4 m^2 , seriam necessárias cerca de 16 placas para perfazer a área referida. No entanto, como as placas não estão sempre expostas à radiação solar por se encontrarem metade do tempo submersas no meio de cultura a cada revolução do sistema, pode concluir-se que é possível diminuir o número de

placas necessárias para metade, isto é, 8 placas. Assim, com o modelo de bioreator proposto é possível octuplicar a área de solo ocupada para a produção de biomassa microalgal a partir da radiação solar no exterior.

4.5.2 – Ensaio em Protótipo de Reator Fotossintético de Placas Rotativas (FBPR)

Após um período preliminar de crescimento, as placas do FBPR foram raspadas, como se encontra ilustrado na **Fig.40**) e foi obtido um total de 0,47g de biomassa seca a partir das 4 placas. Assim, obteve-se uma concentração de $1,99 \text{ g.m}^{-2}$, e uma produtividade de $0,13 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$ no período em questão. Contudo, conforme referido na metodologia, nesta fase o motor do reator foi operado de modo não contínuo, ficando as placas frequentemente não mergulhadas no meio de cultura.

Após o primeiro *regrowth* durante 8 dias, obteve-se uma produtividade de 0,48 g (peso seco), correspondendo a uma concentração de $2,06 \text{ g.m}^{-2}$ e uma produtividade de $0,26 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$. No segundo *regrowth* (igual período de 8 dias), a biomassa produzida aumentou substancialmente, atingindo o valor de 0,77 g, com uma concentração de $3,28 \text{ g.m}^{-2}$.

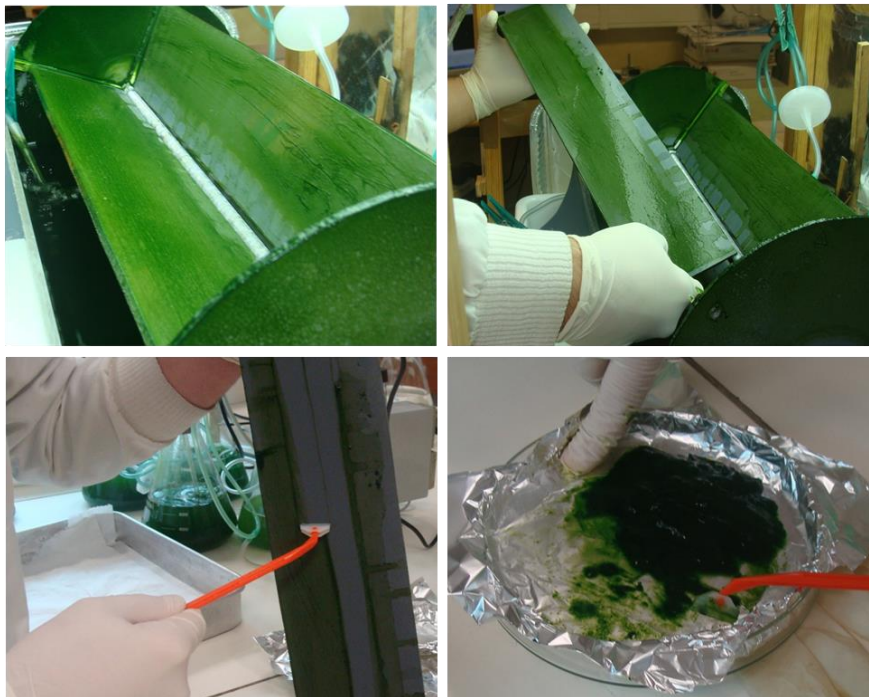


Fig. 40 – Imagens fotográficas representativas do processo de colheita de *Chlorella vulgaris*, após remoção das placas de PVC e raspagem do biofilme do FBPR.

Este segundo *regrowth* (**Fig.41**) permite verificar que o crescimento das algas foi maior, observando-se valores de produtividade de $0,41 \text{ g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$, de acordo com a **Tabela 3**. Os valores obtidos são, contudo, relativamente baixos quando comparados com os descritos na literatura [69, 70].



Fig. 41 Imagens fotográficas sequenciais do *regrowth* de *Chlorella vulgaris* no FBPR ao longo de 8 dias.

