



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA
LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA EM DESSALINIZAÇÃO

BRUNA DA SILVEIRA GUIMARÃES

ESTUDO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DA MICROALGA
Scenedesmus sp. EM MEIOS DE CULTIVO SALOBROS

Campina Grande, 2016

BRUNA DA SILVEIRA GUIMARÃES

ESTUDO DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DA MICROALGA
Scenedesmus sp. EM MEIOS DE CULTIVO SALOBROS

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós Graduação em Engenharia Química da
Universidade Federal de Campina Grande,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Engenharia Química.

Área de concentração: Recurso Regional e Meio Ambiente.

Data da defesa: 15 de Abril de 2016.

Resultado: _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Kepler Borges França (PhD)
Universidade Federal de Campina Grande.

Prof. Howard William Pearson (PhD)
Universidade Federal de Campina Grande.

Prof. Dr. Laércio Gomes de Oliveira
Universidade Federal de Campina Grande

Profa. Dra. Líbia de Sousa Conrado Oliveira
Universidade Federal de Campina Grande

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo seu amor e graça imerecidos; também pela oportunidade e capacidade que me foram dadas para concluir este trabalho.

À minha mãe e minha irmã pelo amor, ajuda e incentivo dispensados, não só neste momento, mas em toda minha vida.

Ao professor Kepler Borges França pela oportunidade de trabalhar no LABDES, pela orientação dada neste trabalho e pelos ensinamentos e conteúdos passados.

Aos meus colegas do LABDES pela ajuda dada sempre. Em especial à minha amiga Maniza pelos conhecimentos compartilhados.

À Universidade Federal de Campina Grande pela oportunidade de conclusão do trabalho.

À CAPES, pela ajuda estrutural e financeira concedidas para a realização deste trabalho.

“Porque Dele e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; glória, pois, a Ele eternamente. Amém.”
Romanos 11:36

RESUMO

As microalgas são microrganismos unicelulares que podem crescer tanto em água doce como salgada. São clorofilados e estão em praticamente todos os tipos de água do planeta. Seu cultivo vem cada vez mais despertando o interesse, já que a aplicabilidade vem sendo observada em vários segmentos tais como no tratamento de água, nutrição e na geração de energia. A microalga *Scenedesmus* sp., é clorofilada, unicelular e uninucleada e pertencem à família Scenedesmaceae, gênero *Scenedesmus*. Tal microalga é mais comum em água doce, podendo ser encontrada com menor frequência em águas salobras, com salinidade entre 0,05 e 3% de sais (500 a 30000 ppm). Possuem forma elipsoidal, colônias lineares e agrupadas em números de 4, 8, 16 ou 32. Este trabalho teve como objetivo o estudo da cinética de crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. em meios salobros, através produção de dois meios de cultivo sintéticos com adição dos sais NaCl e MgCl₂, visando a possibilidade de posteriores aproveitamentos de águas salobras para a produção de microalgas. Foi verificado se a presença dos sais tem influência no crescimento de tais microrganismos. Analisando as curvas de crescimento microbiano da microalga *Scenedesmus* sp., observou-se que nos meios contendo o cloreto de magnésio a fase *Lag* ou de latência praticamente não ocorreu, com exceção do meio com concentração de 8000 mg.L⁻¹, indicando que a microalga demorou menos tempo para se adaptar ao meio com adição de MgCl₂, se comparado com os meios contendo NaCl. Constatou-se também que a influência do íon cloreto no crescimento da microalga foi diminuída devido à presença dos íons sódio e magnésio, que são nutrientes importantes no metabolismo celular. Analisando os parâmetros cinéticos calculados (velocidade máxima de crescimento, produtividade em biomassa e tempo de geração), observou-se que os melhores resultados foram obtidos nos meios contendo cloreto de magnésio, indicando uma melhor cinética de crescimento nestes meios, se comparado com os que continham NaCl. Isto ocorreu devido ao fato de que o Mg é classificado como um macronutriente ou nutriente essencial, importante para o metabolismo celular da microalga e o sódio um micronutriente (necessário em menores quantidades), sendo mais observada a influência daquele íon no crescimento da microalga do que dos íons de sódio. Baseado nos resultados cinéticos obtidos, constatou-se a possibilidade de crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. em meios salobros.

Palavras-chave: Microalgas. Cinética. Microbiologia.

ABSTRACT

Microalgae are unicellular microorganisms that can grow in both freshwater and saltwater. They are chlorophyll and are practically in all kinds of water on the planet. Its cultivation is increasingly attracting interest since the applicability has been observed in several segments, such as in the treatment of water, nutrition and energy generation. The microalgae *Scenedesmus* sp. is chlorophyllated, unicellular and uninucleate and belongs to Scenedesmaceae family, genus Scenedesmus. This microalgae is more common in fresh water and can be found less frequently in brackish water with salinity between 0.05 and 3% salts (500-30000 ppm). It has ellipsoidal shape, linear colonies and grouped in numbers 4, 8, 16 or 32. This study aimed growth kinetics study of microalgae *Scenedesmus* sp. in brackish means, by producing two synthetic culture media with the addition of NaCl and MgCl₂ salts, with a view to possible subsequent utilizations of brackish water for the production of microalgae. It has been found that the presence of salts influences the growth of such microorganisms. Analyzing the microbial growth curves of the microalgae *Scenedesmus* sp., it was noted that, in the means containing magnesium chloride, the *Lag* phase or latency hardly occurred, with the exception of media with concentration of 8000 mg.L⁻¹, indicating that the microalgae took less time to adapt to the medium with addition of MgCl₂, compared with media containing NaCl. It was also found that the influence of chloride ion in the growth of microalgae was decreased due to the presence of sodium and magnesium ions, nutrients that are important in cellular metabolism. By analyzing the calculated kinetic parameters (maximum growth rate, productivity of biomass and generation time), it was observed that the best results were obtained in media containing magnesium chloride, indicating a better growth kinetics in these media compared to those containing NaCl. This was due to the fact that Mg is classified as a macronutrient or essential nutrient, important for cell metabolism of microalgae, and sodium is classified as a micronutrient (required in smaller amounts). The influence of that ion (Mg) in microalgae growing has been more observed than sodium ions influence. Based on the kinetic results, the possibility of the microalga *Scenedesmus* sp growth. in brackish means has been verified.

Keywords: Microalgae. Kinetics. Microbiology.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 01 – Tipos de algas e suas características..... | 7 |
| Tabela 02 – Teor de lipídeos para espécies de microalgas do gênero <i>Scenedesmus</i> | 9 |
| Tabela 03a – Reagentes utilizados para preparação do meio WC..... | 30 |
| Tabela 03b – Composição do meio..... | 31 |
| Tabela 04 – Valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ para o meio WC com adição de NaCl..... | 57 |
| Tabela 05 – Valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ para o meio WC com adição de MgCl ₂ | 58 |
| Tabela 06 – Resultados da produtividade em biomassa e tempo de geração (Meio WC + NaCl) | 59 |
| Tabela 07 – Resultados da produtividade em biomassa e tempo de geração (Meio WC + MgCl ₂)..... | 59 |
| Tabela 08 – Comparação dos tempos de geração..... | 61 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 01 – Ilustração célula eucariótica..... | 4 |
| Figura 02 – Esquema das Reações da Fotossíntese..... | 11 |
| Figura 03 - Comportamento da taxa de fotossíntese em função da intensidade luminosa... .. | 12 |
| Figura 04 – Lagoa Fotossintética..... | 13 |
| Figura 05 – Fotobiorreator tipo placas..... | 14 |
| Figura 06 – Fotobiorreator Tubular..... | 15 |
| Figura 07 – Log do número de células em função do tempo..... | 23 |
| Figura 08 – Comportamento da biomassa, substrato e produtos em função do tempo..... | 25 |
| Figura 09 – Fluxograma da metodologia utilizada..... | 28 |
| Figura 10 – Foto microscópica da microalga <i>Scenedesmus</i> sp..... | 31 |
| Figura 11 - Cultivo da microalga..... | 32 |
| Figura 12 - Inóculo no meio WC com adição dos sais..... | 33 |
| Figura 13 – Contagem diária do número de células por mL..... | 34 |
| Figura 14 – Curva de crescimento microbiano da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. em meio com 1000 mg.L ⁻¹ de NaCl..... | 35 |
| Figura 15 – Curva de crescimento microbiano da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. em meio com 1000 mg.L ⁻¹ de MgCl ₂ | 36 |
| Figura 16 – Curva de crescimento microbiano da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. em meio com 2000 mg.L ⁻¹ de NaCl..... | 36 |
| Figura 17 – Curva de crescimento microbiano da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. em meio com 2000 mg.L ⁻¹ de MgCl ₂ | 37 |
| Figura 18 – Curva de crescimento microbiano da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. em meio com 3000 mg.L ⁻¹ de NaCl..... | 37 |
| Figura 19 – Curva de crescimento microbiano da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. em meio com 3000 mg.L ⁻¹ de MgCl ₂ | 38 |
| Figura 20 – Curva de crescimento microbiano da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. em meio com 4000 mg.L ⁻¹ de NaCl..... | 38 |
| Figura 21 – Curva de crescimento microbiano da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. em meio com 4000 mg.L ⁻¹ de MgCl ₂ | 39 |
| Figura 22 – Curva de crescimento microbiano da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. em meio com 5000 mg.L ⁻¹ de NaCl..... | 39 |

| | |
|--|----|
| Figura 23 – Curva de crescimento microbiano da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. em meio com 5000 mg.L ⁻¹ de MgCl ₂ | 40 |
| Figura 24 – Curva de crescimento microbiano da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. em meio com 6000 mg.L ⁻¹ de NaCl. | 40 |
| Figura 25 – Curva de crescimento microbiano da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. em meio com 6000 mg.L ⁻¹ de MgCl ₂ | 41 |
| Figura 26 – Curva de crescimento microbiano da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. em meio com 7000 mg.L ⁻¹ de NaCl. | 41 |
| Figura 27 – Curva de crescimento microbiano da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. em meio com 7000 mg.L ⁻¹ de MgCl ₂ | 42 |
| Figura 28 – Curva de crescimento microbiano da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. em meio com 8000 mg.L ⁻¹ de NaCl. | 42 |
| Figura 29 – Curva de crescimento microbiano da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. em meio com 8000 mg.L ⁻¹ de MgCl ₂ | 43 |
| Figura 30 – Curva de crescimento microbiano da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. em meio com 9000 mg.L ⁻¹ de NaCl. | 43 |
| Figura 31 – Curva de crescimento microbiano da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. em meio com 9000 mg.L ⁻¹ de MgCl ₂ | 44 |
| Figura 32 – Curva de crescimento microbiano da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. em meio com 10000 mg.L ⁻¹ de NaCl. | 44 |
| Figura 33 – Curva de crescimento microbiano da microalga <i>Scenedesmus</i> sp. em meio com 10000 mg.L ⁻¹ de MgCl ₂ | 45 |
| Figura 34 – Análise da fase de crescimento exponencial (1000 mg.L ⁻¹ de NaCl). | 47 |
| Figura 35 – Análise da fase de crescimento exponencial (1000 mg.L ⁻¹ de MgCl ₂). | 47 |
| Figura 36 – Análise da fase de crescimento exponencial (2000 mg.L ⁻¹ de NaCl). | 48 |
| Figura 37 – Análise da fase de crescimento exponencial (2000 mg.L ⁻¹ de MgCl ₂). | 48 |
| Figura 38 – Análise da fase de crescimento exponencial (3000 mg.L ⁻¹ de NaCl). | 49 |
| Figura 39 – Análise da fase de crescimento exponencial (3000 mg.L ⁻¹ de MgCl ₂). | 49 |
| Figura 40 – Análise da fase de crescimento exponencial (4000 mg.L ⁻¹ de NaCl). | 50 |
| Figura 41 – Análise da fase de crescimento exponencial (4000 mg.L ⁻¹ de MgCl ₂). | 50 |
| Figura 42 – Análise da fase de crescimento exponencial (5000 mg.L ⁻¹ de NaCl). | 51 |
| Figura 43 – Análise da fase de crescimento exponencial (5000 mg.L ⁻¹ de MgCl ₂). | 51 |
| Figura 44 – Análise da fase de crescimento exponencial (6000 mg.L ⁻¹ de NaCl). | 52 |

| | |
|--|----|
| Figura 45 – Análise da fase de crescimento exponencial (6000 mg.L ⁻¹ de MgCl ₂). | 52 |
| Figura 46 – Análise da fase de crescimento exponencial (7000 mg.L ⁻¹ de NaCl). | 53 |
| Figura 47 – Análise da fase de crescimento exponencial (7000 mg.L ⁻¹ de MgCl ₂). | 53 |
| Figura 48 – Análise da fase de crescimento exponencial (8000 mg.L ⁻¹ de NaCl). | 54 |
| Figura 49 – Análise da fase de crescimento exponencial (8000 mg.L ⁻¹ de MgCl ₂). | 54 |
| Figura 50 – Análise da fase de crescimento exponencial (9000 mg.L ⁻¹ de NaCl). | 55 |
| Figura 51 – Análise da fase de crescimento exponencial (9000 mg.L ⁻¹ de MgCl ₂). | 55 |
| Figura 52 – Análise da fase de crescimento exponencial (10000 mg.L ⁻¹ de NaCl). | 56 |
| Figura 53 – Análise da fase de crescimento exponencial (10000 mg.L ⁻¹ de MgCl ₂). | 56 |
| Figura 54 – Análise da fase de crescimento exponencial (Meio de Controle). | 57 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ_m – Velocidade Máxima de Crescimento da Microalga (h^{-1})

μ_x – Velocidade Específica de Crescimento da Microalga (h^{-1})

ADP – Adenosina Difosfato

ATP – Adenosina Tifosfato

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

EDTA – Etileno diamino tetraacético dissódico

I_K - Saturação da irradiação

LABDES – Laboratório de Referência em Dessalinização

$NADPH_2$ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato mais dois íons de H^+

NREL - National Renewable Energy Laboratory

$P_{m\acute{a}x}$ - Taxa máxima de fotossíntese

P_X - Produtividade em biomassa ($cél.mL^{-1}.h^{-1}$)

r_P – Velocidade de produção dos produtos (N^0 de células/mL.h)

r_S – Velocidade de consumo do substrato (N^0 de células/mL.h)

r_X – Velocidade de produção da biomassa (N^0 de células/mL.h)

t_f - Tempo total do processo (h)

t_g – Tempo de geração (h)

UFMG – Universidade Federal de Campina Grande

WC - Water Culture

X_0 - Concentração inicial de células (N^0 de células/mL)

X_m - Concentração máxima de células (N^0 de células/mL)

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| 1. | INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2. | OBJETIVOS | 3 |
| 2.1 | Objetivo Geral..... | 3 |
| 2.2 | Objetivos Específicos | 3 |
| 3 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 4 |
| 3.1 | Algas | 4 |
| 3.1.1 | Âmbito Histórico | 5 |
| 3.1.2 | Microalgas | 6 |
| 3.1.3 | Divisão Chlorophyta..... | 8 |
| 3.1.4 | Gênero <i>Scenedesmus</i> | 8 |
| 3.2 | Metabolismo Energético | 9 |
| 3.2.1 | Fotossíntese..... | 10 |
| 3.3 | Métodos de Cultivo | 13 |
| 3.4 | Vantagens da produção de microalgas..... | 15 |
| 3.5 | Fatores que afetam o crescimento das microalgas | 16 |
| 3.5.1 | Temperatura..... | 16 |
| 3.5.2 | Intensidade Luminosa..... | 17 |
| 3.5.3 | Mistura e Aeração | 18 |
| 3.5.4 | Disponibilidade de Nutrientes | 19 |
| 3.5.5 | pH..... | 20 |
| 3.6 | Biorreatores..... | 20 |
| 3.7 | Crescimento Microbiano | 21 |
| 3.7.1 | Fases do Crescimento Microbiano..... | 22 |
| 3.8 | Classificação da água quanto à sua salinidade | 23 |
| 3.9 | Cinética de Crescimento de Microalgas..... | 24 |
| 3.9.1 | Velocidade Específica de Crescimento..... | 26 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS | 28 |
| 4.1 | Fluxograma do processo | 28 |

| | | |
|-----|--|----|
| 4.2 | Cultivo da Microalga | 29 |
| 4.3 | Preparação do meio de cultivo com adição dos sais..... | 32 |
| 4.4 | Acompanhamento do Crescimento..... | 34 |
| 5 | RESULTADO E DISCUSSÃO..... | 35 |
| 5.1 | Análise de Crescimento..... | 35 |
| 5.2 | Cinética de Crescimento..... | 46 |
| 6 | CONCLUSÕES..... | 62 |
| 7 | SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 64 |
| 8. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 65 |
| 9. | ANEXOS..... | 70 |

1. INTRODUÇÃO

No nordeste brasileiro a principal forma de obtenção de água potável se dá através da captação de águas subterrâneas, que na maioria das vezes são águas salobras, e, por isso necessitam ser dessalinizadas, o que gera um rejeito concentrado, que possui altas concentrações de sais minerais. Um mal manejo deste rejeito pode causar vários problemas ambientais, tais como a salinização do solo e infertilidade da terra. Neste cenário as microalgas despontam como uma alternativa na purificação destas águas residuais, já que tais microrganismos assimilam os nutrientes presentes no rejeito salobro, incorporando-os em sua biomassa, que posteriormente pode ser utilizada na produção de biocombustíveis (MORIOKA, *et al.*, 2014)

A produção de biomassa realizada pelas microalgas (polissacarídeos, proteínas, lipídios e hidrocarbonetos), também pode ser aplicada na alimentação humana e de animais, na produção de determinados compostos químicos e na captação de dióxido de carbono na atmosfera. Na produção de biocombustíveis este microrganismos possuem grande potencial devido ao alto teor de lipídeos produzidos, que podem ser extraídos através de solventes orgânicos.

No ciclo de crescimento das microalgas pode-se destacar quatro fases, sendo a primeira a fase *lag*, onde as células ainda não estão se dividindo, e sim ainda estão na fase de sintetização dos constituintes celulares. A ocorrência desta fase depende de fatores como idade e concentração do inóculo e das condições de incubação. A segunda fase é a de aceleração onde grande quantidade de células está se multiplicando. A terceira fase é chamada de exponencial, *log* ou logarítmica, onde as células se duplicam de forma exponencial. Na fase de desaceleração uma quantidade crescente de células não está mais de multiplicando. Já na fase estacionária a taxa de geração de células é a mesma da taxa de morte. Tal fase ocorre devido à diminuição da disponibilidade dos nutrientes, a presença de componentes tóxicos e mudanças ambientais. A última fase é a de morte onde a quantidade de células que são geradas são bem inferiores às que estão morrendo

É importante frisar que mudanças nas concentrações de sais afetam os microrganismos no que envolve a perturbação osmótica a qual os mesmos são

submetidos, afetando a quantidade de água intracelular, o estresse causado pelo aumento ou diminuição da concentração de íons dentro da célula e por último afeta a permeabilidade seletiva de íons da membrana celular. O termo ajuste osmótico é utilizado para descrever as mudanças bioquímicas e fisiológicas que ocorrem, devido ao estresse causado pelo sal contido na água, na estrutura celular das algas.

Uma quantidade finita de solutos orgânicos podem ser utilizados para o ajuste da pressão osmótica interna das microalgas quando ocorre mudança na salinidade externa, sendo os mais utilizados pelos organismos halotolerantes (que se adaptam ao meio salino) o glicerol e a prolina. Além desses pode-se utilizar solutos osmorregulatórios orgânicos ou íons inorgânicos. A concentração máxima de sal que a microalga suporta é função da sua capacidade de manter os íons necessários para as funções metabólicas. Sendo assim podem-se estipular valores máximos e mínimos de tolerância ao sal que não afetem a vida destes microrganismos. É observado também que um aumento significativo na concentração de sais pode ocasionar uma inibição na atividade fotossintética da microalga, diminuições bruscas na quantidade de sais afetam a fotossíntese das microalgas que possuem paredes celulares fortes e as que possuem parede celular mais fraca se mostram mais sensíveis às mudanças na salinidade da água (HELLEBUST, 1985).

O Laboratório de Referência em Dessalinização – LABDES, localizado na Universidade Federal de Campina Grande é atual referência no estudo e aprimoramento de tecnologias de reuso, purificação, dessalinização da água. Além disso vem buscando por tecnologias alternativas no âmbito biológico, procurando sempre métodos alternativos de tratamento de efluentes, que visam a diminuição de custos e impacto ambiental.

O presente trabalho procurou estudar a cinética de crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. em meio de cultivo com adição dos sais NaCl (cloreto de sódio) e MgCl₂ (cloreto de magnésio), avaliando a adaptação do microrganismo em tais meios, bem como parâmetros cinéticos serão observados e estudados, verificando em que situação a microalga obteve melhor cinética de crescimento, visando o cultivo de tal microalga em águas salobras.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o potencial de produção de biomassa da microalga *Scenedesmus* sp. em meios salobros, através da cinética de crescimento, visando a possibilidade de reaproveitamento futuro de águas salobras.

2.2 Objetivos Específicos

- A partir dos valores médios das concentrações celulares analisar as curvas de crescimento da microalga nos meios com a adição de sais, comparando com o meio de controle (sem adição de sais).
- Verificar em qual meio a microalga levou mais tempo para se adaptar devido à adição do NaCl e MgCl₂.
- Estudar se, devido ao fato do magnésio ser um macronutriente e o sódio um micronutriente, importantes para o crescimento celular, a presença de tais íons nos meios salobros vai proporcionar o crescimento da microalga, diminuindo a influência dos íons cloreto presentes nos meios salobros.
- Através dos dados obtidos realizar cálculos cinéticos de velocidade máxima de crescimento, produtividade em termos de biomassa e tempo de geração.
- Analisar a cinética de crescimento de cada meio, comparando sempre com o meio de controle.
- Verificar o desempenho da produção de biomassa e realizar a comparação entre os meios com os sais cloreto de sódio e cloreto de magnésio.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Algas

Conforme afirma Delabary, (2012) as algas englobam uma enorme gama de organismos, os quais apresentam estrutura celular interna eucariótica (ou eucariotas). As células eucarióticas apresentam estrutura celular mais complexa, onde as organelas são delimitadas por membranas. Tais células apresentam um tamanho maior, se comparadas com as procarióticas. Dentre as organelas celulares pode-se destacar as mitocôndrias e cloroplastos, os quais estão presentes em células fotossintetizantes. Estas organelas atuam em processos celulares que produzem energia (através da respiração e fotossíntese). A Figura 01 ilustra a estrutura celular eucariótica.