Tabela 3 Quantificação do rendimento em biomassa do biofilme de *Chlorella vulgaris* SAG 211-12 produzido no biorreator FBPR

| | 15 dias | 8 dias | 8 dias |
|--|-------------|--------------------|--------------------|
| | 1ª colheita | 1º <i>regrowth</i> | 2º <i>regrowth</i> |
| Total biomassa seca produzida (g) | 0,47 | 0,48 | 0,77 |
| Produção média (g.m^{-2}) | 1,99 | 2,06 | 3,28 |
| Produtividade média ($\text{g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$) | 0,13 | 0,26 | 0,41 |
| Área total de adesão (m^2) | 0,23 | 0,23 | 0,23 |
| Área ocupada pelo biorreator (m^2) | 0,14 | 0,14 | 0,14 |
| Produtividade por área de solo ocupado ($\text{g.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$) | 0,97 | 1,88 | 2,98 |

Contudo, é de realçar que esta foi a primeira avaliação efetuada no biorreator, sem qualquer otimização das condições de crescimento, enquanto que os valores apresentados por outros autores dizem respeito à produtividade otimizada após o

período de crescimento inicial [35, 58, 68, 83]. Num outro estudo obteve-se uma produtividade otimizada de 2,57 g.m⁻².d⁻¹; no entanto o modelo sugerido por estes autores necessitou de ocupar mais área de solo que o modelo desenvolvido neste trabalho. Considerando a produtividade por área de solo ocupado pelo reator, com este novo protótipo obteve-se uma produtividade de 2,98 g.d⁻¹, valor que para um segundo *regrowth* é bastante promissor.

Algumas questões têm de ser tidas em consideração antes de se poder concluir acerca da produtividade do protótipo construído. Em relação às variáveis passíveis de otimização e que têm certamente um impacto na produção de biomassa, encontram-se o meio (composição e pH), o substrato de adesão, os ciclos de luz e respetiva intensidade luminosa, a velocidade de rotação a que estão sujeitos os substratos e obviamente, a espécie de alga ou mesmo a estirpe utilizada. Relativamente ao meio de cultura, o BBM utilizado no presente trabalho é um meio de crescimento *standard* e não um meio otimizado para a produção, uma vez que não considera a composição elementar desta microalga. Neste contexto, alguns autores verificaram que para uma produção otimizada de *Chlorella vulgaris*, o meio BBM carecia de N, Mg e Fe [22].

O substrato PVC, apesar de ter revelado maior capacidade de adesão que os restantes substratos testados, pode ainda ser otimizado se a área efetiva de adesão for aumentada, i.e. aumentando a sua rugosidade. Este parâmetro já havia sido explorado, tendo-se verificado que uma superfície rugosa apresenta maior adesão algal [2]. Neste sentido, outros estudos utilizaram lona de algodão como substrato de adesão para a mesma espécie de alga, o qual exhibe uma área de adesão francamente superior, uma vez que é aumentada por todos os interstícios que a malha apresenta [70].

Dos estudos referidos na literatura, muitos utilizam luminosidade contínua, enquanto no presente estudo se usou um ciclo de 12h L/12h D. Ainda relativamente à luz, verifica-se que alguns estudos utilizam uma intensidade luminosa bastante superior à utilizada no presente trabalho (cerca de 4 vezes superior) [69].

Alguns dos fatores acima referidos não foram exaustivamente explorados neste trabalho, sendo imperativo que variáveis como a rotação dos suportes de adesão, a intensidade luminosa e as condições do meio de cultura sejam otimizadas para que a adesão microalgal e produtividade sejam maximizadas.

5 – CONCLUSÕES FINAIS E PROPOSTAS DE TRABALHO FUTURO

Conforme referido ao longo deste trabalho, *Chlorella vulgaris* é uma microalga muito utilizada em diversas áreas Biotecnológicas, havendo muito interesse na atualidade na extração de lípidos para produção de biocombustível. A nível comercial esta microalga é produzida em cultura suspensa, o que acarreta elevados custos de colheita da biomassa. O desenvolvimento de uma cultura na forma de biofilme ajudaria a minimizar este problema.