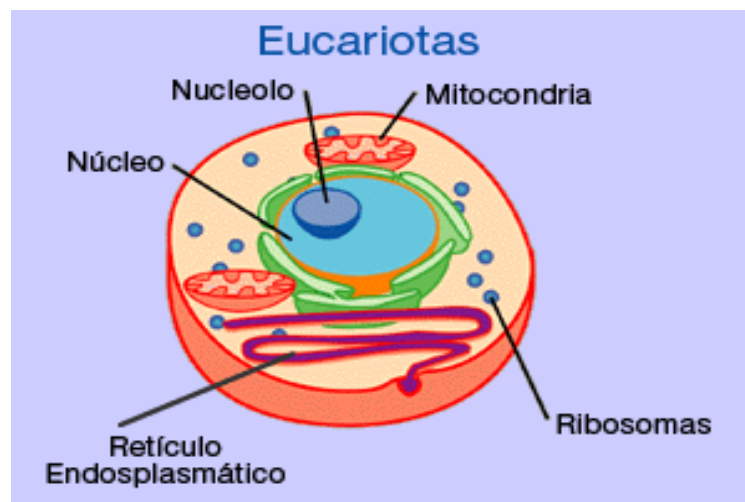


Figura 01 – Ilustração célula eucariótica.
Fonte: <http://denilsonbio.blogspot.com.br/2012/03/blog-post.html>

De acordo com Lourenço, (2006) baseado em suas diferenças, as microalgas recebem suas subdivisões baseadas em: número de células (unicelulares ou pluricelulares), dimensão, recebendo a denominação de microalgas as algas que apresentam dimensões microscópicas e as macroalgas, as espécies que possuem

dimensões macroscópicas, as quais podem atingir altura superior a 30 metros para espécies marinhas. Podem viver em colônias ou vida livre e contém clorofila, dando a coloração verde na maioria dos casos e a depender do pigmento mais abundante podem apresentar coloração marrom e vermelha.

3.1.1 Âmbito Histórico

Russo, (2011) mostra que o interesse em se utilizar microalgas em escala industrial ocorreu primeiramente na Alemanha, no período da Segunda Guerra Mundial, sendo utilizada principalmente como uma alternativa barata para a obtenção de proteínas, já que a principal fonte de tal nutriente, a carne animal, estava escassa na época. Posteriormente muitos estudos foram realizados por parte dos EUA e Japão no sentido de aprimoramento das culturas, porém sem sucesso. Na década de 70 os progressos ocorreram na utilização de culturas na produção de pigmentos, suplementos alimentares e vitaminas no ramo da indústria farmacêutica. Nessa mesma década, em virtude das duas crises petrolíferas de 1973 e 1979, o Departamento de Energia dos EUA começou a investigar o potencial das microalgas na produção dos biocombustíveis. Para isso, o *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) e o Departamento Americano de Energia começaram a produzir biodiesel a partir de microalgas, as quais eram cultivadas em tanques. A iniciativa de tais órgãos ficou conhecida com *Aquatic Species Program*, contudo devido à falta de financiamento a produção cessou no ano de 1996.

Com relação à utilização atual das microalgas e suas aplicações Baumgartner *et al.*, (2013) afirmam que os usos dos cultivos de tais microrganismos são inúmeros e a biomassa produzida é utilizada para os mais variados fins, podendo-se citar a alimentação humana e animal por meio dos suplementos alimentares, indústria de cosméticos, tratamento de águas residuárias e na produção de biocombustíveis. Esse avanço observado na aplicabilidade e utilização deste microrganismo se dá principalmente ao aumento das atividades, processos e aplicações que envolvem as microalgas, já que as substâncias por elas produzidas, tais como ácidos graxos poli-insaturados, carotenóides, ficobilinas, polissacarídeos, vitaminas, esteróis e vários compostos bioativos naturais. Diante do exposto, o estudo mais aprofundado e o

desenvolvimento de técnicas de melhoramento na produção de biomassa tem se mostrado uma grande possibilidade e revelado uma importância primordial.

3.1.2 Microalgas

Schmitz, *et al.*, (2012) destacam que as microalgas são um grupo bastante diversificado de microrganismos. Tais seres são aquáticos, sendo na maioria das vezes microscópicos e unicelulares, possuem a capacidade de formação de colônia, não acontecendo, porém com todos os tipos de microalgas e apresentam pouca ou nenhuma diferenciação celular. O termo “microalga” consegue abranger os microrganismos algais que possuem clorofila a bem como outros pigmentos que os tornam capazes de realizar a fotossíntese. Sendo assim, como definição geral pode-se dizer que microalgas são seres fotossintetizantes que, com a combinação de água e dióxido de carbono do ar atmosférico, juntamente com luz solar são capazes de produzir diversas formas de energia, produzindo assim biomassa, que são os polissacarídeos, proteínas, lipídios e hidrocarbonetos. Tais compostos podem ser empregados na produção de biocombustíveis e suplementos alimentares e também na absorção do dióxido de carbono da atmosfera, que é liberado através do escapamento de veículos, no setor industrial, entre outros (ANDRADE E COSTA, 2008).

As microalgas são microrganismos com estrutura celular eucariótica sendo representadas pelas divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta (Prymnesiophyta), Heterokontophyta (Bacillariophyceae, Chrysophyceae, Xanthophyceae etc.), Cryptophyta e Dinophyta. Tais divisões seguem alguns critérios, sendo eles: os tipos de pigmentos, a natureza química dos produtos de reserva e os constituintes da parede celular. Além destes também são observados parâmetros celulares e morfológicos tais como presença de flagelos nas células e sua estrutura, o modo como ocorre a divisão celular e como são formados os núcleos, bem como a observação do envoltório presente nos cloroplastos. (TOMASELLI, 2004)

As principais linhagens de tais microrganismos são descritas por Raven *et al.*, (2005). Primeiramente as *diatomáceas* (Bacillariophyta), que contabilizam um número aproximado de 100.000 espécies e são tidas como a espécie que domina o

fitoplâncton dos oceanos. Tais algas apresentam sílica como constituinte da parede celular e reservam o carboidrato através do óleo ou polímeros de carboidrato, que são chamados de crisolaminarina. As algas verdes (*Chlorophyceae*) abrangem cerca de 17.000 espécies e são encontradas em água salgada ou doce. A produção energética desse tipo de microalga é feita principalmente em forma de amido. Outro tipo são as cianobactérias (*Cyanophyta*), que desempenham um importante papel na atmosfera na captação do CO₂. Elas possuem cerca de 2.000 espécies e podem ser encontradas nos mais diversos ambientes. Por último pode-se destacar as algas douradas (*Chrysophyceae*), tendo por volta de 1.000 espécies, sendo a sua maioria de água doce. Delabary, (2012) mostra na Tabela 01 os diferentes tipos de microalgas e suas características principais.

Tabela 01 – Tipos de algas e suas características.

| Grupo de Algas | Nome comum | Morfologia | Pigmentos | Reserva | Parede Celular | Principais Habitats |
|-----------------------|-----------------|-------------------------------------|--|---------------------|--|-----------------------------|
| Chlorophyta | Algas verdes | Unicelular Folhosa | Clorofila a e b | Amido | Celulose | Água doce, solos e marinhos |
| Euglenophyta | Euglenóide | Unicelular Flagelada | Clorofila a e b | Paramilo | Ausência de Parede | Água doce e marinhos |
| Dinoflagellata | Dinoflagelados | Unicelular Flagelada | Clorofila a e c xantofila | Amido | Celulose | Principalmente marinhos |
| Chrisophyta | Diatomácea | Unicelular | Clorofila a e c | Lipídeos | Dois componentes sobrepostos, compostos por sílica | Água doce, solos e marinhos |
| Phaeophyta | Algas marrons | Filamentosa/folhosa pode ser maciça | Clorofila a e c xantofila | Lammarina | Celulose | Marinhos |
| Rhodophyta | Algas vermelhas | Unicelular Filamentosa Folhosa | Clorofila a e d xantofila Ficocianina Ficoeritrina | Amido das florídeas | Celulose | Marinhos |

Fonte: DELABARY, (2012)

Observando o metabolismo energético das microalgas Satyanarayana *et al.*, (2010) afirmam que a principal forma de obtenção de energia de tais seres é a autotrófica através da fotossíntese, onde é utilizada a energia luminosa para o processamento da reação entre o CO₂ e a água dando como produto o açúcar C₆H₁₂O₆. A célula utiliza o carbono fixado como glucose para a síntese das outras moléculas que desempenham um importante papel na célula. Tais moléculas podem

ser produzidas por diferentes caminhos metabólicos sendo eles a glicólise, ciclo de Krebs, síntese de lipídeos, síntese de aminoácidos, entre outros. Porém as microalgas podem realizar a obtenção de energia pelo processo heterotrófico de fixação do carbono orgânico, ou também podem combinar os dois processos (autotrófico e heterotrófico). Nesse caso o processo é chamado de mixotrófico, onde se utiliza a energia luminosa para a realização da fotossíntese, bem como o carbono orgânico para obtenção de energia.

3.1.3 Divisão Chlorophyta

Delabary, (2012) discorre que a divisão Chlorophyta, que é representada pelas algas verdes compreendem organismos microscópicos e macroscópicos, habitam naturalmente em ambientes de água doce (dulcícolas), salobros e marinhos. O número aproximado de organismos desta divisão é de 17.000, sendo divididos nas seguintes classes: Micromonadophyceae, Charophyceae, Ulvophyceae e Chlorophyceae. No grupo das algas Chlorophyta é observado uma grande variedade morfológica, onde se observa que as algas possuem clorofilas a e b, caroteno e xantofilas. A celulose participa da composição da parede celular e tais microrganismos acumulam o amido (α -1,4-glicano) como sendo o carboidrato de reserva. Como outra característica destacam-se os cloroplastos que são envoltos por duas membranas, atuando como um envelope. Estas estruturas não possuem retículo endoplasmático e os tilacóides (sistema de membranas em forma de vesículas achatadas, onde se aloca as moléculas de clorofila, responsáveis pela captação da energia luminosa utilizada no processo de fotossíntese) são empilhados (BONINI, 2012).

3.1.4 Gênero *Scenedesmus*

Bicudo & Menezes (2006) relatam que o total de divisões e classes das microalgas são onze e trinta, respectivamente. Dentro da divisão Chlorophyta encontra-se a classe Chlorophyceae, família Cnedsraceae e gênero

Scenedesmus. As microalgas que fazem parte do gênero *Scenedesmus* são seres clorofilados unicelulares e uninucleados que vivem em forma de colônia, com o número de células variando entre 2, 8, 16 ou 32 e são flutuantes na água, tendo a característica de nutrição para o zooplâncton, podendo ser útil na aquicultura. Tais microalgas são encontradas principalmente nos locais eutróficos, ou seja, com grande concentração de nutrientes. Quanto à colonização da microalga *Scenedesmus*, a mesma se dá por auto esporulação, onde um célula produz uma colônia com um número fixo de célula, sendo essas colônias chamadas de cenóbio. Quanto ao teor de lipídeos encontrado nas células, este varia de espécie para espécie (DZUMAN, 2013). A Tabela 2 mostra o teor de lipídeos encontrados em algumas espécies de microalgas do gênero *Scenedesmus*.

Tabela 02 – Teor de lipídeos para espécies de microalgas do gênero *Scenedesmus*.

| Microalga | Teor Lipídico (%) |
|------------------------------------|-------------------|
| <i>Scenedesmus obliquos</i> | 13,0 |
| | 9,4 |
| | 14,1 |
| <i>Scenedesmus quadricauda</i> | 18,4 |
| <i>Scenedesmus sp. F&M-M19</i> | 19,6 |
| <i>Scenedesmus sp. DM</i> | 21,1 |

Fonte: Dzuman, (2013)

3.2 **Metabolismo Energético**

É necessária uma fonte energética para o crescimento das microalgas, seja essa fonte proveniente da energia luminosa, que está relacionada com o crescimento autotrófico ou proveniente de um composto orgânico para o crescimento heterotrófico. A fonte de carbono no crescimento autotrófico é o CO₂ do ar atmosférico ou o HCO₃⁻ dissolvido na água, bem como macronutrientes (NPK) e os micronutrientes, que são os metais e em alguns casos as vitaminas. Dentre os autotróficos Delabary, (2012) destaca que há os seres fotoautotróficos, que captam a energia unicamente da luz e os heteroautotróficos ou quimioautotróficos, que através dos compostos inorgânicos e íons conseguem absorver a energia

necessária ao seu metabolismo. Na realização da fotossíntese são produzidas as biomoléculas necessárias à célula, sendo elas os polissacarídeos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Já no cultivo heterotrófico a fonte de energia e carbono utilizados pela célula são compostos orgânicos produzidos por outros organismos. No cultivo mixotrófico são utilizados a luz, compostos orgânicos e inorgânicos como fonte energética e de CO₂. (FRANCO, 2013).

Referente ao mecanismo fotoautotrófico, mecanismo em que a energia necessária para o metabolismo celular é obtida através da luz, Delabary, 2012 mostra que no processo de fotossíntese há a conversão da energia luminosa (substrato) em energia química. Desse modo a atividade fotossintética irá influenciar no crescimento microalgal, notando-se que maiores intensidades luminosas irão acarretar em maiores taxas específicas de crescimento. Porém Yan *et al.*, (2011) destacam a necessidade de se manter um equilíbrio, pois uma baixa iluminação não fornece uma quantidade suficiente de energia para a realização da fotossíntese, enquanto que uma alta luminosidade pode acarretar na fotoinibição, em que se desestrutura fisiologicamente a célula não permitindo, assim, taxas satisfatórias de atividade fotossintética.

Já sobre o cultivo heterotrófico Lopes, (2014) comenta que os compostos orgânicos que são utilizados pelas microalgas como fonte de energia e carbono são o glicerol, glicose e acetato. Tal mecanismo apresenta vantagem em relação ao autotrófico, já que um maior controle no processo de cultivo dos microrganismos é possível, bem como baixo custo e uma maior concentração de biomassa obtida. No processo mixotrófico é observada a utilização das fontes de carbono tanto obtida pelo ar atmosférico, através do CO₂, como através de fontes orgânicas, tal como ocorre no mecanismo heterotrófico, os dois processos acontecendo simultaneamente.

3.2.1 Fotossíntese

Os microrganismos capazes de realizar a fotossíntese são os fotoautotróficos e os mixotróficos. Tal processo é abordado por Alberts *et al.*, (1997) como sendo a conversão de energia luminosa por parte dos organismos fotoautotróficos em

energia química sob a forma de carboidratos. Azeredo, (2012) destaca que tal processo, em células eucarióticas ocorre nos cloroplastos, que possuem camadas lipoproteicas chamadas de tilacoides e uma fase aquosa, a qual é chamada de estroma. A força motriz na fotossíntese é a energia luminosa captada pela clorofila ou outros pigmentos, que irá desencadear uma reação de oxirredução, onde há a doação de elétrons pela molécula de água provocando a redução do CO_2 para carboidratos, obtendo como produto o O_2 . A reação global da fotossíntese pode ser dividida em duas reações secundárias. A primeira depende da luz para a sua ocorrência, a chamada fase clara, e a segunda é independente da incidência de luz, a chamada fase escura.

As reações de claro ocorrem nas membranas fotossintéticas, ou seja, nos tilacoides, localizados nos cloroplastos. Nestas estruturas ocorre a conversão da energia luminosa em NADPH_2 (Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato mais dois íons de H^+) que atua como um redutor bioquímico e ATP (Adenosina Trifosfato), um composto altamente energético (MASOJIDEK *et al.*, 2004). As chamadas reações de escuro são as reações de fixação e redução do carbono a compostos orgânicos, na maioria açúcares, e ocorre a partir dos produtos da reação de claro (NADPH_2 e ATP). As reações ocorrem no estroma, que é a matriz fluida do cloroplasto, onde estão localizadas as enzimas que catalisam tais reações. O NADPH_2 e ATP atuam na síntese de carboidratos a partir de CO_2 e água (KLUGE *et al.*, 2015). A Figura 02 mostra o esboço das reações intracelulares na fotossíntese.

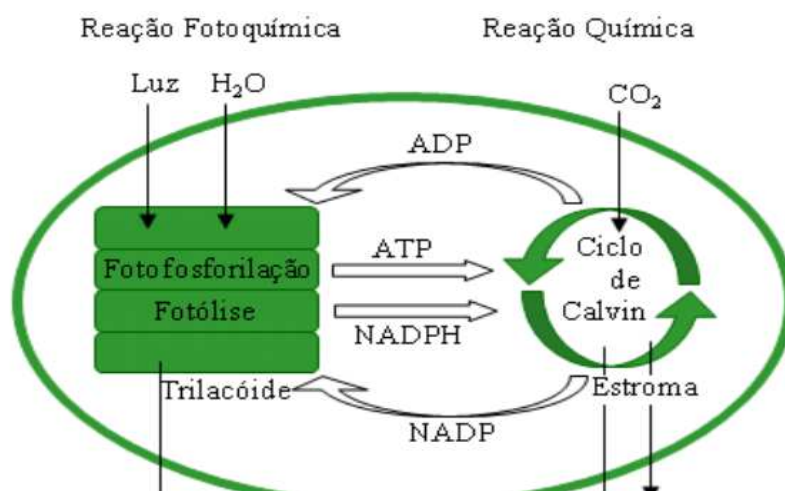
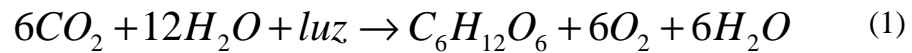


Figura 02 – Esquema das Reações da Fotossíntese.
Fonte: Dzuman, (2013)

A reação global da fotossíntese é escrita da seguinte forma:



A Figura 03 mostra o gráfico da taxa de fotossíntese em função da intensidade luminosa (AZEREDO, 2012). Levando-se em conta que um dos produtos finais da fotossíntese é o O_2 , pode-se medir a eficiência fotossintética dos microrganismos através a produção de O_2 em função da intensidade luminosa, mostrada através da Figura 03, sendo a inclinação inicial $\alpha = P_{\max} / I_K$, onde I_K é a saturação da irradiação e P_{\max} é a taxa máxima de fotossíntese. Quando há locais com baixa intensidade de luz é observado que a fotossíntese depende linearmente da intensidade luminosa. Em contrapartida com o aumento desenfreado da intensidade luminosa observa-se que o processo fotossintético torna-se cada vez menos eficiente, verificando-se que o aumento na irradiação de luz não provoca nenhum aumento na atividade fotossintética. Este fenômeno é conhecido por fotoinibição.

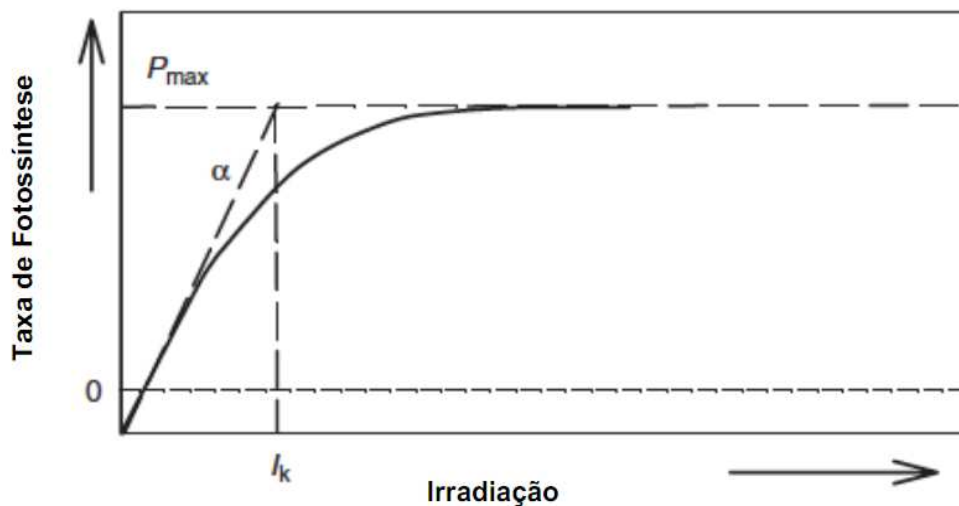


Figura 03 - Comportamento da taxa de fotossíntese em função da intensidade luminosa.
Fonte: Azeredo, (2012).

3.3 Métodos de Cultivo

As microalgas podem ser cultivadas em sistemas abertos e fechados. Nos abertos tais microrganismos são produzidos em lagoas ou tanques ao ar livre em regime de batelada. Nos sistemas fechados são utilizados os chamados fotobiorreatores que são sistemas utilizados para o cultivo de células fotossintéticas (as microalgas), os quais utilizam uma fonte luminosa natural ou artificial. (RUSSO, 2011)

Em relação aos métodos de cultivo abertos Xu, *et al.*, (2009) destacam que as lagoas fotossintéticas são tanques abertos, com profundidade baixa, não mais que 35 cm, para que o CO₂ presente no ar atmosférico penetre no meio de cultivo e para iluminação uniforme das células. Apesar de ser um sistema de fácil instalação e manutenção as lagoas apresentam um grande risco de contaminação e variação das condições de cultivo, sendo elas a intensidade solar, temperatura, homogeneidade de nutrientes, diluição do meio de cultivo devido à chuva, entre outros fatores. Desse modo as microalgas cultivadas ficam sujeitas a variações no seu metabolismo, diminuindo a produção de biomassa. A Figura 04 mostra uma imagem de uma lagoa fotossintética.



Figura 04 – Lagoa Fotossintética.
Fonte: Miranda, (2011)

Quanto ao método de cultivo fechado os fotobiorreatores se caracterizam pelo processo contínuo de produção, possuindo regime de escoamento laminar ou turbulento, com necessidade de controle de parâmetros como velocidade, vazão, concentração de nutrientes e temperatura (SOARES *et al.*, 2011). Existem vários tipos de fotobiorreatores fechados, os quais são implantados em grande escala e oferecem vantagens e desvantagens, sendo a escolha de qual tipo utilizar função de fatores como o tipo de alga a ser cultivada e a eficiência atingida (XU, *et al.*, 2009).

Um tipo de fotobiorreator utilizado é o de placas, que consiste de placas finas verticais ou inclinadas, dependendo da localização da fonte luminosa. Este equipamento tem a vantagem da alta taxa de iluminação e baixo acúmulo de oxigênio dissolvido se comparado com outros fotobiorreatores, bem como a facilidade de escalonamento. Porém é contraindicado para alguma espécie de microalgas, pois as células aderem às paredes do reator, prejudicando a absorção de luz (XU, *et al.*, 2009). A Figura 05 mostra o esquema de um reator tipo placas.

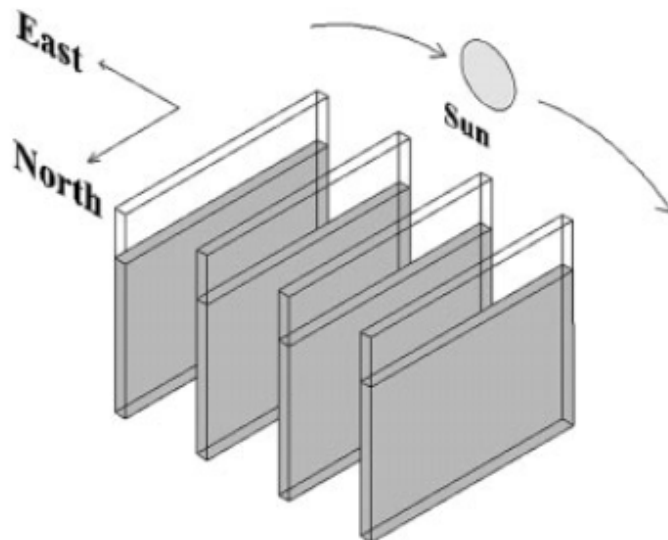


Figura 05 – Fotobiorreator tipo placas.
Fonte: Kochem, 2010.

Outro tipo é o tubular (Figura 06), caracterizado por tubos transparentes, lado a lado, com diâmetro máximo de 10 cm, para que não haja diminuição da eficiência fotossintética. As algas são movimentadas no interior dos tubos através de bombas ou de sistemas tipo *airlift*, oferecendo menor cisalhamento, possibilitando que os gases CO₂ e O₂ se mantenham em concentrações equilibradas, devido à aeração (XU, *et al.*, 2009).

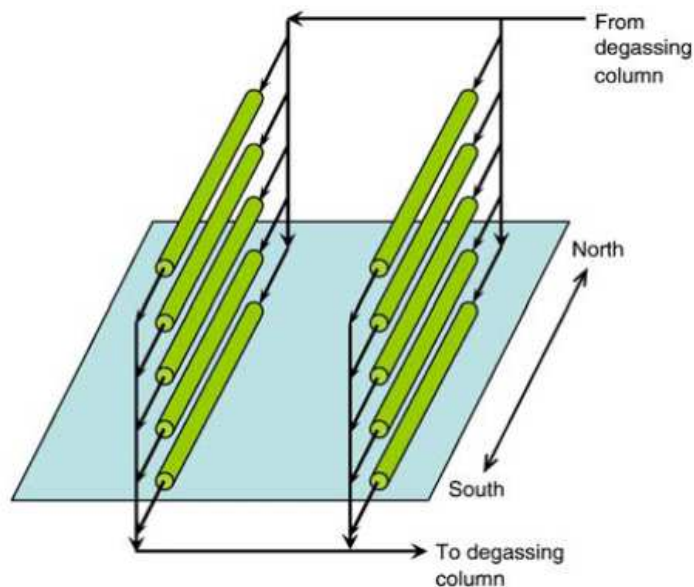


Figura 06 – Fotobiorreator Tubular.
Fonte: Kochem, 2010.

3.4 Vantagens da produção de microalgas

Gris *et al.*, (2010) destacam que as vantagens de se produzir microalgas não estão somente relacionadas à produção de biomassa e lipídeos e à biofixação de CO₂. Outros fatores também se mostram determinantes para a produção de tais microrganismos, sendo eles: a possibilidade de se produzir microalgas durante todo o ano, bastando, somente ter disponibilidade de luz e temperatura apropriada; apesar de crescerem em meios aquosos não precisam de grande quantidade de água doce, como plantas terrestres, podendo até se desenvolverem em água salgada e salobra; os nutrientes que são fatores limitantes para o crescimento (nitrogênio e fósforo) podem ser obtidos em águas residuais, além do que é fornecido no meio de cultivo, mostrando o potencial para o tratamento de água; a

dependem do(s) produto(s) que se quer obter, pode-se variar as condições ambientais e os componentes do meio para obtê-los.

Apesar das vantagens citadas Brennan & Owende, (2010) e Mata *et al.*, (2010) defendem que pesquisas ainda devem ser feitas no sentido de tornar a fixação de CO₂ e a produção de biomassa mais viável economicamente. Segundo tais autores as pesquisas devem abordar os seguintes aspectos: alcançar uma maior eficiência fotossintética desenvolvendo-se sistemas contínuos de produção, buscar diminuir a evaporação da água, bem como as perdas de CO₂ por difusão e realizar mais pesquisas em larga escala.

3.5 Fatores que afetam o crescimento das microalgas

Em se tratando do crescimento das microalgas, e conseqüente produção de biomassa é observada a necessidade da combinação de fatores biológicos e físico-químicos, bem como o controle rigoroso de tais parâmetros, sendo constatado que um mau gerenciamento destes fatores acarreta em uma baixa produtividade de biomassa. Os fatores biológicos observados são as taxas metabólicas da espécie ou espécies do cultivo e os físico-químicos relacionam-se com a temperatura, intensidade luminosa, mistura e aeração, disponibilidade de nutrientes, bem como o pH do meio (SOARES, 2010; MORAIS, 2011). Nos próximos sub-tópicos é apresentada a discussão de alguns dos parâmetros que influenciam o crescimento das microalgas.

3.5.1 Temperatura

Lourenço, (2006) observa que um dos fatores que mais afetam a produção de microalgas é a temperatura. O controle de tal fator deve ser feito baseado nas necessidades de cada espécie de microalga e o fim para o qual está se cultivando estes microrganismos. O impacto da temperatura pode ser minimizado através da aeração do inóculo, o que aumenta a taxa de crescimento das microalgas.

De acordo com Sutherland *et al.* (2015), quando estão em seus habitats naturais, as microalgas são submetidas tanto a variações de temperatura diárias (com relação ao dia e noite), quanto a variações sazonais (inverno e verão), causando impacto nas taxas de fotossíntese e respiração das mesmas. A maioria das espécies de microalgas possuem uma faixa de temperatura ótima entre 15 e 25°C, em que a produção de biomassa é favorecida. Acima ou abaixo deste intervalo o crescimento de tais microrganismos é afetado, já que quando se está abaixo da faixa ótima de temperatura a taxa de fotossíntese é afetada e quando se está acima desta faixa de respiração também é afetada.

É observado que aumentos na temperatura aumentam o teor de proteínas e diminuem o teor de carboidratos e lipídeos das células. Outro efeito recorrente em muitas espécies é a diminuição dos percentuais de ácidos graxos insaturados e aumento nos percentuais de ácidos graxos saturados da fração lipídica com o aumento da temperatura. O percentual de ácidos graxos insaturados tem relação com a fluidez da camada fosfolipídica da membrana celular, que diminui com a quantidade de insaturação na cadeia. Tal diminuição provoca a interrupção nos processos de dessaturação das cadeias de ácidos graxos, quando em altas temperaturas (SOARES, 2010).

3.5.2 Intensidade Luminosa

A luz se destaca como um dos fatores cruciais no crescimento das microalgas fotoautotróficas, já que a quantidade de luz que é absorvida pela célula irá provocar uma maior fixação de carbono, acarretando em uma maior produção de biomassa e maiores taxas de crescimento de microalgas (SOARES, 2010).

Suh e Lee, (2003) enfatizam que a faixa do espectro de luz que é absorvida está entre 400 e 700 nm. Tal absorção é realizada pelos pigmentos fotossintetizantes presentes na célula, os quais são classificados em clorofilas, carotenóides e ficolibinas, tendo cada um diferente capacidade de absorção de luz, variando de comprimento de onda para comprimento de onda.

Uma vez fornecida em excesso, a luz pode provocar na célula da microalga um estresse oxidativo e danos causados pelos excesso de luz, chamados de

fotoinibição, diminuindo, assim a atividade fotossintética. É observado que quando a célula absorve uma quantidade de luz maior do que a sua capacidade bioquímica, o excedente é liberado na forma de calor ou fluorescência. Por outro lado, quando há uma deficiência na intensidade luminosa fornecida ao microrganismo ocorre um aumento na concentração de pigmentos celulares relacionados à absorção de luz, tais como a clorofila. Tal mecanismo pode levar ao auto sombreamento interno, que é chamado efeito de pacote, onde a eficiência da absorção da luz diminui com o aumento da concentração de clorofila (SUTHERLAND *et al.*, 2015).

3.5.3 Mistura e Aeração

A constante mistura do inóculo no cultivo de microalgas é importante devido a diversos fatores, tais como o aumento da absorção de luz por parte dos pigmentos intracelulares, manter as células sempre em suspensão, evitar a estratificação térmica, aumentar as trocas gasosas, bem como a disponibilidade de nutrientes. A combinação de tais fatores irá influenciar na produção de biomassa (SUH; LEE, 2003).

Com relação aos sistemas de mistura e aeração Soares, (2010) mostra que quando o cultivo de microalgas é realizado em escala de laboratório, pode-se utilizar da aeração, através de pequenas bombas, que, além de injetar uma quantidade de ar contendo CO₂ (nutriente necessário para a produção de biomassa), promove também a mistura da suspensão, mantendo assim, as células sempre suspensas no meio. Tal processo é feito através de mangueiras colocadas dentro do frasco onde estão sendo cultivadas as microalgas. Na produção em maior escala que a de laboratório, em tanques pequenos, por exemplo, também pode ser utilizada a aeração para agitação do meio. Porém em tanques grandes é necessária a utilização de pás giratórias ou recirculação da cultura por bombeamento para uma distribuição uniforme das células seja feita.

3.5.4 Disponibilidade de Nutrientes

Segundo Choi e Lee, (2015) para a realização da fotossíntese além de luz é necessária a presença de nutrientes igualmente importantes para o desenvolvimento das microalgas, sendo eles os macroelementos e oligoelementos, tais como Co, Mo e Mn, bem como vitaminas, sendo elas a cianocobalamina e tiamina, entre outras. Para um crescimento ótimo das células é necessária a adição de tais elementos em proporções estequiométricas. Para a maioria das espécies de microalgas é observado que o carbono constitui um dos mais importantes nutrientes, sendo encontrado nos meios de cultura na forma de CO_2 , ácido carbônico (H_2CO_3), bicarbonato (HCO_3^-) ou carbonato (CO_3^{2-}) (SOARES, 2010).

Baumgartner, *et al.*, 2013 comentam que no desenvolvimento de um meio de cultivo devem ser observados fatores como a concentração total de sais no meio, a fonte de carbono, bem como o seu fornecimento de forma suficiente para o crescimento da microalga, a fonte de nitrogênio. Deve-se verificar também a concentração e outros elementos que também são nutrientes necessários tais como potássio, fósforo, magnésio, sódio, sulfato, microelementos e por último a adição de componentes orgânicos que promovem o crescimento.

Os nutrientes responsáveis pelo crescimento das microalgas podem ser classificados em macronutrientes ou nutrientes essenciais, sendo eles oxigênio, nitrogênio, hidrogênio, fósforo, cálcio, magnésio, potássio e enxofre e os micronutrientes, requeridos em quantidades menores, que são ferro, boro, cobre, zinco, vanádio, molibdênio e sódio. Os íons de sódio são responsáveis pela fixação do nitrogênio para a transformação molecular do nitrogênio em amônia. Devido ao fato dos íons de sódio e potássio serem bastante semelhantes, em algumas situações o sódio pode substituir o potássio. No entanto em algumas espécies de microalgas observa-se que baixos teores do potássio provocam a diminuição no crescimento e na taxa fotossintética e aumento na taxa respiratória. Quanto ao magnésio este componente tem a sua importância na fotossíntese, bem como outras funções celulares tais como na agregação de ribossomos em unidades funcionais e formação da catalase, que é uma enzima intracelular (MOURA, *et al.*, 2006)

Lourenço, (2006) destaca a importância do carbono entre os outros componentes orgânicos que são sintetizados pelas células, sendo eles proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, entre outros. Se comparado com nitrogênio e fósforo, por exemplo, é o elemento que está em maior proporção nos meios de cultivo para algas marinhas. Quando a taxa de crescimento celular é alta observa-se um elevado consumo do carbono disponível, tornando tal elemento um fator limitante para a multiplicação das células. Pires *et al.*, (2012) observa que elevadas concentrações de CO₂ no meio aumenta a transferência de massa para o mesmo, mas reduz o pH, o que pode inibir o crescimento de algumas espécies de microalgas.

3.5.5 pH

Este parâmetro revela-se como um importante fator a ser observado e controlado nos cultivos. Sabe-se que a faixa ótima de pH para a fotossíntese está entre 7,5 e 10. Na natureza, o pH ao qual as microalgas são submetidas varia de neutro a alcalino (DELABARY, 2012).

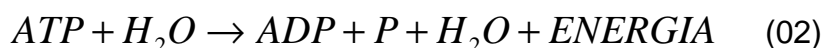
Pires *et al.*, (2012) afirmam que para um crescimento ótimo é necessário um meio com pH por volta do valor neutro, sendo necessário o controle deste parâmetro. No desenvolvimento da microalga ocorre o consumo do CO₂ presente no meio, acarretando em uma elevação do pH. Por outro lado observa-se que aumentos na concentração do CO₂ no meio irá provocar uma diminuição deste parâmetro, o que também prejudica o crescimento de tais microrganismos. Uma forma de controle é o uso de tampões, porém se mostra um recurso caro, principalmente para cultivos em grande escala. Outra alternativa mais barata seria a aeração dos cultivos, feita para suplementar o meio com quantidades extras de carbono, equilibrando o pH, que aumenta devido à diminuição da concentração de CO₂ dissolvido.

3.6 Biorreatores

Conforme discorre Fogler, (2009) um biorreator é o recipiente que proporciona o crescimento da cultura de células microbianas. Nele ocorrem todas as reações

para a manutenção da vida de tais seres. As reações intracelulares são viabilizadas por enzimas, que desempenha o papel de um catalisador natural, os quais aceleram o metabolismo celular. Durante a biossíntese há o consumo dos nutrientes presentes do meio pela biomassa, que são as células dos microrganismos, as quais irão crescer e produzir mais células e diferentes produtos. Ao consumir os nutrientes as células produzem energia e outras células, por intermédio das enzimas utilizadas nas diversas reações, como já mencionado. Os produtos podem ser intracelulares, permanecendo dentro das células ou extracelulares, que são excretados para fora da célula.

A célula possui uma membrana externa, na qual está contido o citoplasma. Nele fica o núcleo, onde está presente o ácido desoxirribonucléico (DNA), que carrega a informação genética para a produção de proteínas e outras substâncias, e os ribossomos, onde está o ácido ribonucléico (RNA), que participa da síntese de proteínas. Possui também uma parede celular que protege a célula de perturbações externas. A membrana é responsável pela entrada e saída de componentes, sendo esse transporte seletivo. As reações intracelulares são classificadas em três classes. Na Classe I ocorre a degradação dos nutrientes, através do trifosfato de adenosina (ATP), sendo também chamada de reações de suprimento. A Classe II é a que ocorre a síntese de moléculas de pequeno tamanho, os aminoácidos, que são polimerizados para a produção das macromoléculas na Classe III, tais como o RNA e DNA. Outro papel do ATP é transferir a energia que é liberada quando há a perda do grupo fosfonado, formando o adenosina difosfato (ADP), tal como é mostrado na Equação 02 (FOGLER, 2009).



3.7 Crescimento Microbiano

Russo, (2011) entende que ocorre o crescimento celular quando há o aumento de todos os componentes químicos presentes na célula, sendo esse aumento de forma ordenada e quando os microrganismos estão totalmente

adaptados ao meio. Desse modo, o crescimento da biomassa é acompanhado pela duplicação de todas as moléculas orgânicas (proteína, DNA, RNA, entre outras), sendo este quantificado em termos de número de células.

Neto, (2010) mostra que, na divisão binária, o tempo em que são formadas células idênticas à célula mãe é chamado de tempo de geração (t_g). Neste intervalo de tempo acontece a duplicação do número de células, sendo tal fenômeno chamado de geração. O que se observa na realidade é que nem todas as células estão no mesmo período de crescimento, sendo tal fato chamado de crescimento assíncrono, já que o crescimento microbiano não está somente associado à divisão celular. Porém o que se considera, na maioria dos casos é o crescimento síncrono, onde se considera que todas as células estão em crescimento simultâneo.

3.7.1 Fases do Crescimento Microbiano

Neste sub-tópico serão mostradas as fases de crescimento microbiano, quando as células são inoculadas em um reator de batelada, contendo os nutrientes necessários para o crescimento das mesmas, conforme aborda Fogler, (2009).

A primeira fase é chamada de Fase de Latência ou Fase *lag*, onde não é observado um crescimento significativo da concentração de células. Isso se deve ao fato de que as células ainda estão se adaptando ao novo meio para iniciar a reprodução, bem como há a produção de enzimas para as reações intracelulares. Proteínas de transporte do substrato para o interior das células são sintetizadas, bem como outras proteínas que irão metabolizar o novo substrato e também começa a replicação do material genético. O tempo de duração desta fase depende da similaridade do meio do qual o inóculo foi retirado e do novo meio ao qual o mesmo foi adicionado, no reator. Se os dois forem relativamente parecidos esta fase torna-se quase que inexistente. Do contrário o tempo de adaptação das células ao novo meio será maior.

A Fase de Crescimento Exponencial ou Fase *Log* começa quando a velocidade de crescimento atinge o seu valor máximo ($\mu_{m\acute{a}x}$), já que tal parâmetro é proporcional à concentração de células no meio. É observado que todos os caminhos das reações enzimáticas que metabolizam o meio estão sendo utilizados.

A terceira fase é chamada de Fase Estacionária. Nessa fase a concentração de nutrientes e de metabólitos essenciais se torna baixa, o que diminui o crescimento das células, tornando a velocidade de crescimento nula.

A última fase é a de morte celular, na qual a concentração de células vivas diminui, devido à presença de subprodutos tóxicos e do ambiente desfavorável ao crescimento, pela ausência de nutrientes. A Figura 07 mostra o gráfico do logaritmo do número de células em função do tempo, evidenciando as fases de crescimento microbiano.

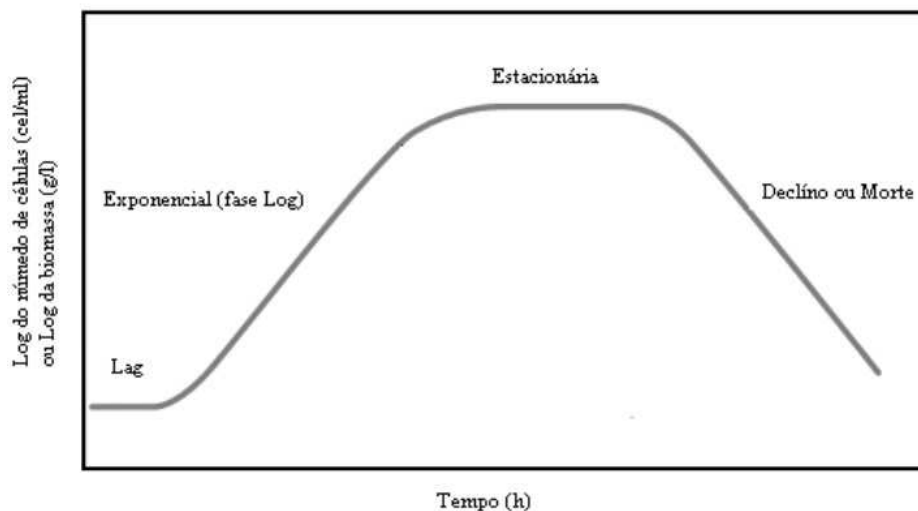


Figura 07 – Log do número de células em função do tempo.
Fonte: Neto, 2010.

3.8 Classificação da água quanto à sua salinidade

A salinidade é definida como sendo o somatório das concentrações de todos os íons presentes na água. Logo, em termos de sólidos totais dissolvidos (STD) e condutividade elétrica, quanto maior a salinidade da água maior será o valor de tais parâmetros. A condutividade elétrica mede a capacidade de conduzir corrente elétrica na água, indicando a presença de íons (MENEZES, 2009).

O Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA, por meio da Resolução nº 357 de 2005 estabelece padrões de qualidade de águas em todo o Brasil e classifica as águas quanto à sua salinidade em: doces, salobras e salinas. As águas doces possuem salinidade menor ou igual a 0,05% (rios e lagos), as salobras entre 0,05 e 3% e as salinas com salinidade maior ou igual a 3% (água do mar). Os íons que são encontrados com maior frequência na água e que contribuem para a sua salinidade são os cátions sódio (Na^+), cálcio (Ca^{+2}), magnésio (Mg^{+2}), potássio (K^+) e os ânions cloreto (Cl^-), carbonato (CO_3^{2-}), bicarbonato (HCO_3^-) e sulfato (SO_4^{2-}), sendo os encontrados em maiores concentrações o cloreto, bicarbonato (HCO_3^-) e o cátion de sódio nesta ordem (MENEZES, 2009). Em águas salinas e salobras os sais mais encontrados são o cloreto de sódio e de magnésio (MOURA, *et al.*, 2006).

3.9 Cinética de Crescimento de Microalgas

De acordo com Hiss *et al.*, (2001) para se estudar a cinética microbiana, no caso do presente estudo, de microalgas, é necessária a análise ao longo do tempo da concentração de um ou mais componentes do sistema, podendo ser eles o microrganismo (biomassa), produtos resultantes do metabolismo celular (metabólitos) e o substrato contido no meio de cultura. Quando tais parâmetros são analisados, traça-se um gráfico em função do tempo e tem-se o comportamento mostrado na Figura 06, sendo a biomassa representada por X, produtos por P e substrato por S. As retas tangentes à cada curva representam as velocidades instantâneas de crescimento no tempo t, sendo expressas de acordo com as Equações 03, 04 e 05, sendo r_x a velocidade de produção de biomomassa, r_s a velocidade de consumo do substrato e r_p a velocidade de produção dos produtos:

$$r_x = \frac{dX}{dt} \quad (03)$$

$$r_s = -\frac{dS}{dt} \quad (04)$$

$$r_P = \frac{dP}{dt} \quad (05)$$

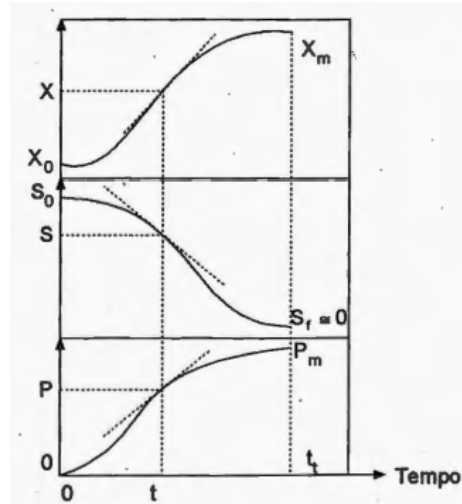


Figura 08 – Comportamento da biomassa, substrato e produtos em função do tempo.
Fonte: Hiss, (2001)

A produtividade em biomassa (P_X) representa a velocidade média do processo, avaliando a eficiência do mesmo. Tal parâmetro é dado pela Equação 06.

$$P_X = \frac{X_m - X_0}{t_f} \quad (06)$$

Sendo: X_m : Concentração máxima de células (Nº de células/mL)

X_0 : Concentração inicial de células (Nº de células/mL)

t_f : Tempo total do processo (h)

3.9.1 Velocidade Específica de Crescimento

A concentração de biomassa (X) aumenta ao longo do tempo em um cultivo descontínuo, por consequência há o aumento da concentração do complexo enzimático que participa da transformação do substrato em produto. Definindo a velocidade específica de crescimento (μ_x) como sendo a taxa com que a biomassa cresce no meio, matematicamente, tem-se:

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \left(\frac{X_f - X_i}{t_f - t_i} \right) \cdot \frac{1}{X} \quad (07)$$

Sendo X_f : Concentração de células no tempo final

X_i : Concentração de células no tempo inicial

X : Concentração de células no tempo t

Levando-se em conta que na fase *Log* de crescimento a velocidade específica de crescimento é máxima.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m X \quad \longrightarrow \quad \frac{dX}{X} = \mu_m dt$$

Após a integração tem-se,

$$\ln X = \ln X_0 + \mu_m (t - t_0) \quad (08)$$

A Equação 08 retrata a equação de uma reta, onde o coeficiente angular representa a velocidade máxima de crescimento microbiano, sendo X a concentração celular no tempo t (tempo em que termina a fase *Log*) e X_0 a concentração de células quando se inicia a fase de crescimento exponencial.

Russo, (2011) define o tempo de geração (t_g) como o tempo necessário para se dobrar a concentração de células na fase *Log*. Matematicamente é mostrado que,

$$\ln \frac{X}{X_i} = \mu_m (t - t_i) \quad \longrightarrow \quad \ln \frac{2 \cdot X_i}{X_i} = \mu_m t_g$$
$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_m} \quad (09)$$

Como mostra a Equação 09, o tempo de geração é uma constante, já que na fase *Log* de crescimento a velocidade específica de crescimento é máxima e constante. Ao se cultivar microalgas em grande escala este parâmetro se mostra muito importante, já que em termos econômicos o cultivo que apresentar o menor tempo de geração equilibrado com uma grande produtividade de biomassa terá um maior potencial de lucro.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no âmbito do Laboratório de Referência em Dessalinização (LABDES) da UFCG, visando montar uma infraestrutura para estudar o desenvolvimento de microalgas do tipo *Scenedesmus* sp., adicionando-se os sais $MgCl_2$ e $NaCl$ ao meio de cultura básico WC (Water Culture).