A estirpe de *Chlorella vulgaris* utilizada (SAG 211-12), apesar de promissora ainda não se encontrava muito estudada na literatura, desconhecendo-se a sua capacidade de formação de biofilme. O primeiro passo no presente trabalho consistiu no conhecimento das condições de crescimento da microalga usando métodos padronizados. Para tal construiu-se um sistema de bancada, que promoveu as condições necessárias ao estudo do crescimento e da adesão a substratos sob condições controladas. Concluiu-se que esta estirpe apresenta bom crescimento, com taxas de crescimento da ordem de $0,68\text{ d}^{-1}$, nas condições padrão. Elaboraram-se retas de calibração entre a densidade celular e a Densidade Ótica e entre este parâmetro e a biomassa.

Relativamente à capacidade de adesão a substratos, conclui-se que a *Chlorella vulgaris* estudada, da estirpe SAG 211-12, tem boa capacidade de adesão, mesmo ao vidro. Também se quantificou, em particular, a capacidade para aderir a diversos substratos como o Inox, PP, PE e PVC. Os ensaios mostraram que a adesão inicial, embora tivesse sido diferente para os diversos substratos, com base na diferença da concentração de microalgas firmemente aderidas observada, tende a diminuir quando o biofilme está formado, sendo mais evidente este fenómeno no final do tempo de crescimento do biofilme, o que está de acordo com a literatura consultada. Foi testado em especial o efeito da luz na adesão e crescimento do biofilme em PVC, não se tendo encontrado diferenças significativas nas condições ensaiadas.

Em todos os testes realizados o PVC mostrou ser o melhor substrato, que permite a adesão e crescimento de biofilme algal, tendo revelado a adesão mais rápida e a maior biomassa desenvolvida. Sendo assim, este substrato foi escolhido para a construção de um novo fotobiorreator, designado por FBPR – FotoBioreator de Placas Rotativas. O desenho proposto para o reator desenvolvido é, ao nosso conhecimento, único, face aos raros sistemas de biofilme fototrófico descritos na literatura. Seguiu-se o princípio dos reatores de Biodiscos (RBC), mas usando placas

colocadas horizontalmente ao longo do eixo de suporte, que permitem que o biofilme se desenvolva com uma incidência da radiação luminosa mais eficiente; por outro lado, como é um reator rotativo, permite aumentar a área exposta à luz, permitindo assim aumentar a área de adesão e crescimento de biomassa. Este modelo promove assim uso mais eficiente da área de solo ocupada pelo biorreator. Os trabalhos de manuseamento e colheita são também facilitados e mais rápidos quando comparados com o RBC, uma vez que é possível retirar facilmente cada placa individualmente, extrair a biomassa e recolocar as placas novamente no reator para novo crescimento.

A nossa experiência demonstrou o potencial do bioreator FBPR para produzir biomassa; contudo, carece ainda de muito esforço de caracterização e otimização do processo. No presente trabalho não foi possível desenvolver todo esse estudo por questões de enquadramento no tempo de duração do mestrado.