4.1 Fluxograma do processo

Os próximos subtópicos abordam a metodologia utilizada neste trabalho. São mostrados também os materiais e os equipamentos utilizados. A Figura 09 mostra um fluxograma das atividades desenvolvidas neste projeto, passo a passo.

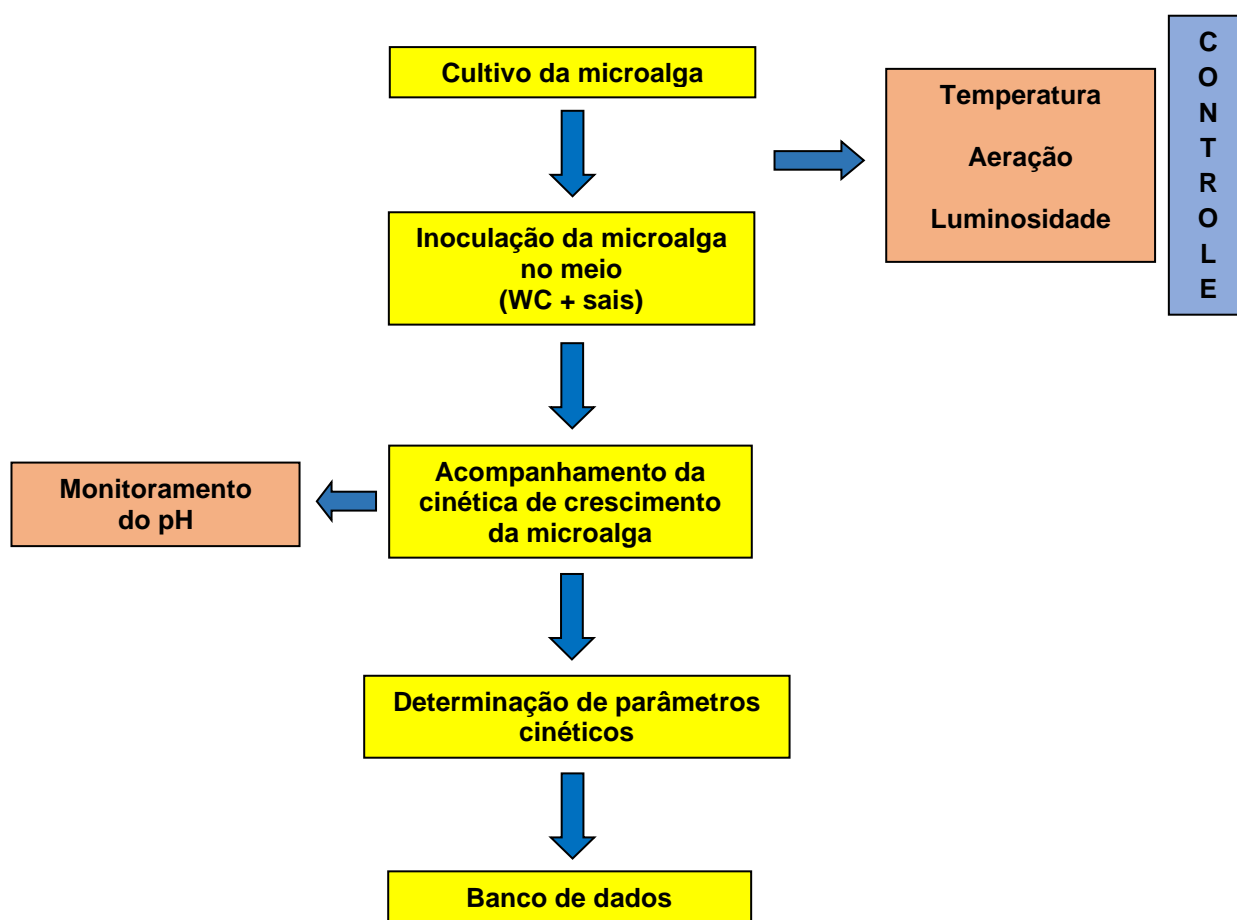


Figura 09 – Fluxograma da metodologia utilizada.

4.2 Cultivo da Microalga

A microalga utilizada no experimento foi a *Scenedesmus* sp. devido à disponibilidade da mesma e ao fato de ser uma microalga que pode ser encontrada tanto em água doce como salina. A cepa foi cedida gentilmente pelo Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM), coordenado pelo professor Dr. Roberto Sassi, localizado na Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

No início, as cepas da microalga foram replicadas em batelada em Erlenmeyers de 500 mL, os quais eram previamente esterilizados em autoclave durante 15 minutos. Em tais recipientes foram inoculados os microrganismos no meio de cultivo WC (Water Culture) (Tabela 03), na quantidade de 1 mL de cada solução (estoque, silicato, micronutrientes e vitaminas) e 0,115 g de Tri hidroximetil-amino-metano para cada litro de meio preparado. Este meio de cultivo foi preconizado por Guillard e Lorenzen, 1972, como o meio adequado para o cultivo da microalga *Scenedesmus* sp., sendo as cepas alimentadas periodicamente com o mesmo para o fornecimento de nutrientes e mantidos sob iluminação constante através de lâmpadas fluorescentes de 40W, havendo o controle de temperatura, variando entre 22 e 25°C e aeração constante por meio de minicompressores conectados aos Erlenmeyers com o auxílio de pipetas e mangueiras finas. Os inóculos eram tampados e vedados, para diminuir o risco de contaminação.

Tabela 03a – Reagentes utilizados para preparação do meio WC.

| SOLUÇÃO ESTOQUE | | |
|---|---|-------------------|
| Reagente | Fórmula | Quantidade |
| Cloreto de cálcio bihidratado | CaCl ₂ .2H ₂ O | 36,8g |
| Sulfato de magnésio heptahidratado | MgSO ₄ .7H ₂ O | 37g |
| Bicarbonato de sódio | NaHCO ₃ | 12,6g |
| Hidrogenofosfato de potássio trihidratado | K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O | 11,4g |
| Nitrato de sódio | NaNO ₃ | 85g |
| Água destilada | | 1L |
| SOLUÇÃO SILICATO | | |
| Reagente | Fórmula | Quantidade |
| Metasilicato de sódio nonahidratado | Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O | 21,2g |
| Água destilada | | 1L |
| SOLUÇÃO DE MICRONUTRIENTES | | |
| Reagente | Fórmula | Quantidade |
| Sal dissódico (EDTA)* | Na ₂ EDTA | 4,36g |
| Cloreto férrico hexahidratado | FeCl ₃ .6H ₂ O | 3,15g |
| Sulfato de cobre pentahidratado | CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,01g |
| Sulfato de zinco heptahidratado | ZnSO ₄ .7H ₂ O | 0,022g |
| Cloreto de cobalto hexahidratado | CoCl ₂ .6H ₂ O | 0,01g |
| Cloreto de manganês tetrahidratado | MnCl ₂ .4H ₂ O | 0,18g |
| Molibdato de sódio bihidratado | Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0,006g |
| Ácido bórico | H ₃ BO ₃ | 1g |
| Água destilada | | 1L |
| SOLUÇÃO DE VITAMINAS | | |
| Reagente | Quantidade | |
| Tiamina HCl | 0,1g | |
| Biotina | 0,0005g | |
| Água destilada | 1L | |

*EDTA – Etileno diamino tetraacético dissódico

Tabela 03b – Composição do meio.

| COMPOSIÇÃO DO MEIO | |
|-------------------------------|--------|
| Solução Estoque | 1mL |
| Solução Silicato | 1mL |
| Solução de Micronutrientes | 1mL |
| Solução de Vitaminas | 1mL |
| Tri hidroximetil-amino-metano | 0,115g |
| Água do meio | 1L |

Nas Figuras 10 e 11 são mostrados uma visão microscópica da microalga e o sistema de cultivo da microalga, respectivamente.

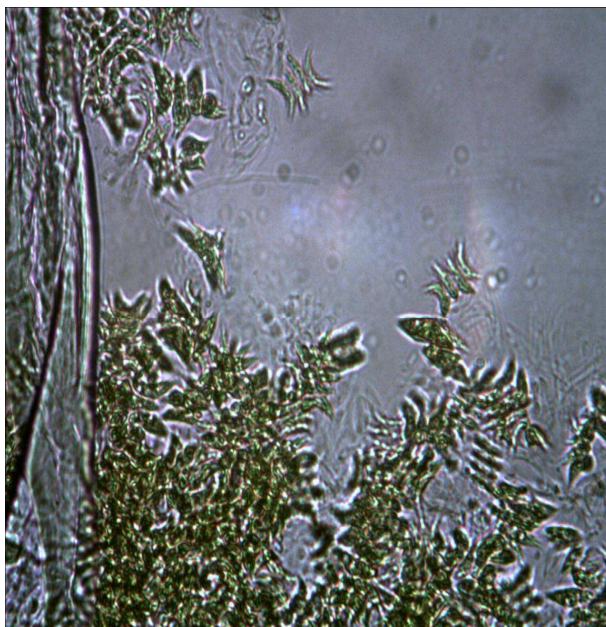


Figura 10 – Foto microscópica da microalga.
Scenedesmus sp.



Figura 11 - Cultivo da microalga

4.3 Preparação do meio de cultivo com adição dos sais

A inoculação da microalga *Scenedesmus sp.* em meio WC com adição dos sais foi realizada preparando-se 500 mL do meio, com pH de aproximadamente 9,02 e adicionando-se quantidades dos sais cloreto de magnésio ($MgCl_2$) e cloreto de sódio ($NaCl$) em meios diferentes, sendo o cultivo realizado em Erlenmeyers autoclavados de 1L em regime de batelada. As concentrações dos sais adicionados ao meio variaram de 0 a 10000 mg.L^{-1} ; o objetivo foi avaliar o efeito dos cátions Na^+ e Mg^{2+} e do ânion Cl^- na cinética de crescimento da microalga.

Vale salientar que antes de se adicionar o sal cloreto de magnésio ao meio de cultivo, o mesmo foi secado em estufa a 100°C durante 24 horas para retirar a água presente na estrutura do sal e depois foi colocado em dessecador até esfriar, sendo verificado após este processo a retirada de 16,66% da massa do sal, correspondente ao que foi retirado de água da estrutura salina. Foi adicionada aos

meios a mesma concentração inicial de células, sendo o seu valor médio de $6,92 \cdot 10^4$ células.mL⁻¹, as quais foram retiradas do cultivo realizado na etapa anterior.

É importante observar que, quanto à quantidade do íon cloreto inerente ao meio de cultivo (WC), fazendo-se os devidos cálculos estequiométricos, a quantidade de Cl utilizada na solução estoque e de micronutrientes é de aproximadamente 18,96 mg no total, quantidade que se torna irrelevante em meio às concentrações dos dois sais que foram utilizadas (1000 a 10000 mg.L⁻¹). Por isso este valor não foi levado em conta nos cálculos realizados. Os inóculos foram feitos em triplicata para cada concentração dos sais e submetidos às mesmas condições de iluminação, controle de temperatura e aeração que as cepas foram submetidas na etapa anterior, tal como mostra a Figura 12.



Figura 12 - Inóculo no meio WC com adição dos sais.

4.4 Acompanhamento do Crescimento

Esta etapa foi realizada através da contagem diária de células em microscópio, auxiliada pela câmara de Neubauer, constituída de duas câmaras, que possuíam quadrantes maiores e menores, sendo a contagem realizadas nos maiores, totalizando quatro quadrantes para cada câmara, com 16 quadrados em cada quadrante. A concentração celular diária foi expressa em número de células por mililitro do cultivo (células.mL⁻¹), sendo a contagem realizada em triplicata para cada inóculo e posteriormente calculada a média da concentração do número de células. De posse dos dados experimentais obtidos foram traçados gráficos da curva de crescimento. Em paralelo com esta etapa foi realizado diariamente o monitoramento do pH em pHâmetro. O acompanhamento do crescimento da microalga, bem como do pH e condutividade foi realizado em 17 dias para todos os meios, tomando como base o ciclo de vida de tais microrganismos no meio de controle, que levou este intervalo de tempo. A Figura 13 mostra a contagem sendo feita em microscópio.



Figura 13 – Contagem diária do número de células por mL.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

Neste Capítulo serão mostrados e discutidos os resultados obtidos da análise da cinética de crescimento da microalga *Scenedesmus* sp., analisando o seu desenvolvimento em meios de cultivo com adição dos sais NaCl e MgCl₂, sais mais encontrados em águas salobras, visando atender os objetivos do presente trabalho.

5.1 Análise de Crescimento

Nos Anexos 01 e 02 são apresentadas as médias dos números de células por mL de solução para cada dia de contagem realizado, correspondentes à microalga presente nos meios salobros, com as concentrações dos sais variando de 0 a 10000 mg.L⁻¹. A partir dos dados apresentados foram construídas as curvas de crescimento microbiano para cada concentração dos sais presentes no meio, mostradas nas Figuras 14 a 33.

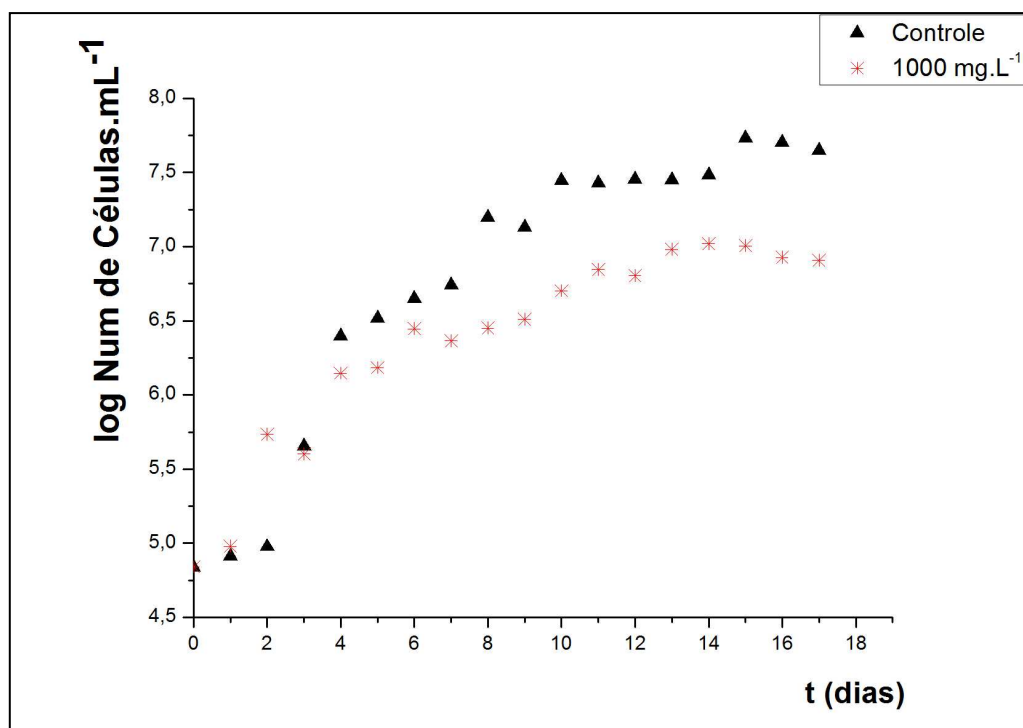


Figura 14 – Curva de crescimento microbiano da microalga *Scenedesmus* sp. em meio com 1000 mg.L⁻¹ de NaCl.

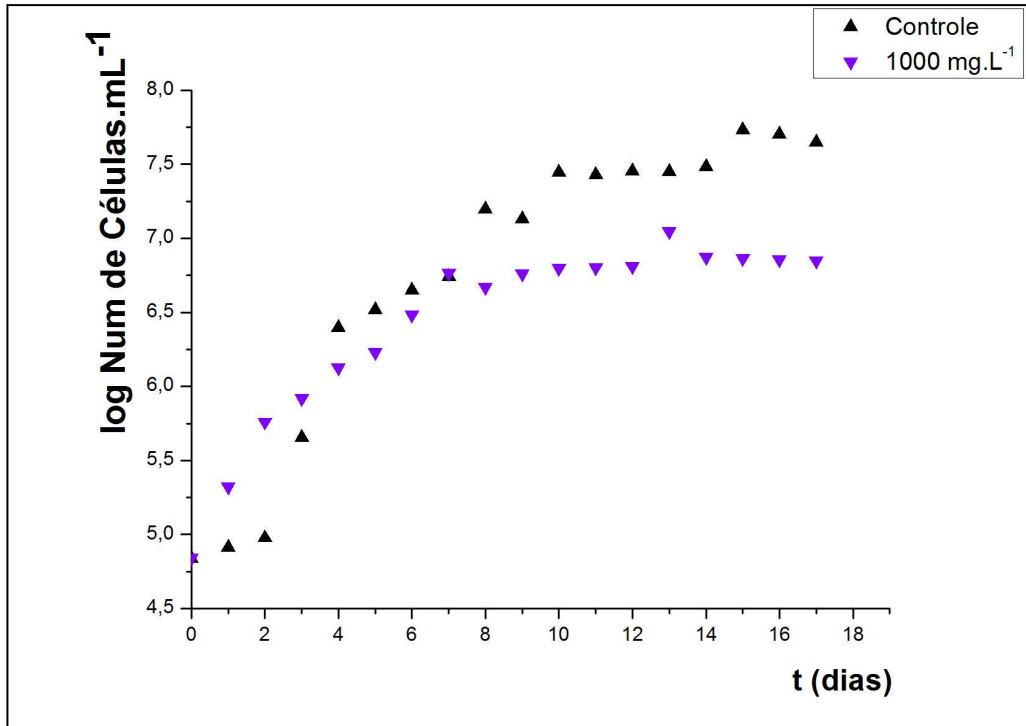


Figura 15 – Curva de crescimento microbiano da microalga *Scenedesmus* sp. em meio com 1000 mg.L⁻¹ de MgCl₂.

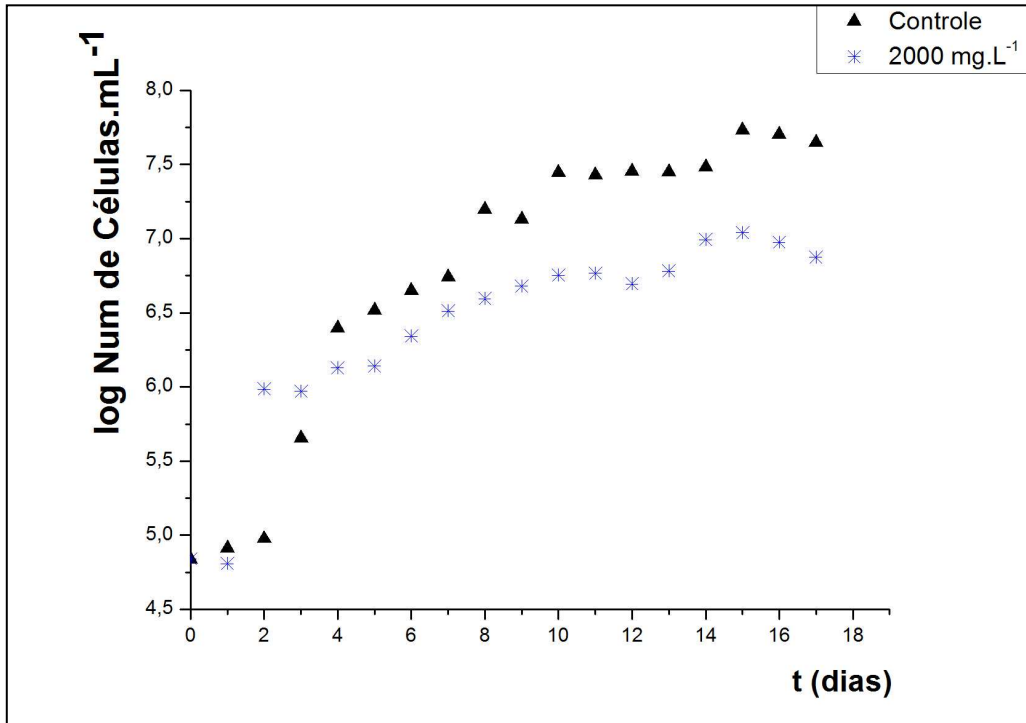


Figura 16 – Curva de crescimento microbiano da microalga *Scenedesmus* sp. em meio com 2000 mg.L⁻¹ de NaCl.

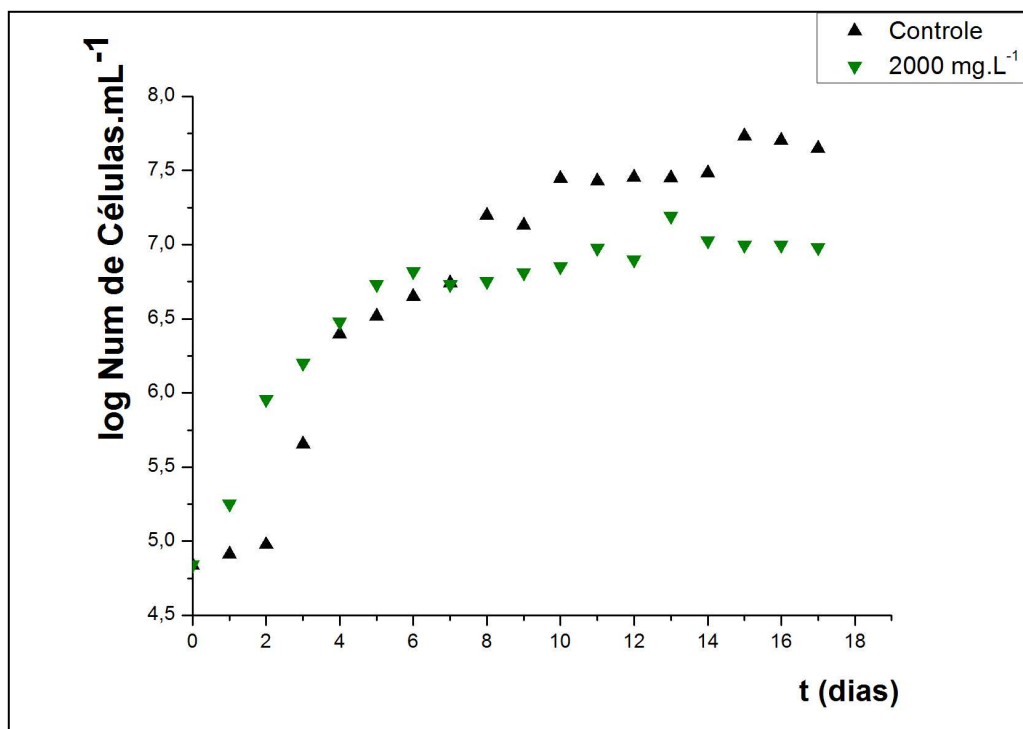


Figura 17 – Curva de crescimento microbiano da microalga *Scenedesmus* sp. em meio com 2000 mg.L⁻¹ de MgCl₂.

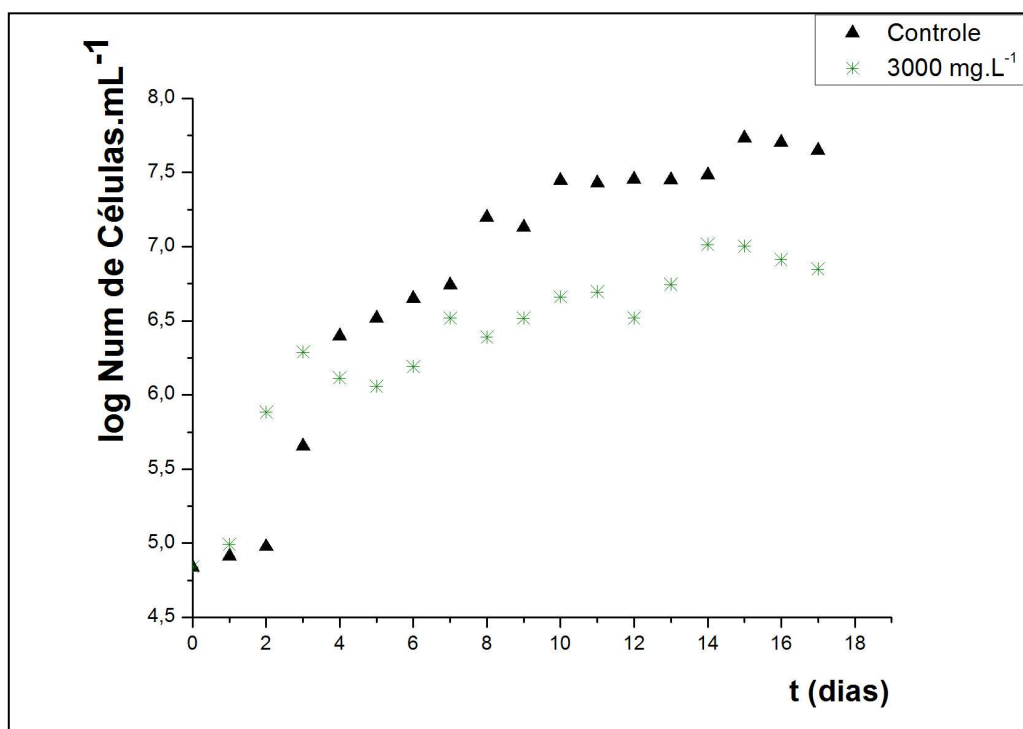


Figura 18 – Curva de crescimento microbiano da microalga *Scenedesmus* sp. em meio com 3000 mg.L⁻¹ de NaCl.

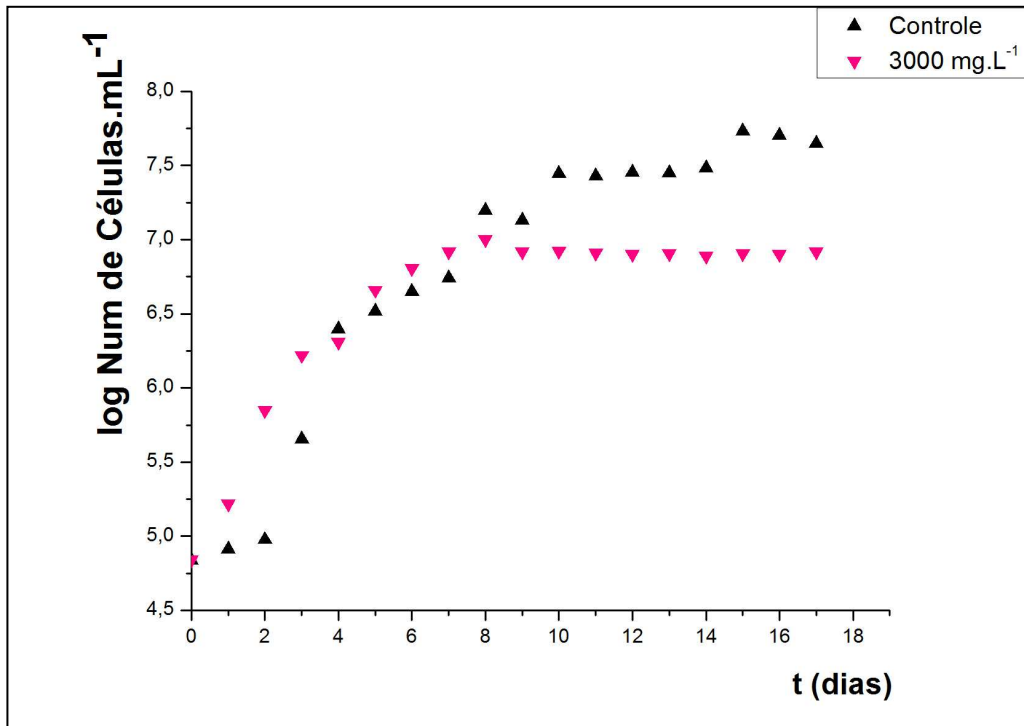


Figura 19 – Curva de crescimento microbiano da microalga *Scenedesmus* sp. em meio com 3000 mg.L⁻¹ de MgCl₂.

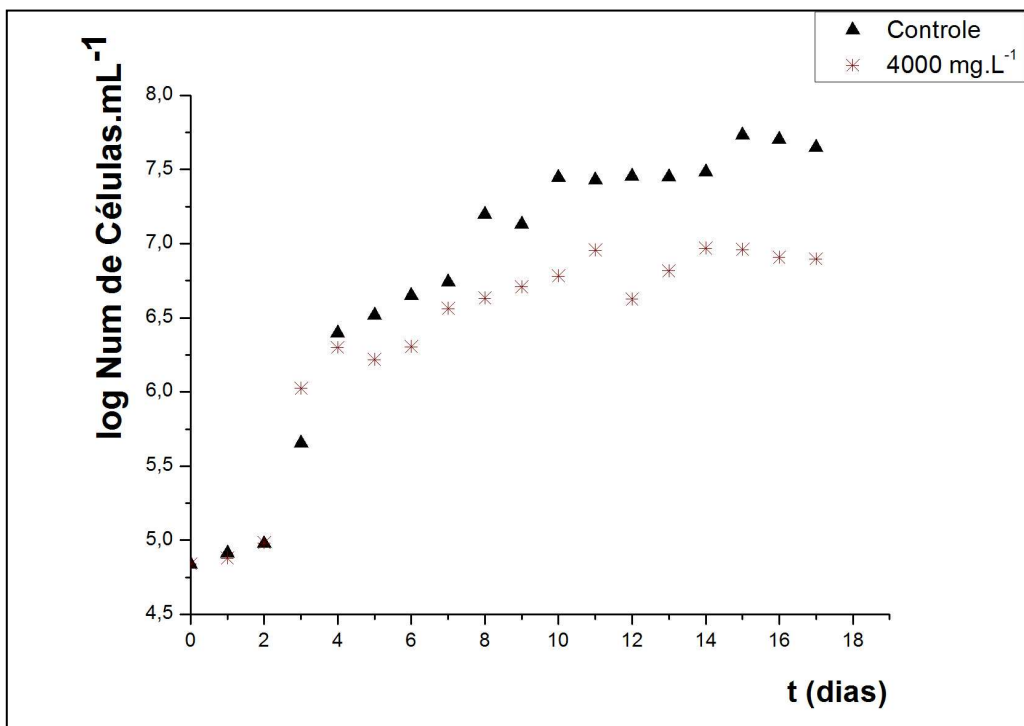


Figura 20 – Curva de crescimento microbiano da microalga *Scenedesmus* sp. em meio com 4000 mg.L⁻¹ de NaCl.

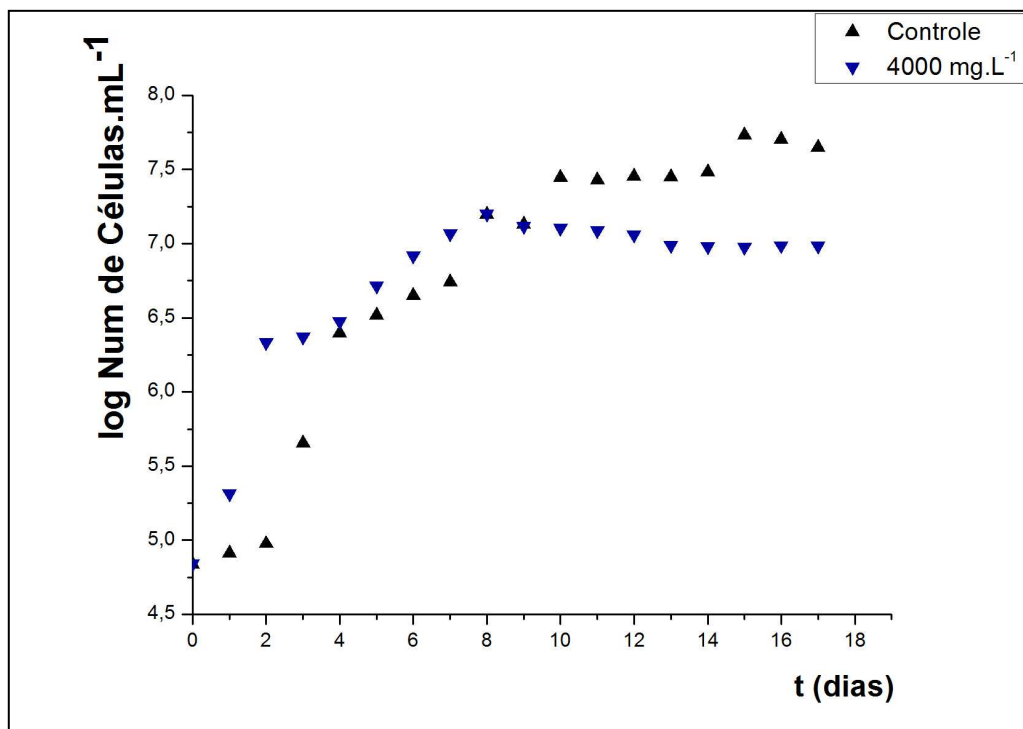


Figura 21 – Curva de crescimento microbiano da microalga *Scenedesmus* sp. em meio com 4000 mg.L⁻¹ de MgCl₂.

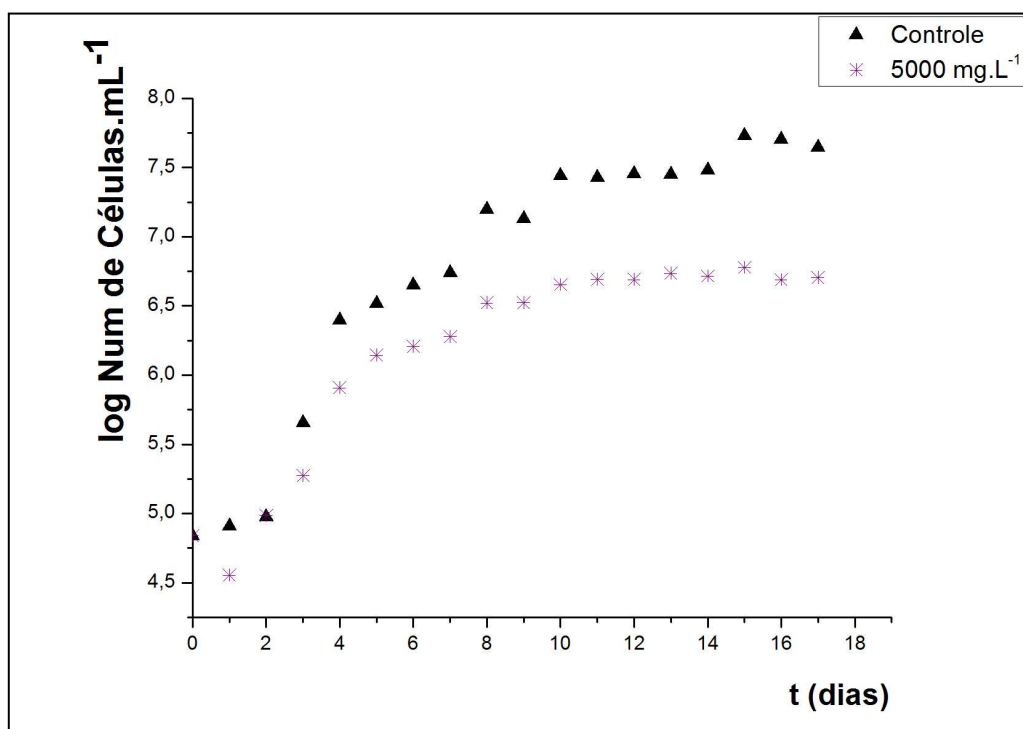


Figura 22 – Curva de crescimento microbiano da microalga *Scenedesmus* sp. em meio com 5000 mg.L⁻¹ de NaCl.

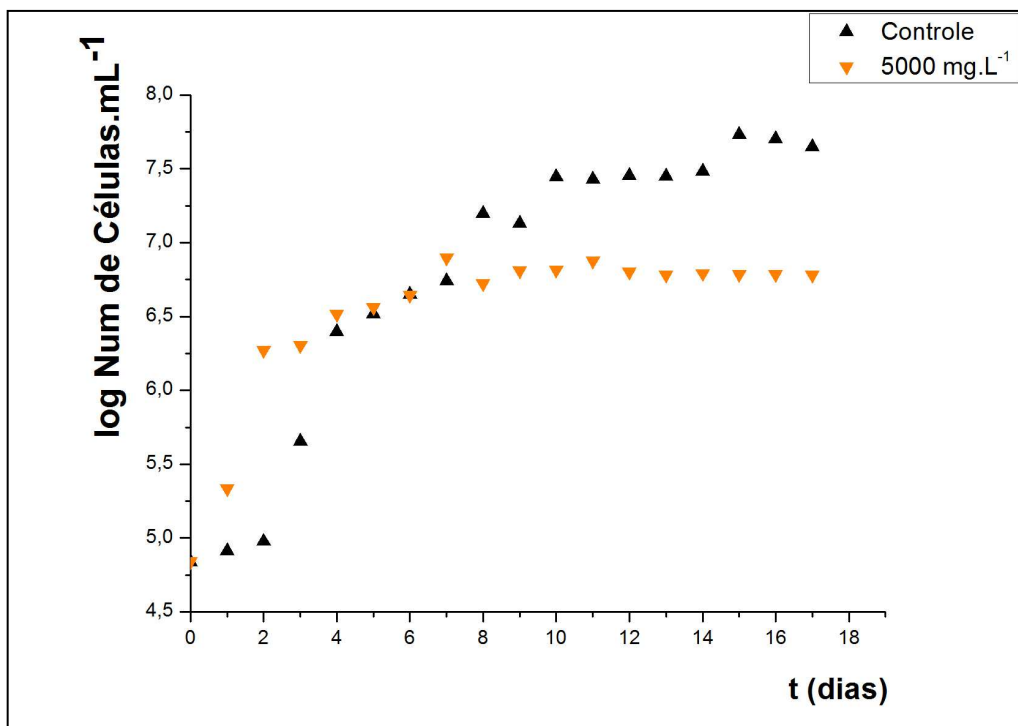


Figura 23 – Curva de crescimento microbiano da microalga *Scenedesmus sp.* em meio com 5000 mg.L⁻¹ de MgCl₂.

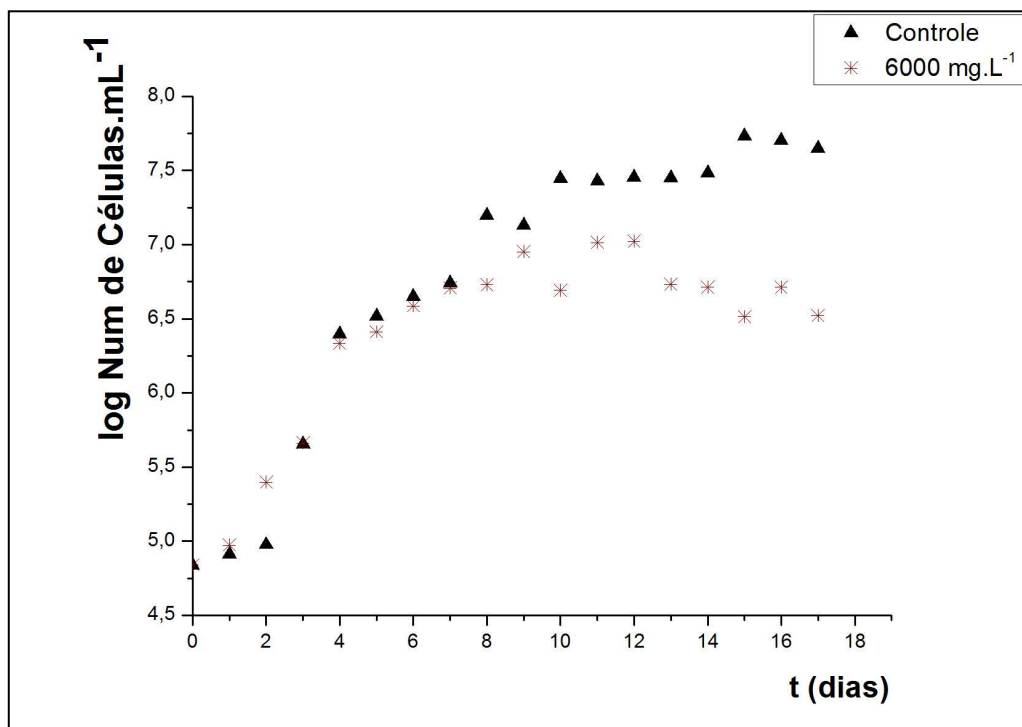


Figura 24 – Curva de crescimento microbiano da microalga *Scenedesmus sp.* em meio com 6000 mg.L⁻¹ de NaCl.

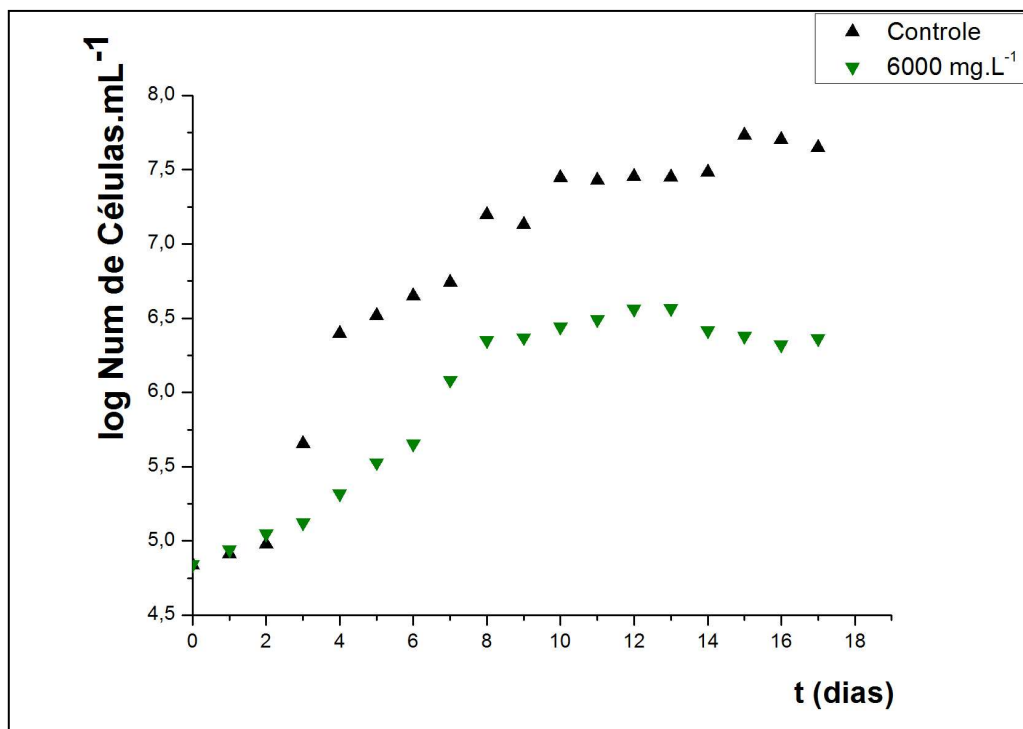


Figura 25 – Curva de crescimento microbiano da microalga *Scenedesmus* sp. em meio com 6000 mg.L⁻¹ de MgCl₂.

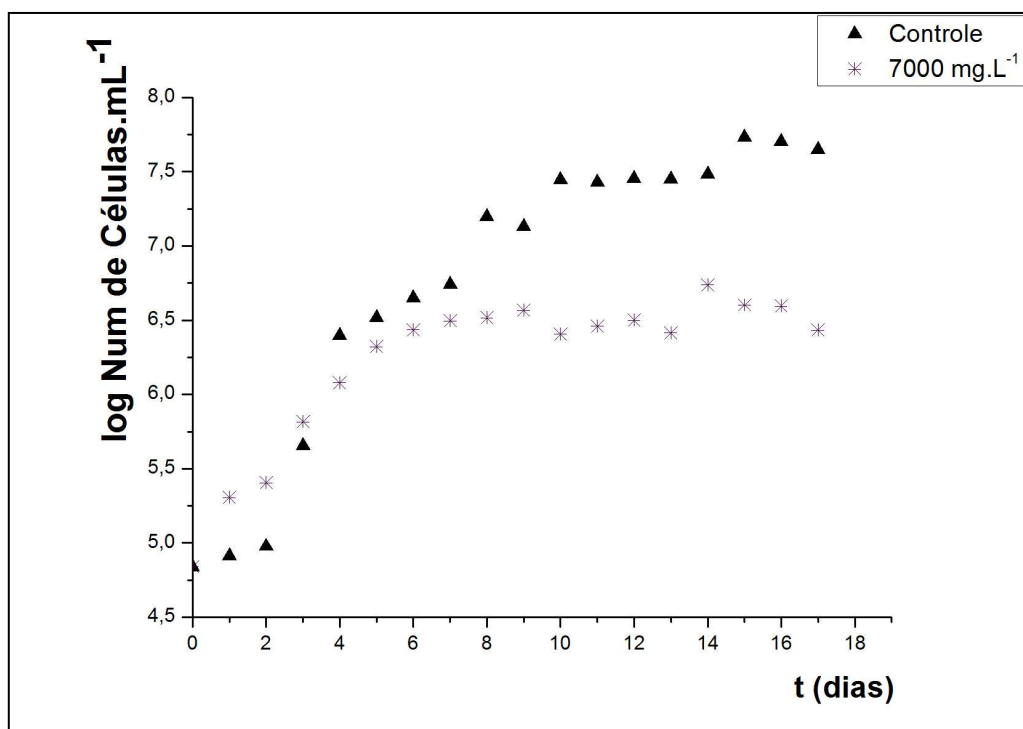


Figura 26 – Curva de crescimento microbiano da microalga *Scenedesmus* sp. em meio com 7000 mg.L⁻¹ de NaCl.