Acha-se de todo pertinente para trabalhos futuros aprofundar questões técnicas ligadas ao bioreactor, de forma a otimiza-lo, como sejam incidência e radiação luminosa, número de placas possíveis no sistema, textura das placas, velocidade de rotação, e otimização energética do sistema, por exemplo, bem como questões biológicas como, otimização do meio para produção de biomassa e para produção de óleos, otimização do pH e CO₂ do meio, uso de efluentes industriais, caracterização da biomassa e dos óleos produzidos.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barberousse H, Brayner R, Do Rego AMB, Castaing J-C, Beurdeley-Saudou P, Colombet J-F: Adhesion of facade coating colonisers, as mediated by physico-chemical properties. *Biofouling* 2007, 23(1):15-24.
2. Sekar R, Venugopalan V, Satpathy K, Nair K, Rao V: Laboratory studies on adhesion of microalgae to hard substrates. *Hydrobiologia* 2004, 512(1-3):109-116.
3. Lee RE: *Phycology*: Cambridge University Press; 2008.
4. Huss VA, Frank C, Hartmann EC, Hirmer M, Kloboucek A, Seidel BM, Wenzeler P, Kessler E: Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). *Journal of Phycology* 1999, 35(3):587-598.
5. Brennan L, Owende P: Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2010, 14(2):557-577.
6. Lee Y-K, Shen H: Basic Culturing Techniques. In *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Edited by Richmond A: John Wiley & Sons; 2008.
7. Sayegh FA, Montagnes DJ: Temperature shifts induce intraspecific variation in microalgal production and biochemical composition. *Bioresource Technology* 2011, 102(3):3007-3013.
8. Khoeyi ZA, Seyfabadi J, Ramezanpour Z: Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquaculture International* 2012, 20(1):41-49.
9. Widjaja A, Chien C-C, Ju Y-H: Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 2009, 40(1):13-20.
10. Lv J-M, Cheng L-H, Xu X-H, Zhang L, Chen H-L: Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology* 2010, 101(17):6797-6804.
11. Liu Z-Y, Wang G-C, Zhou B-C: Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology* 2008, 99(11):4717-4722.
12. Al-lwayzy SH, Yusaf T, Al-Juboori RA: Biofuels from the fresh water microalgae *Chlorella vulgaris* (FWM-CV) for diesel engines. *Energies* 2014, 7(3):1829-1851.
13. Converti A, Casazza AA, Ortiz EY, Perego P, Del Borghi M: Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 2009, 48(6):1146-1151.
14. Xin L, Hong-ying H, Ke G, Ying-xue S: Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology* 2010, 101(14):5494-5500.
15. Wijanarko A, Witarto AB, Soemantojo RW: Effect of photoperiodicity on CO₂ fixation by *Chlorella vulgaris* Buitenzorg in bubble column photobioreactor for food supplement production. *MAKARA of Technology Series* 2010, 8(2).
16. Sharma R, Singh G, Sharma V: Effects of Culture Conditions on Growth and Biochemical Profile of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Plant Pathology & Microbiology* 2012, 03(05).
17. Blair MF, Kokabian B, Gude VG: Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 2014, 2(1):665-674.
18. Yoo C, Jun S-Y, Lee J-Y, Ahn C-Y, Oh H-M: Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresource Technology* 2010, 101(1):S71-S74.

19. Chisti Y: Biodiesel from microalgae beats bioethanol. Trends in Biotechnology 2008, 26(3):126-131.
20. Sayed OH, El-Shahed AM: Growth, photosynthesis and circadian patterns in *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta) in response to growth temperature. Cryptogamie Algologie 2000, 21(3):283-290.
21. Wang C, Li H, Wang Q, Wei P: Effect of pH on growth and lipid content of *Chlorella vulgaris* cultured in biogas slurry. Chinese Journal of Biotechnology 2010, 26(8):1074-1079.
22. Mandalam RK, Palsson BØ: Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high-density *Chlorella vulgaris* cultures. Biotechnology and Bioengineering 1998, 59(5):605-611.
23. Battin TJ, Kaplan LA, Newbold JD, Cheng X, Hansen C: Effects of current velocity on the nascent architecture of stream microbial biofilms. Applied and Environmental Microbiology 2003, 69(9):5443-5452.
24. Stein JR: Handbook of Phycological Methods: Physiological And Biochemical Methods, vol. 2: Cambridge University Press; 1973.
25. Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A: Commercial applications of microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering 2006, 101(2):87-96.
26. Borowitzka MA: Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. Progress in Industrial Microbiology 1999, 35:313-321.
27. Chisti Y: Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances 2007, 25(3):294-306.
28. Filali R, Tebbani S, Dumur D, Isambert A, Pareau D, Lopes F: Growth modeling of the green microalga *Chlorella vulgaris* in an air-lift photobioreactor. 18th IFAC World Congress, Milano (Italy), August 28 - September 2, 2011
29. Pulz O: Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. Applied Microbiology and Biotechnology 2001, 57(3):287-293.
30. Doucha J, Straka F, Lívanský K: Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (*Chlorella sp.*) in an outdoor open thin-layer photobioreactor. Journal of Applied Phycology 2005, 17(5):403-412.
31. Degen J, Uebele A, Retze A, Schmid-Staiger U, Trösch W: A novel airlift photobioreactor with baffles for improved light utilization through the flashing light effect. Journal of Biotechnology 2001, 92(2):89-94.
32. Converti A, Lodi A, Del Borghi A, Solisio C: Cultivation of *Spirulina platensis* in a combined airlift-tubular reactor system. Biochemical Engineering Journal 2006, 32(1):13-18.
33. Ugwu C, Ogbonna J, Tanaka H: Improvement of mass transfer characteristics and productivities of inclined tubular photobioreactors by installation of internal static mixers. Applied Microbiology and Biotechnology 2002, 58(5):600-607.
34. Travieso L, Hall D, Rao K, Benitez F, Sánchez E, Borja R: A helical tubular photobioreactor producing *Spirulina* in a semicontinuous mode. International Biodeterioration & Biodegradation 2001, 47(3):151-155.
35. Irving TE: Factors influencing the formation and development of microalgal biofilms. 2011.
36. Molina Grima E, Belarbi E-H, Acién Fernández F, Robles Medina A, Chisti Y: Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. Biotechnology Advances 2003, 20(7):491-515.
37. Benemann J, Koopman B, Weissman J, Eisenberg D, Goebel R: Development of microalgae harvesting and high-rate pond technologies in California. Algae biomass: production and use. Editors, Gedaliah Shelef, Carl J Soeder 1980.

38. Knuckey RM, Brown MR, Robert R, Frampton DM: Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacultural Engineering* 2006, 35(3):300-313.
39. Divakaran R, Pillai VS: Flocculation of algae using chitosan. *Journal of Applied Phycology* 2002, 14(5):419-422.
40. Mohn F: Experiences and strategies in the recovery of biomass from mass cultures of microalgae. *Algae biomass: production and use*. Editors, Gedaliah Shelef, Carl J Soeder 1980.
41. Mackay D, Salusbury T: Choosing between centrifugation and crossflow microfiltration. *Chemical Engineer* 1988(447):45-50.
42. Metcalf I, Eddy H: *Wastewater engineering; treatment and reuse*. 2003.
43. Callow J, Callow M: *Biofilms*. In *Antifouling Compounds*. Springer; 2006: 141-169.
44. Lowe RL, Pan Y: Benthic algal communities as biological monitors. *Algal Ecology: Freshwater Benthic Ecosystems* 1996:705-739.
45. Vadeboncoeur Y, Steinman AD: Periphyton function in lake ecosystems. *The Scientific World Journal* 2002, 2:1449-1468.
46. Roeselers G, Loosdrecht MC, Muyzer G: Phototrophic biofilms and their potential applications. *Journal of Applied Phycology* 2008, 20(3):227-235.
47. Besemer K, Singer G, Limberger R, Chlup A-K, Hochedlinger G, Hödl I, Baranyi C, Battin TJ: Biophysical controls on community succession in stream biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 2007, 73(15):4966-4974.
48. Zippel B, Rijstenbil J, Neu TR: A flow-lane incubator for studying freshwater and marine phototrophic biofilms. *Journal of Microbiological Methods* 2007, 70(2):336-345.
49. Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U: Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiology Reviews* 2000, 24(5):661-671.
50. Passy SI, Larson CA: Succession in stream biofilms is an environmentally driven gradient of stress tolerance. *Microbial Ecology* 2011, 62(2):414-424.
51. Davis LS, Hoffmann JP, Cook PW: Seasonal succession of algal periphyton from a wastewater treatment facility. *Journal of Phycology* 1990, 26(4):611-617.
52. Sekar R, Venugopalan V, Nandakumar K, Nair K, Rao V: Early stages of biofilm succession in a lentic freshwater environment. *Asian Pacific Phycology in the 21st Century: Prospects and Challenges*. Springer; 2004: 97-108.
53. Pohlson E, Marxsen J, Küsel K: Pioneering bacterial and algal communities and potential extracellular enzyme activities of stream biofilms. *FEMS Microbiology Ecology* 2010, 71(3):364-373.
54. Townsin R: The ship hull fouling penalty. *Biofouling* 2003, 19(S1):9-15.
55. Schultz MP, Finlay JA, Callow ME, Callow JA: A turbulent channel flow apparatus for the determination of the adhesion strength of microfouling organisms. *Biofouling* 2000, 15(4):243-251.
56. Latour RA: *Biomaterials: protein-surface interactions*. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering* 2005, 28:1-15.
57. Genzer J, Efimenko K: Recent developments in superhydrophobic surfaces and their relevance to marine fouling: a review. *Biofouling* 2006, 22(5):339-360.
58. Ozkan A, Kinney K, Katz L, Berberoglu H: Reduction of water and energy requirement of algae cultivation using an algae biofilm photobioreactor. *Bioresource Technology* 2012, 114:542-548.
59. Wolf G, Picioreanu C, van Loosdrecht M: Kinetic modeling of phototrophic biofilms: The PHOBIA model. *Biotechnology and Bioengineering* 2007, 97(5):1064-1079.
60. Chevalier P, de la Noüe J: Wastewater nutrient removal with microalgae immobilized in carrageenan. *Enzyme and Microbial Technology* 1985, 7(12):621-624.