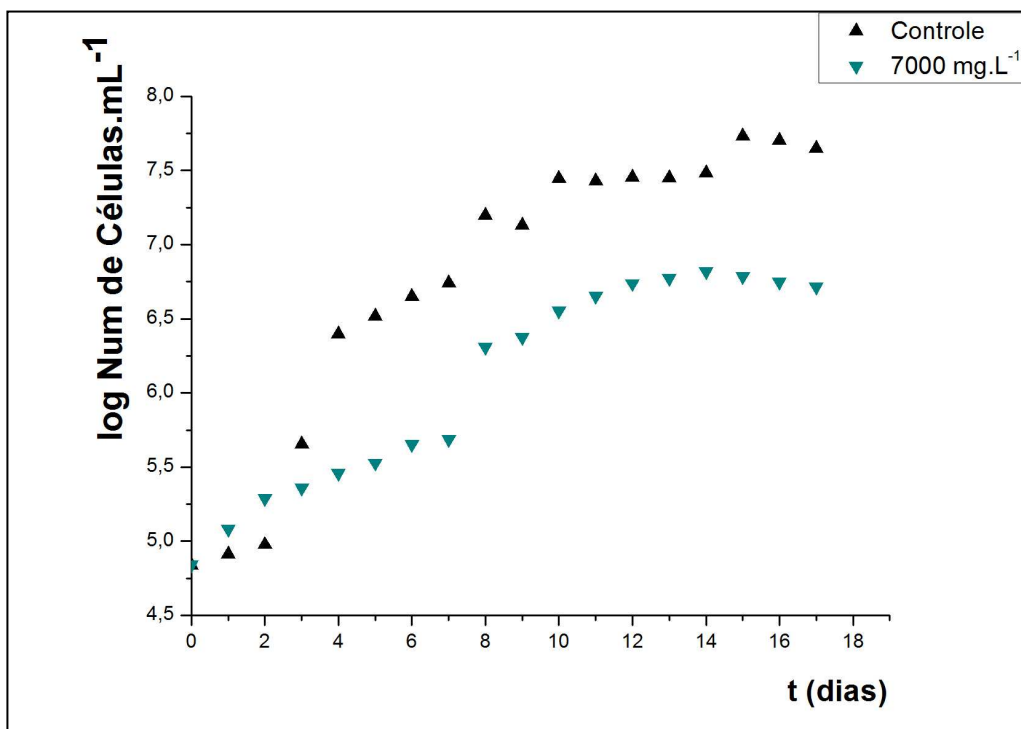


Figura 27 – Curva de crescimento microbiano da microalga *Scenedesmus* sp. em meio com 7000 mg.L⁻¹ de MgCl₂.

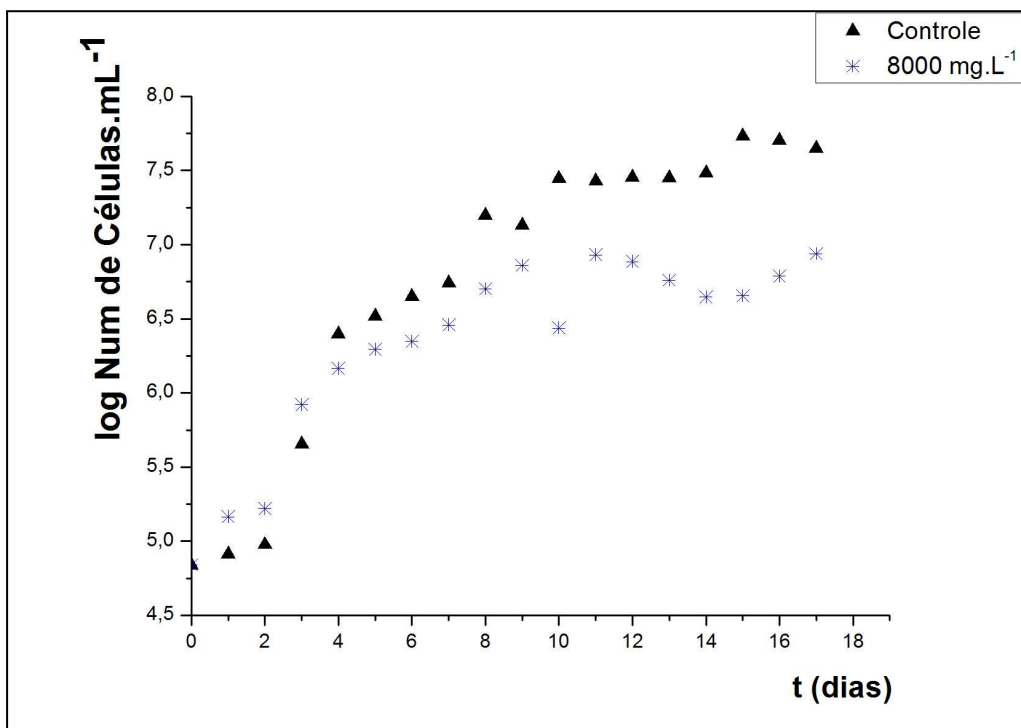


Figura 28 – Curva de crescimento microbiano da microalga *Scenedesmus* sp. em meio com 8000 mg.L⁻¹ de NaCl.

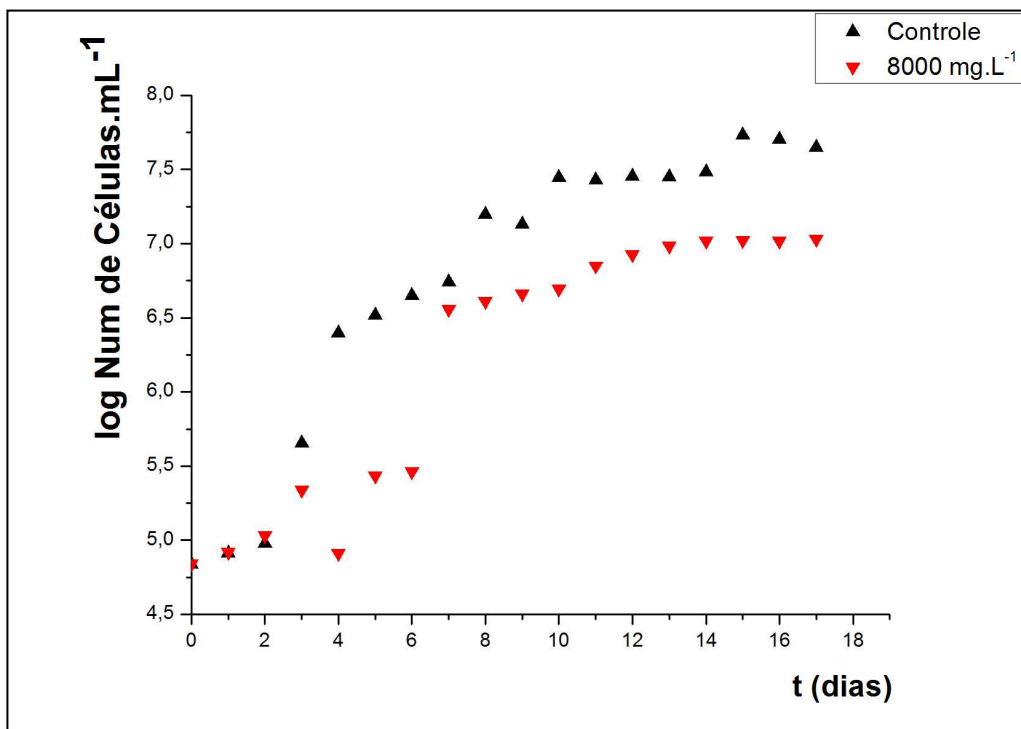


Figura 29 – Curva de crescimento microbiano da microalga *Scenedesmus* sp. em meio com 8000 mg.L⁻¹ de MgCl₂.

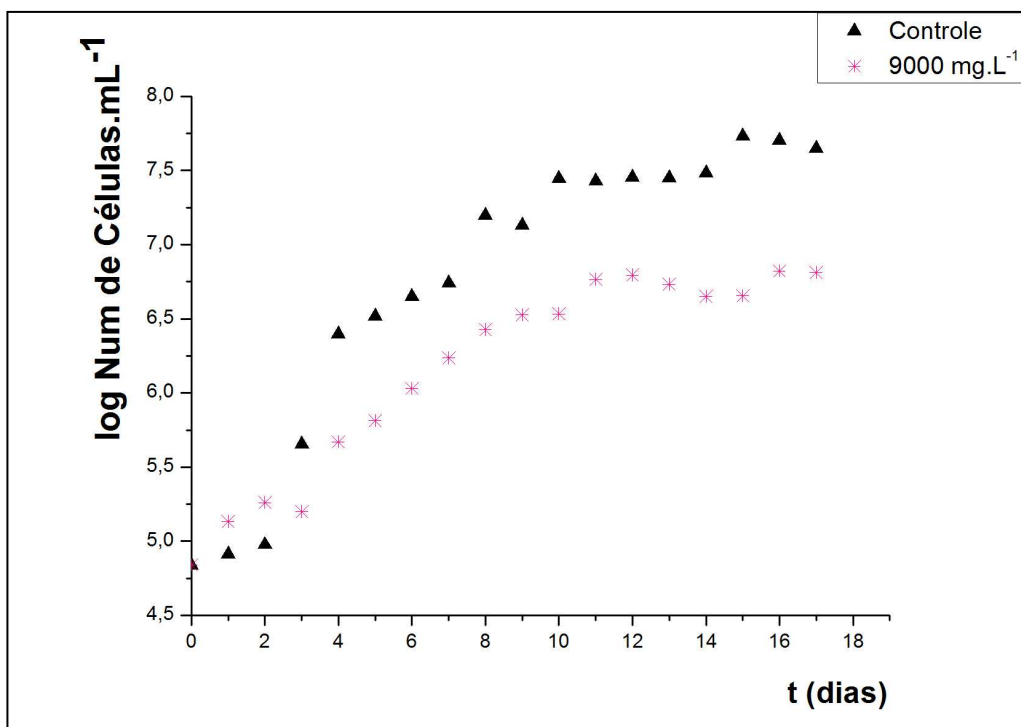


Figura 30 – Curva de crescimento microbiano da microalga *Scenedesmus* sp. em meio com 9000 mg.L⁻¹ de NaCl.

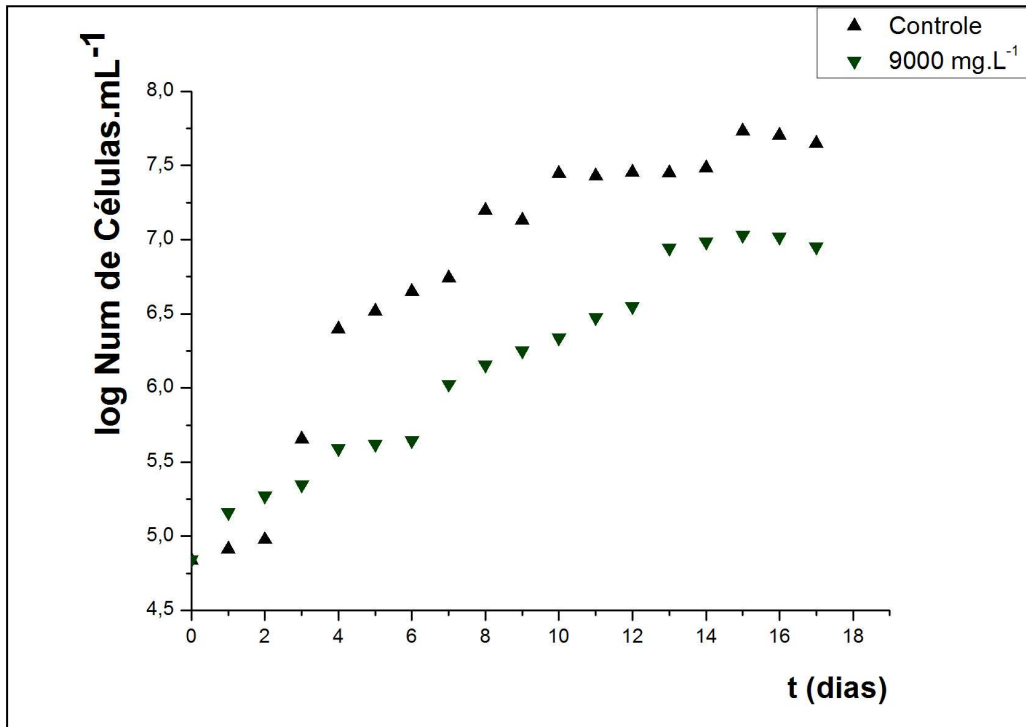


Figura 31 – Curva de crescimento microbiano da microalga *Scenedesmus* sp. em meio com 9000 mg.L⁻¹ de MgCl₂.

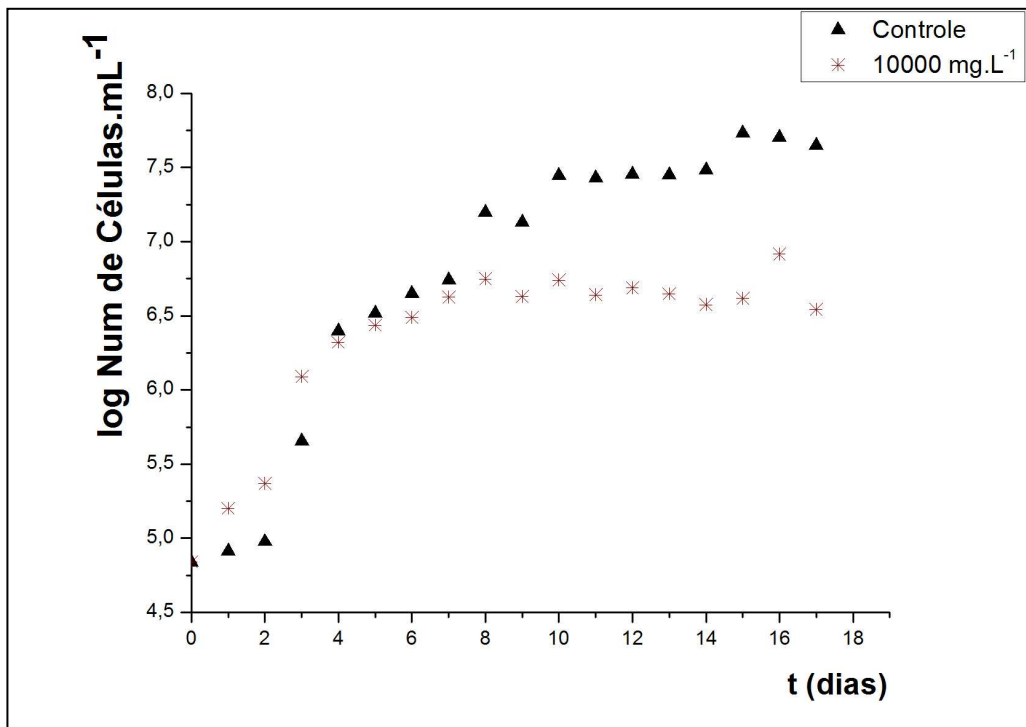


Figura 32 – Curva de crescimento microbiano da microalga *Scenedesmus* sp. em meio com 10000 mg.L⁻¹ de NaCl.

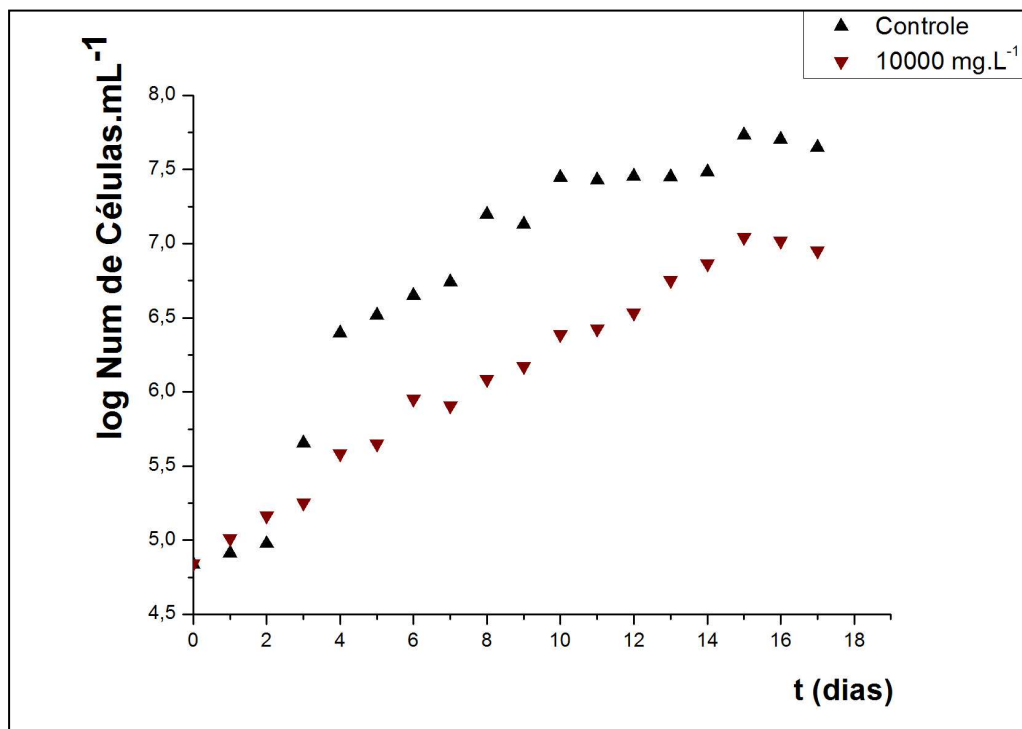


Figura 33 – Curva de crescimento microbiano da microalga *Scenedesmus* sp. em meio com 10000 mg.L⁻¹ de MgCl₂.

Analisando as curvas de crescimento microbiano verificou-se que a concentração celular foi maior no cultivo em meio de controle básico WC, em relação aos meios com a adição dos sais NaCl e MgCl₂, o que mostra a influência do meio salobro no metabolismo celular. As fases de crescimento foram observadas, conforme aborda Fogler, 2009, sendo verificado na curva de controle que a fase *Lag* ou de latência ocorreu entre os dias 0 e 3, a fase de crescimento exponencial ou *Log* ocorreu entre o quarto e décimo, neste período a concentração de células atingiu o seu valor máximo. Entre os dias 11 e 17 ocorreu a fase estacionária.

Nos meios em que foram adicionados cloreto de sódio verificou-se que a fase *Lag* ocorreu entre os dias 0 e 1 para os meios contendo (1000, 2000 e 3000) mg.L⁻¹ de NaCl. Tal fase ocorreu entre os dias 0 e 2 para (4000, 8000 e 10000) mg.L⁻¹ e entre os dias 0 e 3 para (5000 e 6000) mg.L⁻¹ e não foi observada para (7000 e 9000) mg.L⁻¹. A ocorrência da fase de latência indica que a microalga está se adaptando ao meio contendo o sal; as enzimas utilizadas nas reações intracelulares

estão sendo produzidas para que efetivamente o crescimento celular seja observado.

Para os meios WC com adição do sal cloreto de magnésio a fase de latência ocorreu por mais tempo somente nos meios com as concentrações de (6000 e 8000) mg.L^{-1} , mostrando que, de um modo geral, o tempo de adaptação da microalga nos meios contendo MgCl_2 foi menor do que nos meios com NaCl . Isto pode indicar que, o fato de o magnésio ser um dos macronutrientes ou nutrientes essenciais para o crescimento de microalgas, o tempo de adaptação destes organismos nos meios com adição do sal MgCl_2 é menor do que nos meios contendo NaCl , já que o sódio é um dos micronutrientes, requeridos em quantidades menores para o crescimento da microalga.

Foram observadas semelhanças nos valores dos números de células por mL (Anexo 01), bem como nas curvas de crescimento das seguintes concentrações de sais: 1000 mg.L^{-1} de MgCl_2 e 2000 mg.L^{-1} de NaCl , 2000 mg.L^{-1} de MgCl_2 e 4000 mg.L^{-1} de NaCl , 3000 mg.L^{-1} de MgCl_2 e 6000 mg.L^{-1} de NaCl , 4000 mg.L^{-1} de MgCl_2 e 8000 mg.L^{-1} e 5000 mg.L^{-1} de MgCl_2 e 10000 mg.L^{-1} de NaCl . Tal similaridade deve-se à influência do íon cloreto ser praticamente a mesma nas concentrações citadas, pois o MgCl_2 possuindo duas moléculas de cloro irá atuar mais efetivamente nos meios, apresentando mais íons cloreto dissolvidos. Devido ao fato de o magnésio e sódio serem macro e micronutrientes importantes ao metabolismo celular a salinidade do meio (influência do cloreto) não impede o crescimento microalgal e conseqüente produção de biomassa.

Os Anexos 03 e 04 mostram os valores do pH do meio lidos diariamente, em paralelo com a contagem do número de células para todas as concentrações dos sais. A partir de tais valores observa-se que o crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. ocorreu em meios com valores de pH básicos, a faixa mais propícia para a produção de biomassa.

5.2 Cinética de Crescimento

Analisando a fase de crescimento exponencial para cada meio com adição dos sais foram traçados os gráficos do $\ln X$ (\ln da concentrações celulares na fase *Log*)

em função de $(t-t_0)$, onde t_0 é o tempo em que se inicia a fase *Log*. As Figuras 34 a 54 mostram os gráficos plotados.

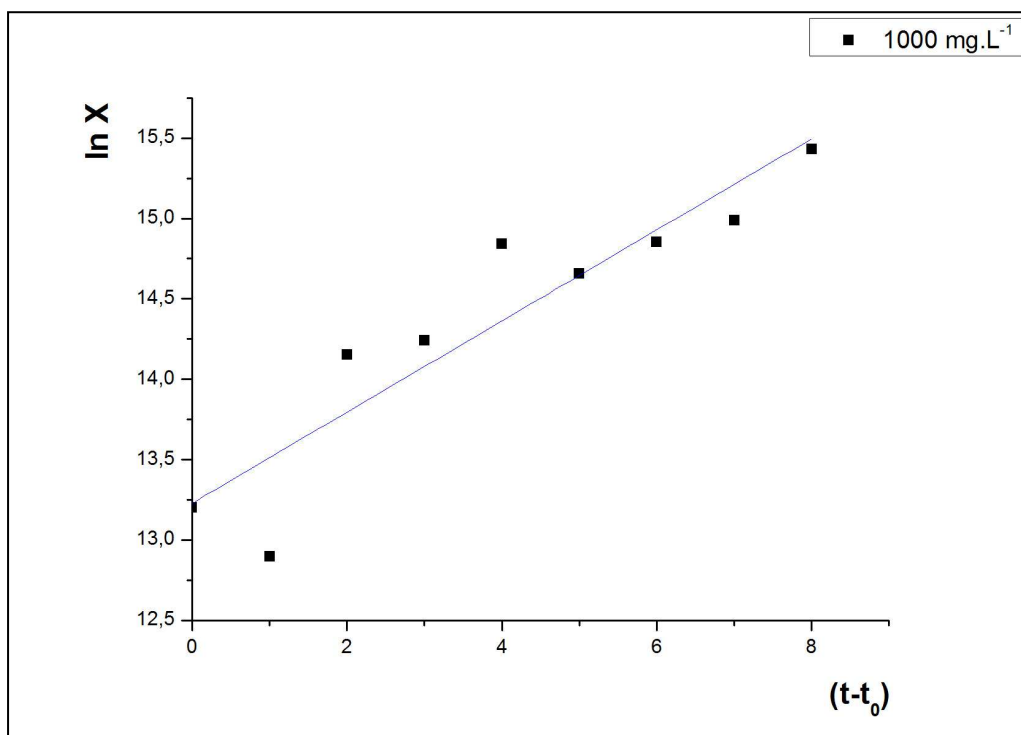


Figura 34 – Análise da fase de crescimento exponencial (1000 mg.L^{-1} de NaCl).
 $R^2 = 0,8337$

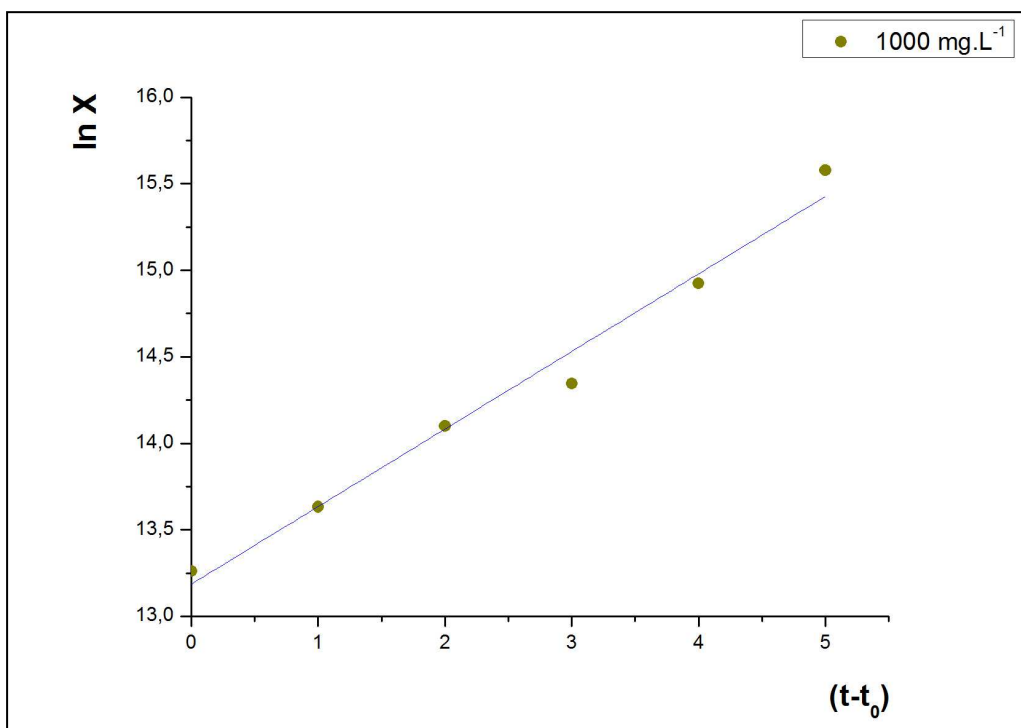


Figura 35 – Análise da fase de crescimento exponencial (1000 mg.L^{-1} de MgCl_2).
 $R^2 = 0,9771$

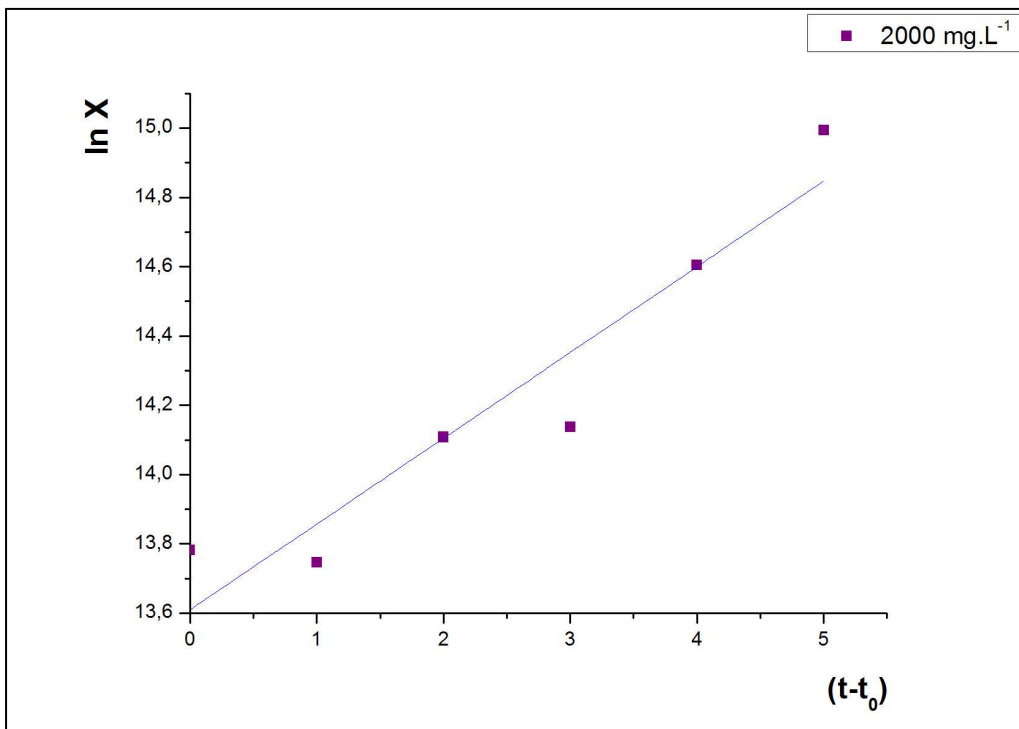


Figura 36 – Análise da fase de crescimento exponencial (2000 mg.L^{-1} de NaCl).
 $R^2 = 0,8840$

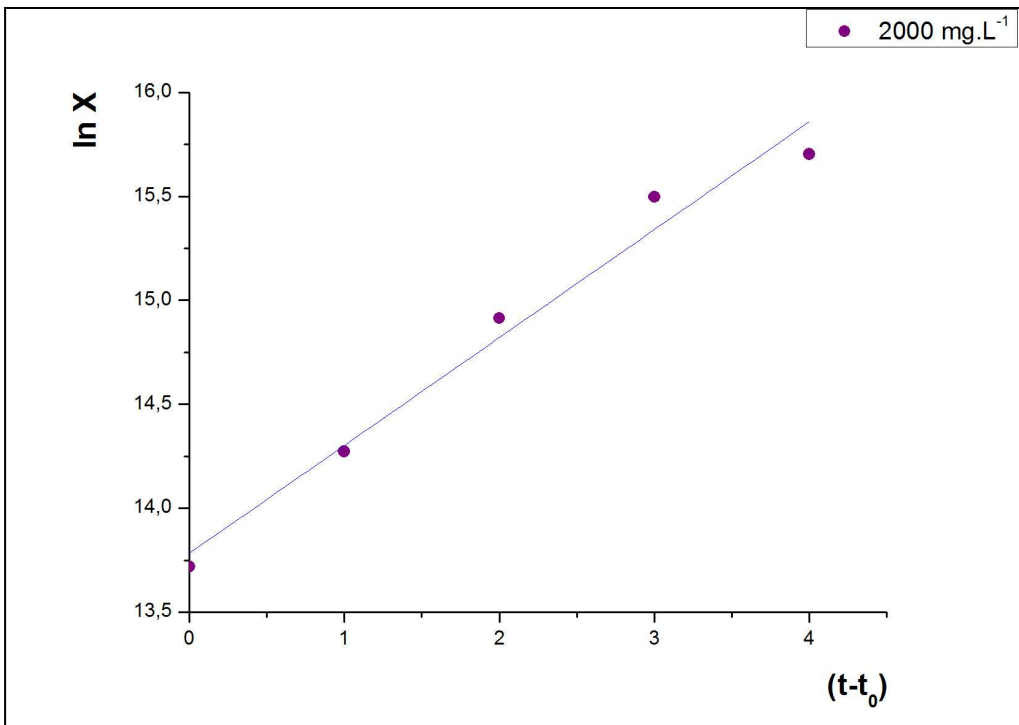


Figura 37 – Análise da fase de crescimento exponencial (2000 mg.L^{-1} de MgCl_2).
 $R^2 = 0,9697$

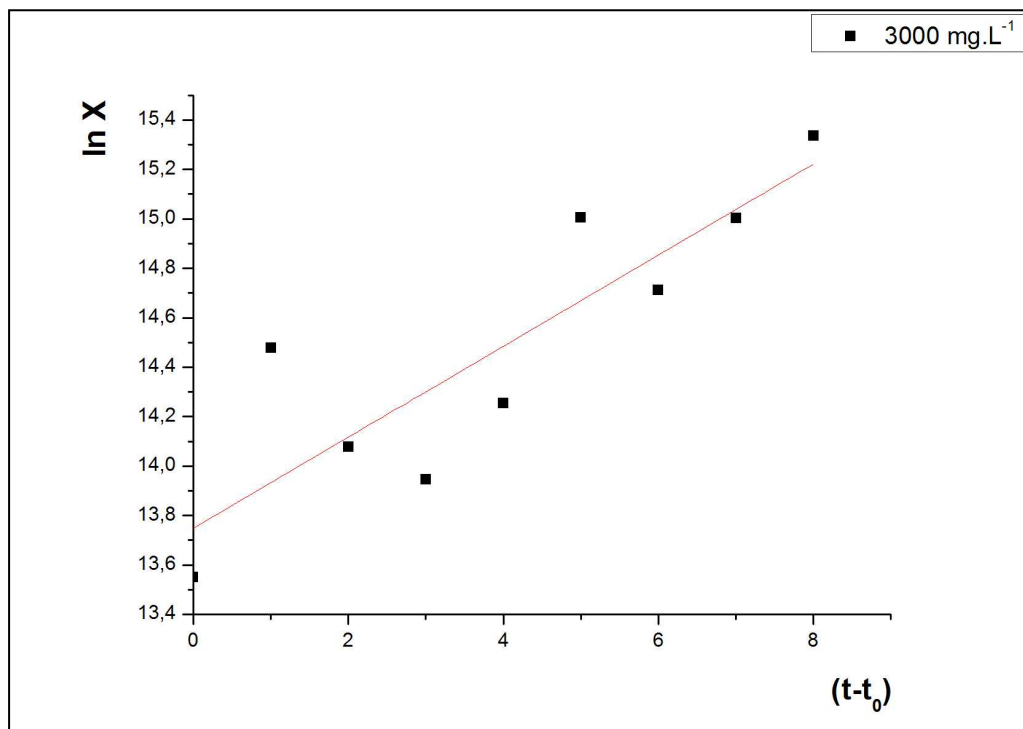


Figura 38 – Análise da fase de crescimento exponencial (3000 mg.L⁻¹ de NaCl).
R² = 0,7183

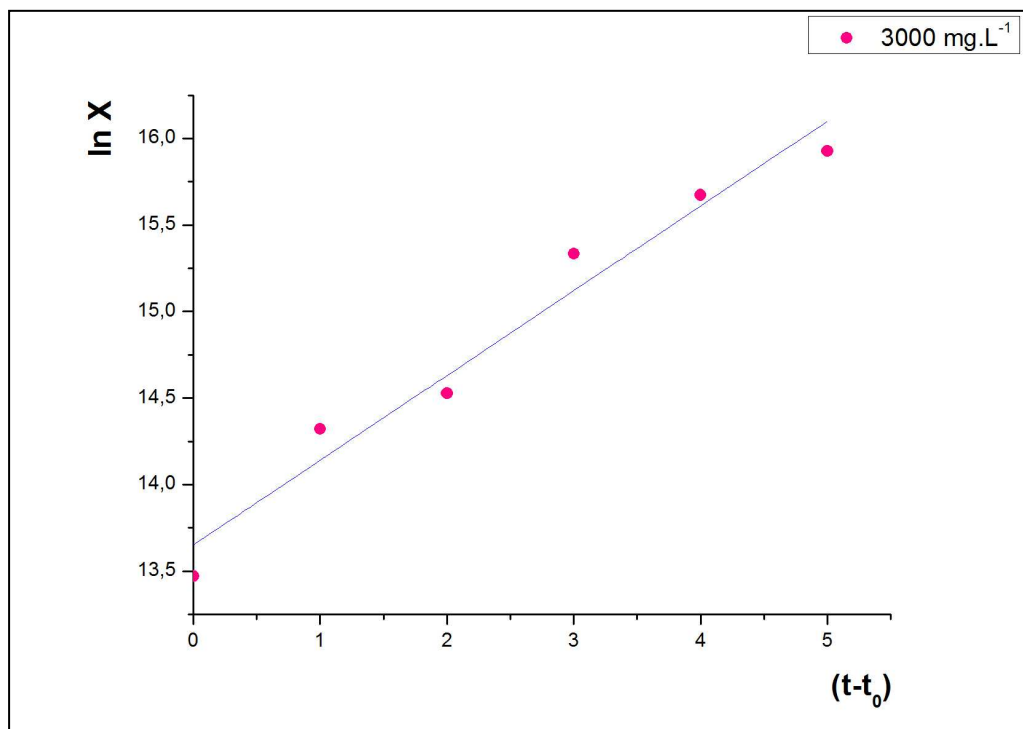


Figura 39 – Análise da fase de crescimento exponencial (3000 mg.L⁻¹ de MgCl₂).
R² = 0,9556

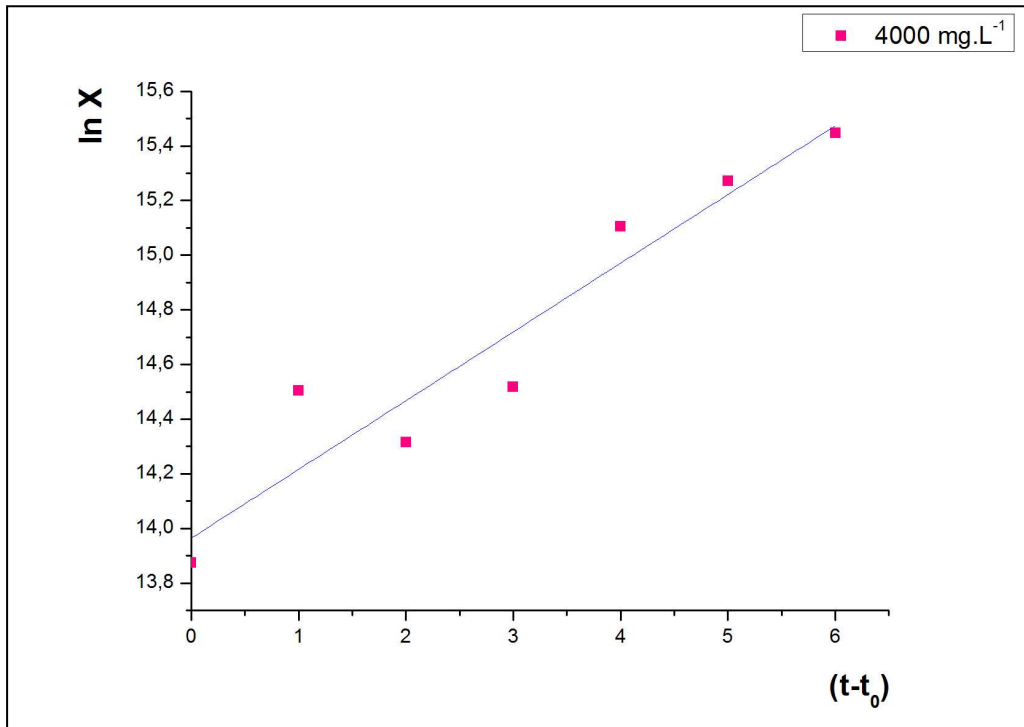


Figura 40 – Análise da fase de crescimento exponencial (4000 mg.L⁻¹ de NaCl).
R² = 0,8920

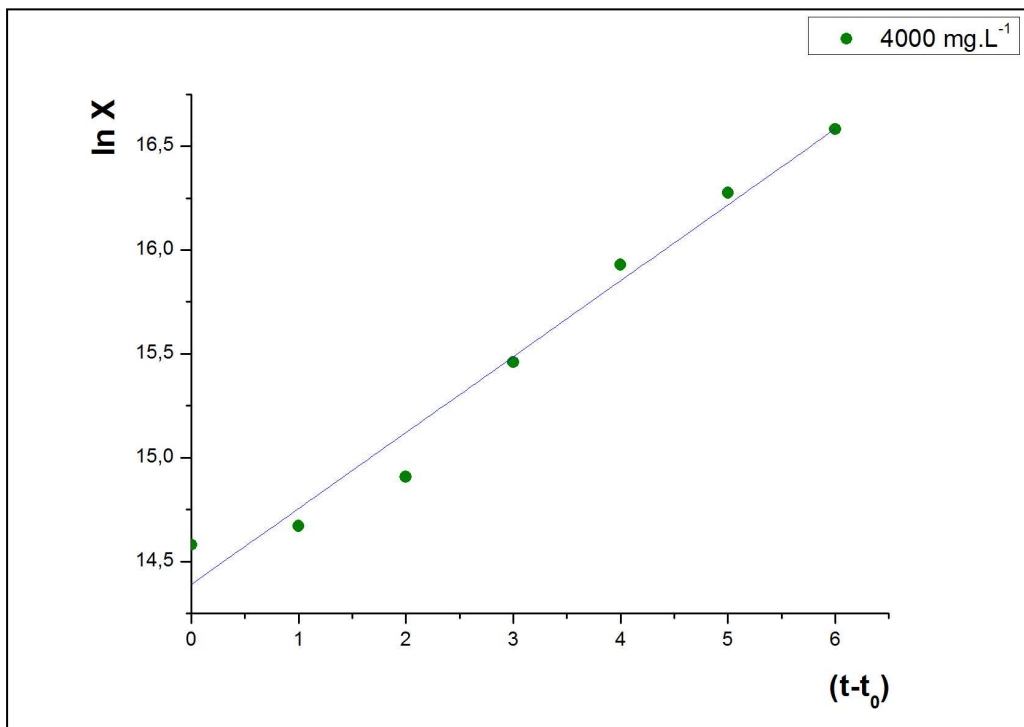


Figura 41 – Análise da fase de crescimento exponencial (4000 mg.L⁻¹ de MgCl₂).
R² = 0,9689

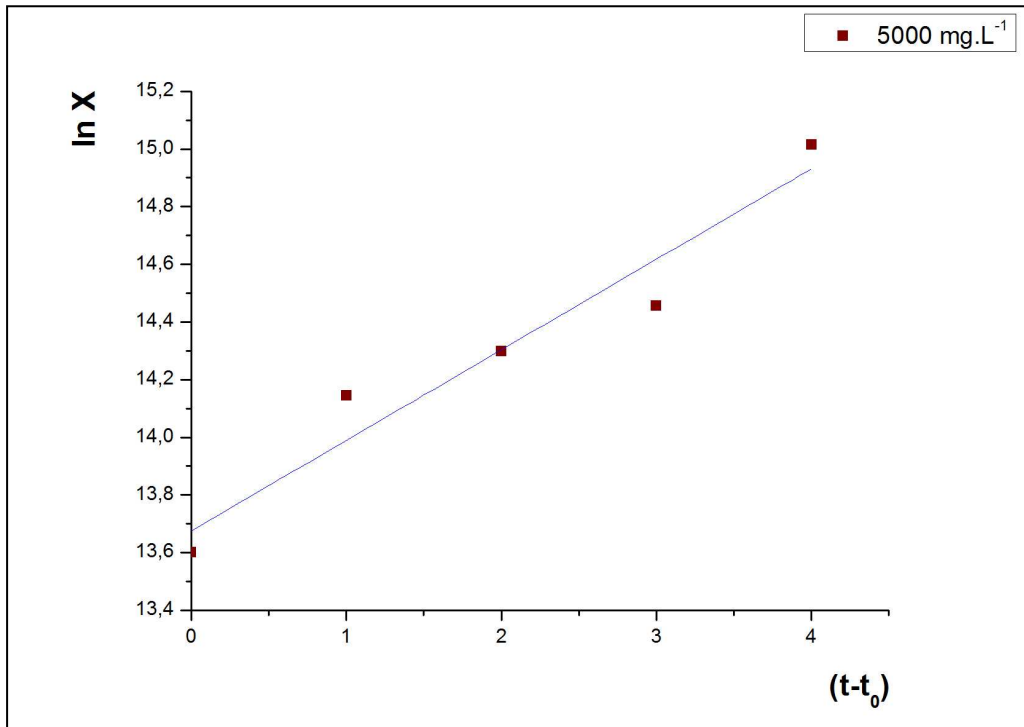


Figura 42 – Análise da fase de crescimento exponencial (5000 mg.L⁻¹ de NaCl).
R² = 0,9208

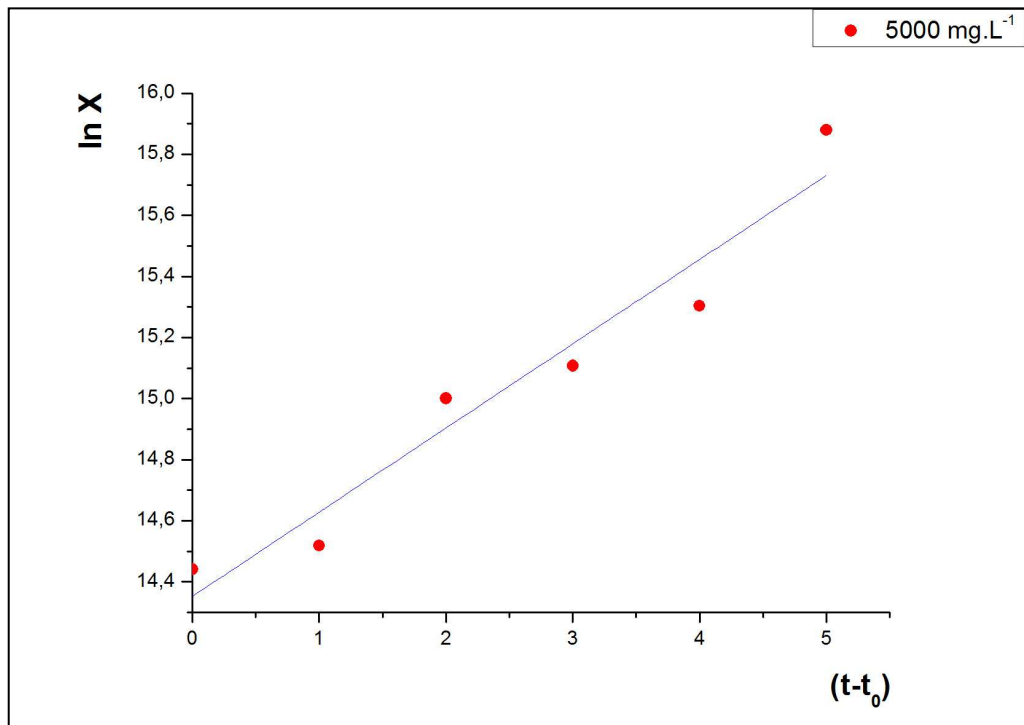


Figura 43 – Análise da fase de crescimento exponencial (5000 mg.L⁻¹ de MgCl₂).
R² = 0,9296

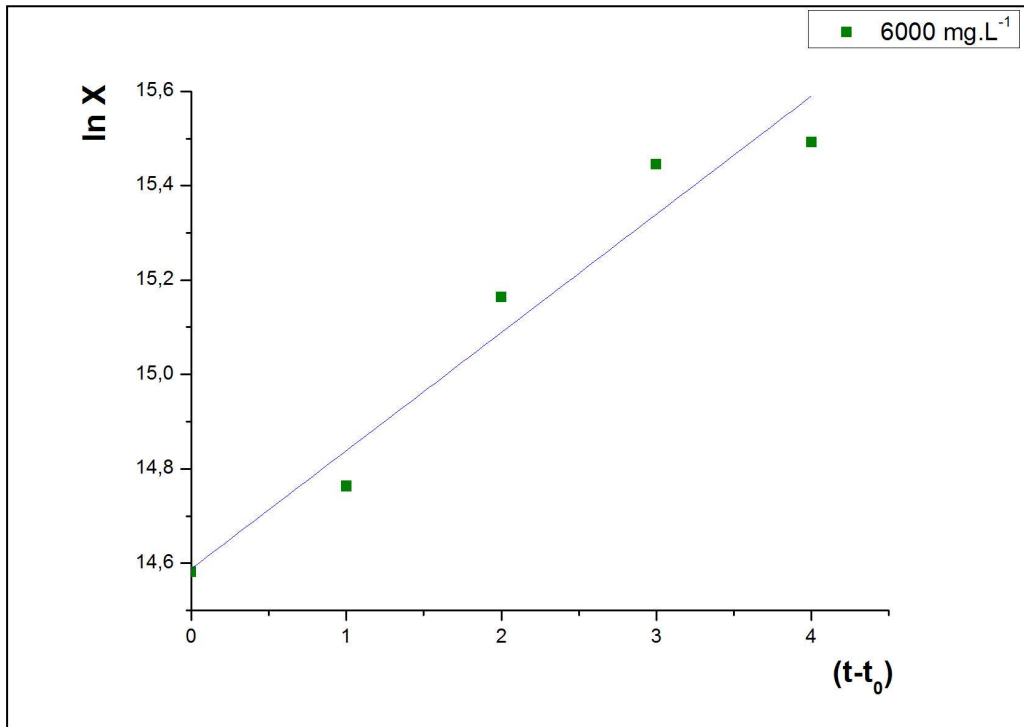


Figura 44 – Análise da fase de crescimento exponencial (6000 mg.L⁻¹ de NaCl).
R² = 0,9356