61. Kaya VM, de la Noüe J, Picard G: A comparative study of four systems for tertiary wastewater treatment by *Scenedesmus bicellularis*: new technology for immobilization. *Journal of Applied Phycology* 1995, 7(1):85-95.
62. Craggs RJ, Adey WH, Jenson KR, St John MS, Green FB, Oswald WJ: Phosphorus removal from wastewater using an algal turf scrubber. *Water Science and Technology* 1996, 33(7):191-198.
63. Schumacher G, Sekoulov I: Polishing of secondary effluent by an algal biofilm process. *Water Science & Technology* 2002, 46(8):83-90.
64. Pizarro C, Mulbry W, Bliersch D, Kangas P: An economic assessment of algal turf scrubber technology for treatment of dairy manure effluent. *Ecological Engineering* 2006, 26(4):321-327.
65. Johnson MB, Wen Z: Development of an attached microalgal growth system for biofuel production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2010, 85(3):525-534.
66. Cortez S, Teixeira P, Oliveira R, Mota M: Rotating biological contactors: a review on main factors affecting performance. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 2008, 7(2):155-172.
67. Orandi S, Lewis DM, Moheimani NR: Biofilm establishment and heavy metal removal capacity of an indigenous mining algal-microbial consortium in a photo-rotating biological contactor. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2012, 39(9):1321-1331.
68. Christenson LB, Sims RC: Rotating algal biofilm reactor and spool harvester for wastewater treatment with biofuels by-products. *Biotechnology and Bioengineering* 2012, 109(7):1674-1684.
69. Blanken W, Janssen M, Cuaresma M, Libor Z, Bhaiji T, Wijffels R: Biofilm growth of *Chlorella sorokiniana* in a rotating biological contactor based photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 2014, 111(12):2436–2445
- .70. Gross M, Henry W, Michael C, Wen Z: Development of a rotating algal biofilm growth system for attached microalgae growth with in situ biomass harvest. *Bioresource Technology* 2013, 150:195-201.
71. Fott B, Nováková M: A monograph of the genus *Chlorella*. The fresh water species. *Studies in Phycology* 1969:10-74.
72. Schlösser UG: SAG-Sammlung von Algenkulturen at the University of Göttingen Catalogue of Strains 1994. *Botanica Acta* 1994, 107(3):113-186.
73. Day JG, Benson EE, Fleck RA: In vitro culture and conservation of microalgae: applications for aquaculture, biotechnology and environmental research. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 1999, 35(2):127-136.
74. De Muyneck W, Ramirez AM, De Belie N, Verstraete W: Evaluation of strategies to prevent algal fouling on white architectural and cellular concrete. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2009, 63(6):679-689.
75. Münkler R, Schmid-Staiger U, Werner A, Hirth T: Optimization of outdoor cultivation in flat panel airlift reactors for lipid production by *Chlorella vulgaris*. *Biotechnology and Bioengineering* 2013, 110(11):2882-2893.
76. Mata TM, Martins AA, Caetano NS: Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2010, 14(1):217-232.
77. Mata TM, Melo AC, Simões M, Caetano NS: Parametric study of a brewery effluent treatment by microalgae *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology* 2012, 107:151-158.
78. Griffiths MJ, Garcin C, van Hille RP, Harrison ST: Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods* 2011, 85(2):119-123.

79. Voltolina D, Nieves M, Navarro G, Oliva T, Peraza D: The importance of acclimation for the evaluation of alternative media for microalgae growth. *Aquacultural Engineering* 1998, 19(1):7-15.
80. Arbib Z, Ruiz J, Alvarez-Diaz P, Garrido-Perez C, Perales JA: Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: wastewater tertiary treatment, CO₂ bio-fixation and low cost biofuels production. *Water Research* 2014, 49:465-474.
81. An YH, Friedman RJ: Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. *Journal of Microbiological Methods* 1997, 30(2):141-152.
82. Borges M-T, Sousa A, De Marco P, Matos A, Hönigová P, Castro PM: Aerobic and anoxic growth and nitrate removal capacity of a marine denitrifying bacterium isolated from a recirculation aquaculture system. *Microbial Ecology* 2008, 55(1):107-118.
83. Irving TE, Allen DG: Species and material considerations in the formation and development of microalgal biofilms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2011, 92(2):283-294.
84. Orandi S, Lewis DM: Biosorption of heavy metals in a photo-rotating biological contactor—a batch process study. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2013, 97(11):5113-5123.
85. <http://www.autogrow.com/>. *AutoGrow.com*. 2014. [cited 2014 18-10-2014]
86. Taiz L, Zeiger E: *Plant physiology*. Sunderland, MA: Sinauer Associates 2010.
87. <http://solargis.info/doc/free-solar-radiation-maps-GHI>. *SolarGis*. 2014 [cited 2014 18-10-2014].

Anexos

Anexo I

Tabela I - Composição do meio de cultura BBM (*Bold Basal Medium*)

| Bold Basal Medium | | |
|--|------------------------|--------|
| Macronutrientes | Conc. Sol. Stock (g/L) | Volume |
| NaNO ₃ | 25 | 10 mL |
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 2,5 | 10 mL |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 7,5 | 10 mL |
| K ₂ HPO ₄ | 7,5 | 10 mL |
| KH ₂ PO ₄ | 17,5 | 10 mL |
| NaCl | 2,5 | 10 mL |
| EDTA | Conc. Sol. Stock (g/L) | Volume |
| EDTA | 50 | 1 mL |
| KOH | 31 | |
| Sol Ferro | Conc. Sol. Stock | Volume |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 4,98 g/L | 1 mL |
| H ₂ SO ₄ | 0,01% | |
| Sol Boro | Conc. Sol. Stock (g/L) | Volume |
| H ₃ BO ₃ | 11,42 | 1 mL |
| Micronutrientes | Conc. Sol. Stock (g/L) | Volume |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 8,82 | |
| MnCl ₂ .4H ₂ O | 1,44 | |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O*** | 1,19 | 1 mL |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 1,57 | |
| Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O | 0,49 | |

*** Em substituição do MoO₃

Volume final 1 L BBM; perfazer com água destilada q.b.p

Constituição do meio adaptada de [24]

Anexo II

Tabela II A- Dados utilizados para a construção das retas de calibração para os matrizes de 100 mL

| Matrizes de 100 mL | | |
|--------------------|---------------|---------------------|
| Dia | Conc (cel/mL) | Log (conc (cel/mL)) |
| 0 | | |
| 1 | | |
| 2 | | |
| 3 | 1,97E+06 | 6,29E+00 |
| 4 | | |
| 5 | | |
| 6 | 3,76E+06 | 6,58E+00 |
| 7 | 5,36E+06 | 6,73E+00 |
| 8 | 7,64E+06 | 6,88E+00 |
| 9 | 1,02E+07 | 7,01E+00 |
| 10 | 1,13E+07 | 7,05E+00 |
| 11 | | |
| 12 | | |
| 13 | 1,87E+07 | 7,27E+00 |
| 14 | 2,18E+07 | 7,34E+00 |
| 15 | | |
| 16 | 3,45E+07 | 7,54E+00 |
| 17 | 3,93E+07 | 7,59E+00 |
| 18 | | |
| 19 | | |
| 20 | 4,64E+07 | 7,67E+00 |

Tabela II B -Dados utilizados para a construção das retas de calibração (DO_{680nm}-Nº Células) para os matrizes de 500 mL

| Matrizes de 500 mL | | | | | | |
|--------------------|---------------|---------------------|-------|---------------|---------------------|-------|
| Dia | Matraz 1 | | | Matraz 2 | | |
| | Conc (cel/mL) | Log (conc (cel/mL)) | Abs | Conc (cel/mL) | Log (conc (cel/mL)) | Abs |
| 0 | 1,50E+06 | 6,18 | 0,034 | 1,50E+06 | 6,18 | 0,034 |
| 1 | 1,67E+06 | 6,22 | 0,044 | 1,74E+06 | 6,24 | 0,045 |
| 2 | 2,73E+06 | 6,44 | 0,071 | 3,14E+06 | 6,50 | 0,077 |
| 3 | 4,44E+06 | 6,65 | 0,103 | 5,53E+06 | 6,74 | 0,111 |
| 4 | 5,87E+06 | 6,77 | 0,133 | 6,55E+06 | 6,82 | 0,144 |
| 5 | | | | | | |
| 6 | 8,35E+06 | 6,92 | 0,186 | 9,30E+06 | 6,97 | 0,207 |

Tabela II C - Dados utilizados para a construção das retas de calibração (DO_{680nm}-N^o células) para os matrizes de 1000 mL

| Dia | Matrizes de 1000 mL | | | | | | | | | | | |
|-----|---------------------|----------|------|-------|----------|------|-------|----------|------|-------|----------|------|
| | Abs | Conc* | Log* | Abs | Conc* | Log* | Abs | Conc* | Log* | Abs | Conc* | Log* |
| | M2 | | | M3 | | | M4 | | | M1 | | |
| 0 | 0,034 | 1,00E+06 | 6,00 | | | | | | | | | |
| 1 | 0,046 | 1,02E+06 | 6,01 | | | | | | | | | |
| 2 | 0,228 | 4,85E+06 | 6,69 | 0,265 | 6,27E+06 | 6,80 | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 0,793 | 2,64E+07 | 7,42 | | | | | | | 1,177 | 2,36E+07 | 7,37 |
| 5 | 1,311 | 3,26E+07 | 7,51 | 1,462 | 2,74E+07 | 7,44 | 1,176 | 2,95E+07 | 7,47 | 1,914 | 4,89E+07 | 7,69 |
| 6 | 2,102 | 4,64E+07 | 7,67 | | | | | | | | | |

*cel/mL

Tabela II D – Valores do caudal de arejamento nos matrizes de 1000 mL

| Cálculo caudais arejamento Matrizes | | | | | | |
|-------------------------------------|---------|---------|-----------|-----------|---------------|-------------|
| | Vi (mL) | Vf (mL) | Δ (vf-vi) | Tempo (s) | Caudal (mL/s) | Média mL/s) |
| Matraz 1 | 95 | 400 | 305 | 23 | 13 | 15 |
| | 115 | 480 | 365 | 21 | 17 | |
| Matraz 2 | 122 | 455 | 333 | 29,28 | 11 | 12 |
| | 120 | 350 | 230 | 16,9 | 14 | |
| | 97 | 430 | 333 | 27,6 | 12 | |
| | | | | | Média | 14 |

Anexo III

Tabela III - Dados para a construção da reta de calibração peso seco – densidade ótica

Peso Seco

| Amostra | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|-------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Diluição | 1:3 | | | 1:5 | | | 1:20 | | | Branco | |
| Densidade ótica (abs) | 1,085 | | | 0,69 | | | 0,184 | | | | |
| Volume filtrado (mL) | 20 | | | 40 | | | 100 | | | 100 | |
| Tara dos filtros (g) | 0,2098 | 0,2112 | 0,2091 | 0,2215 | 0,209 | 0,2163 | 0,2063 | 0,2105 | 0,2111 | 0,2078 | 0,2025 |
| Peso filtros + biomassa (g) | 0,215 | 0,2163 | 0,2144 | 0,2278 | 0,2155 | 0,2228 | 0,2104 | 0,2142 | 0,2147 | 0,2078 | 0,2025 |
| Peso biomassa (g) | 0,0052 | 0,0051 | 0,0053 | 0,0063 | 0,0065 | 0,0065 | 0,0041 | 0,0037 | 0,0036 | 0 | 0 |
| Média biomassa (g) | 0,0052 | | | 0,0064 | | | 0,0038 | | | 0 | 0 |
| Peso biom / L dil (g) | 0,26 | | | 0,16 | | | 0,038 | | | 0 | 0 |
| Peso biom / L sol inicial (g) | 0,78 | | | 0,80 | | | 0,76 | | | 0 | 0 |