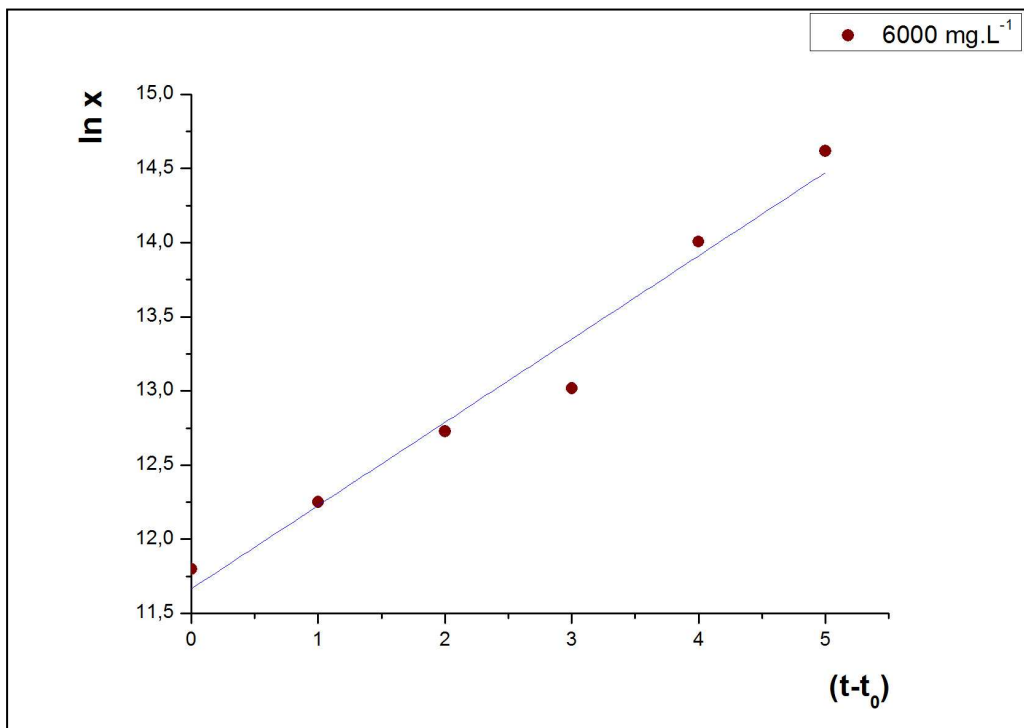


Figura 45 – Análise da fase de crescimento exponencial (6000 mg.L⁻¹ de MgCl₂).
R² = 0,9642

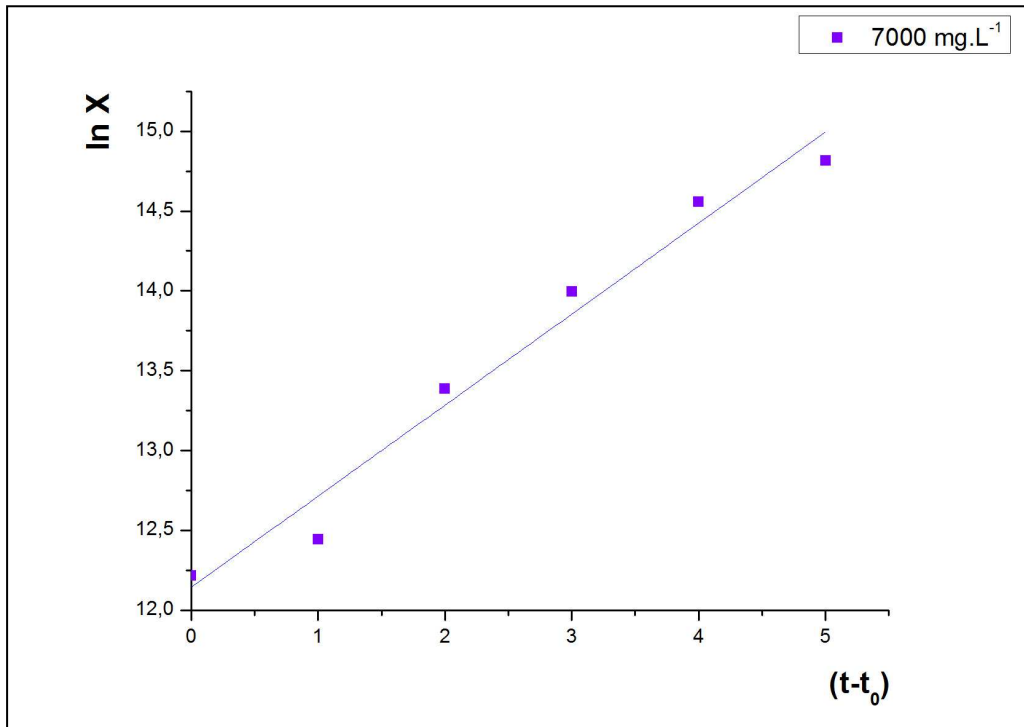


Figura 46 – Análise da fase de crescimento exponencial (7000 mg.L⁻¹ de NaCl).
R² = 0,9660

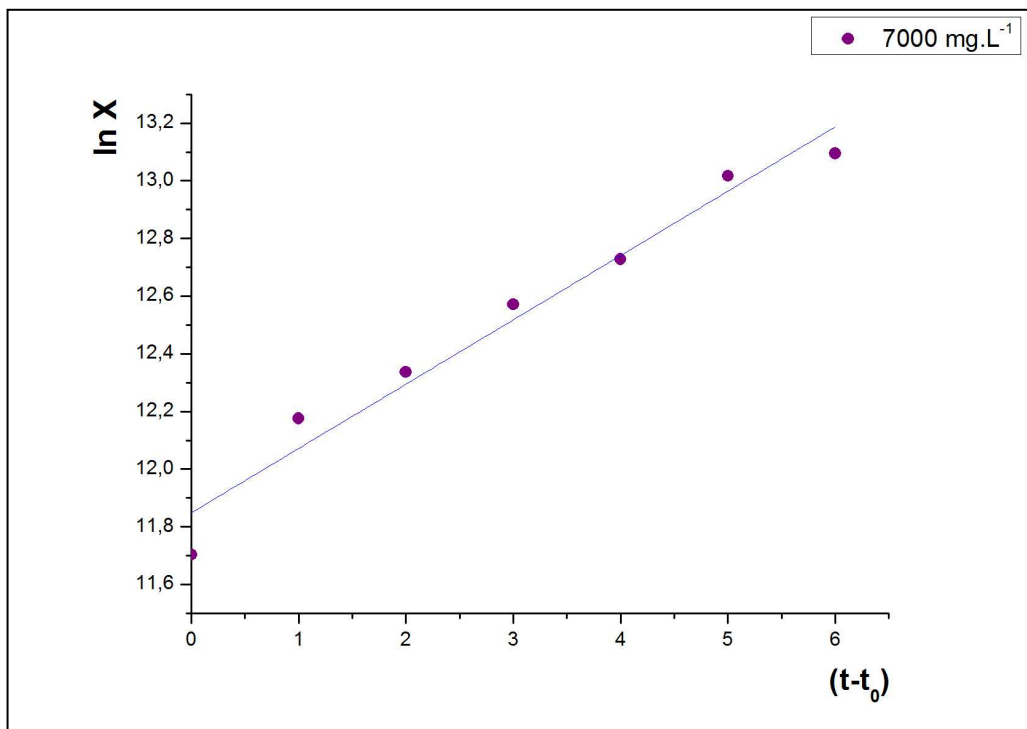


Figura 47 – Análise da fase de crescimento exponencial (7000 mg.L⁻¹ de MgCl₂).
R² = 0,9599

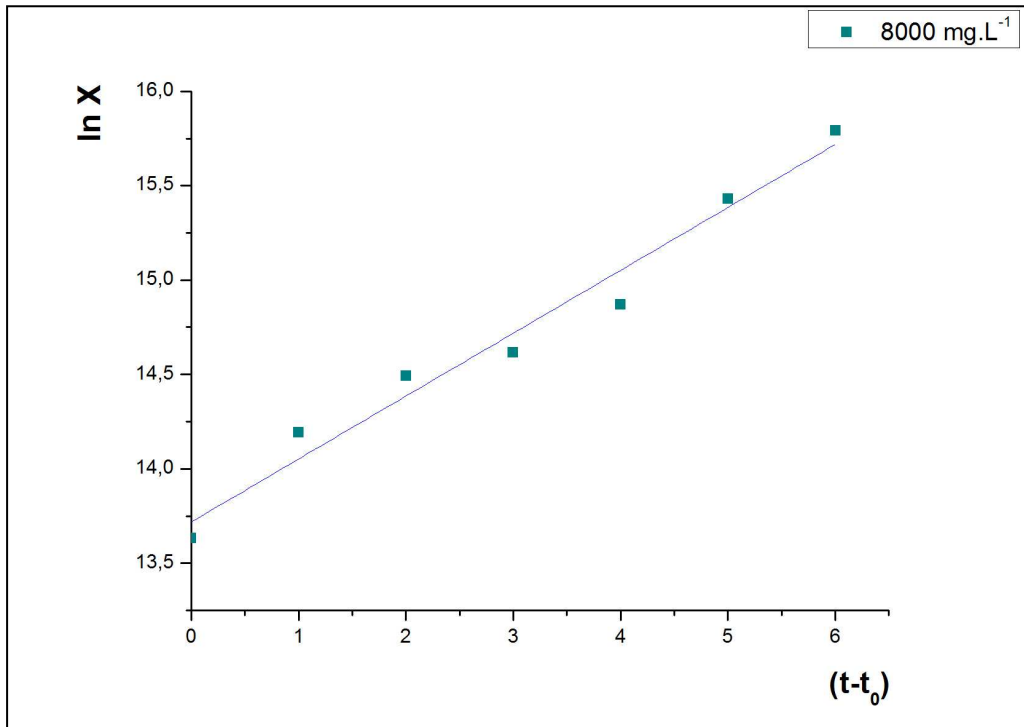


Figura 48 – Análise da fase de crescimento exponencial (8000 mg.L⁻¹ de NaCl).
R² = 0,9662

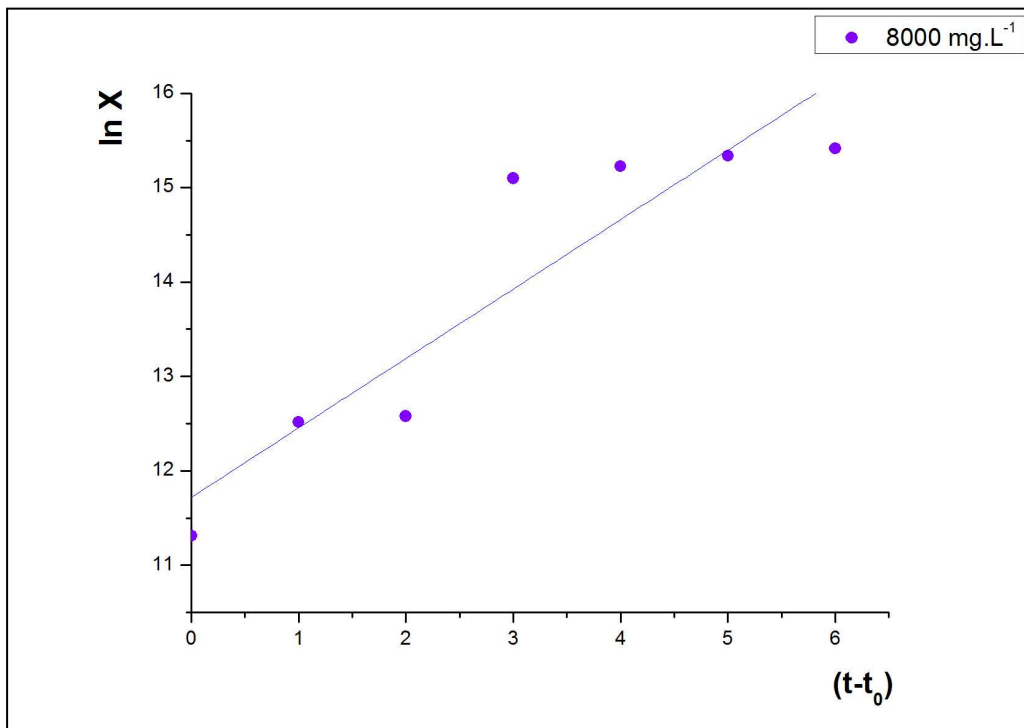


Figura 49 – Análise da fase de crescimento exponencial (8000 mg.L⁻¹ de MgCl₂).
R² = 0,8151

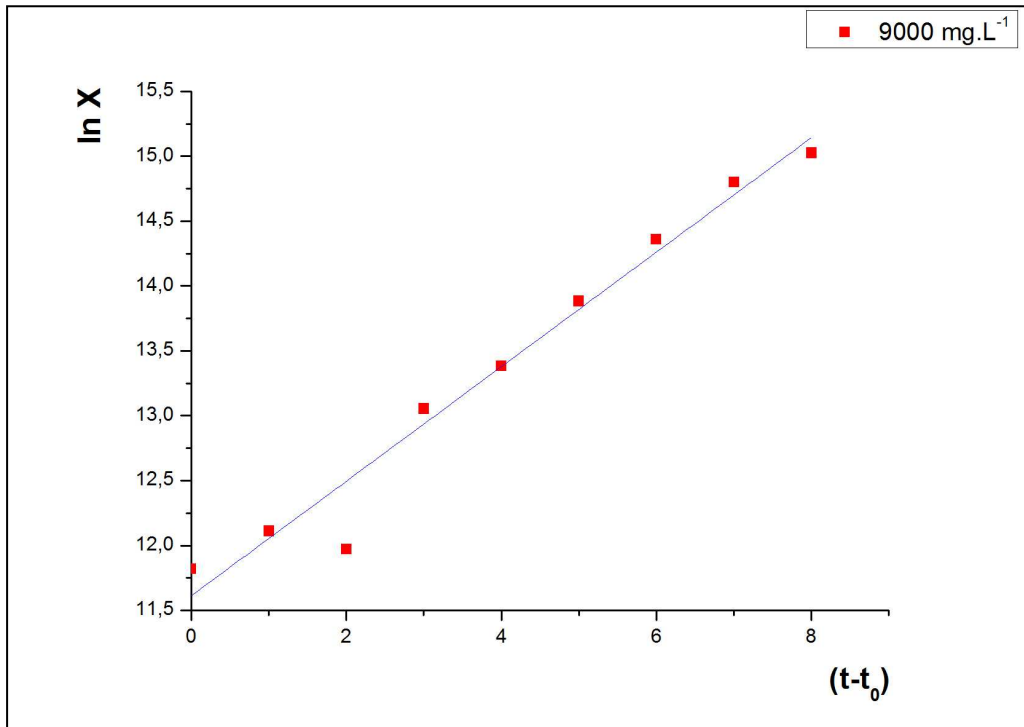


Figura 50 – Análise da fase de crescimento exponencial (9000 mg.L⁻¹ de NaCl).
R² = 0,9647

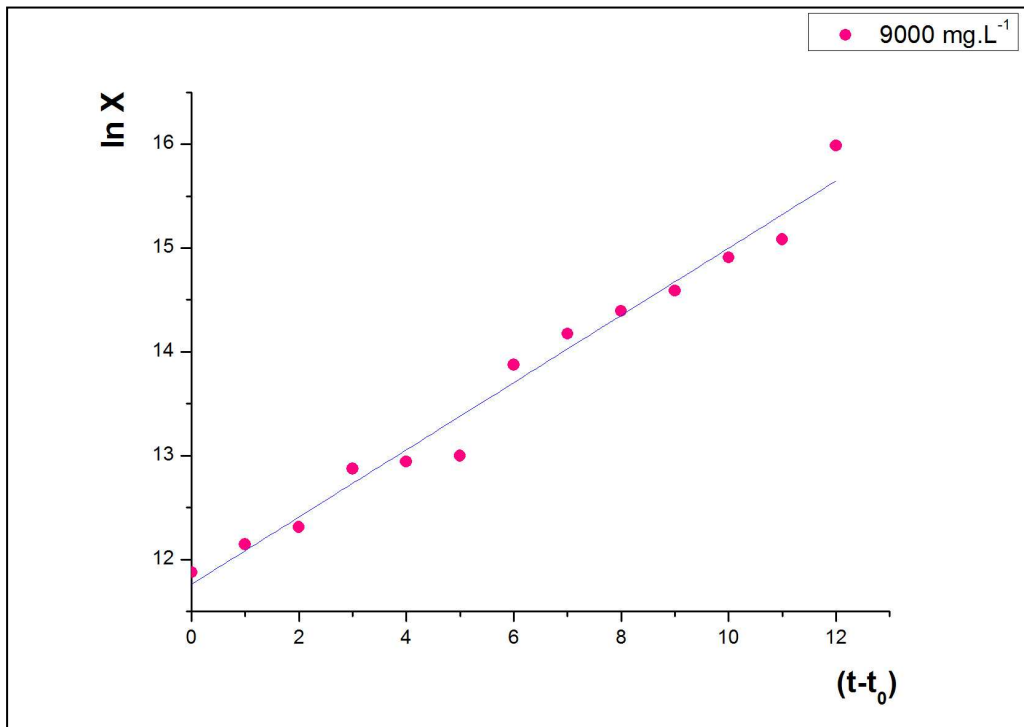


Figura 51 – Análise da fase de crescimento exponencial (9000 mg.L⁻¹ de MgCl₂).
R² = 0,9752

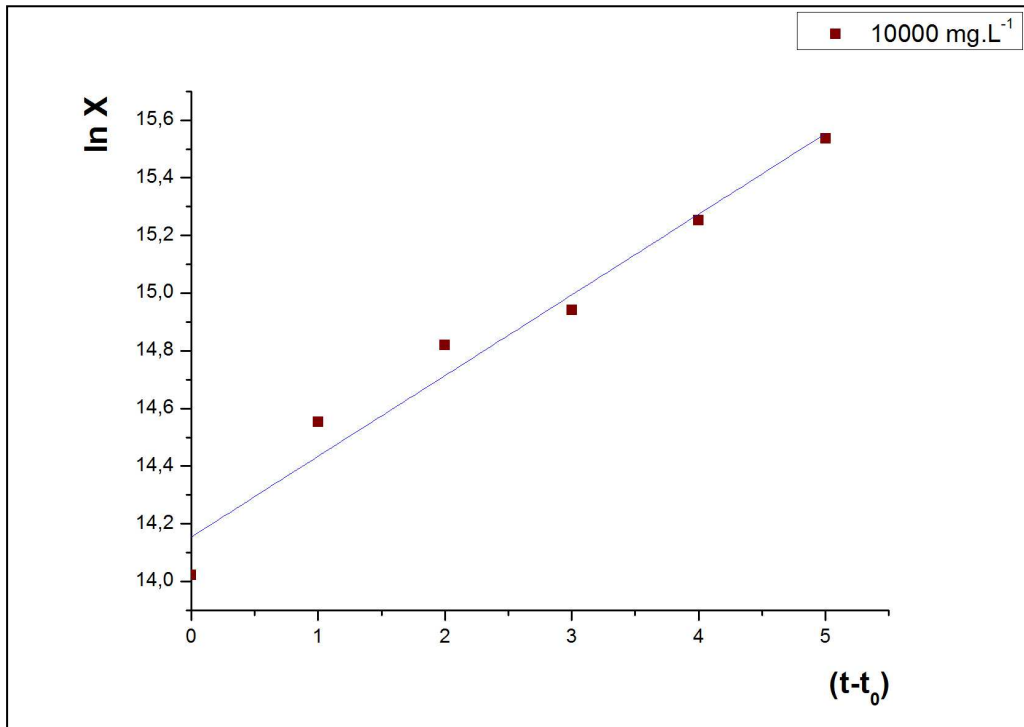


Figura 52 – Análise da fase de crescimento exponencial (10000 mg.L⁻¹ de NaCl).
R² = 0,9592

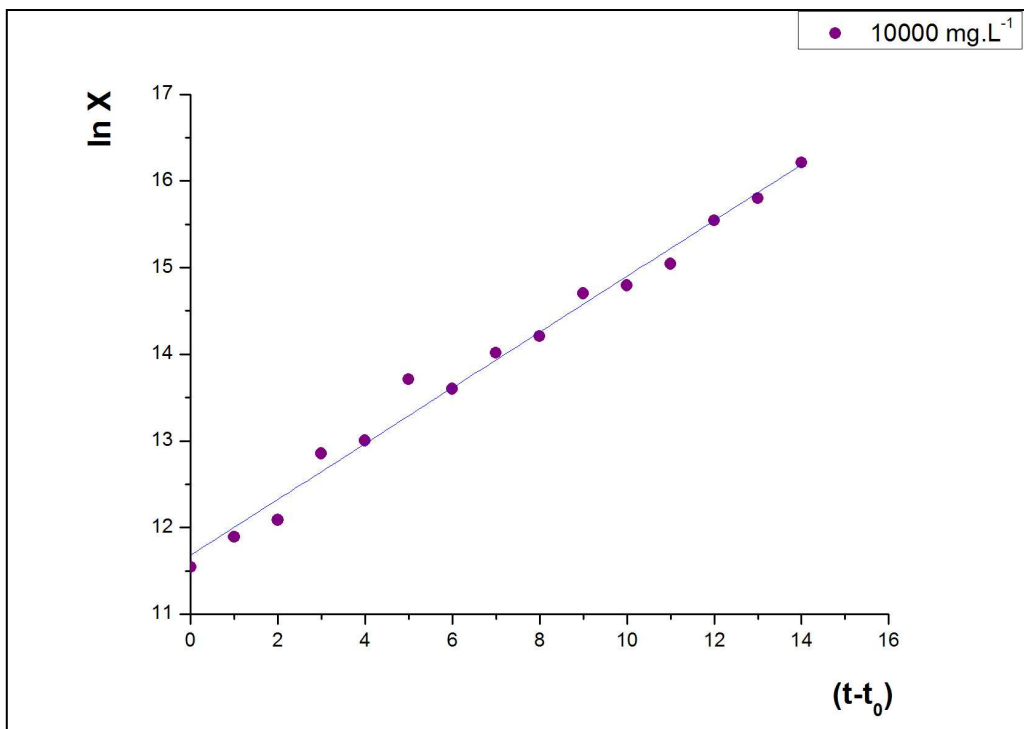


Figura 53 – Análise da fase de crescimento exponencial (10000 mg.L⁻¹ de MgCl₂).
R² = 0,9861

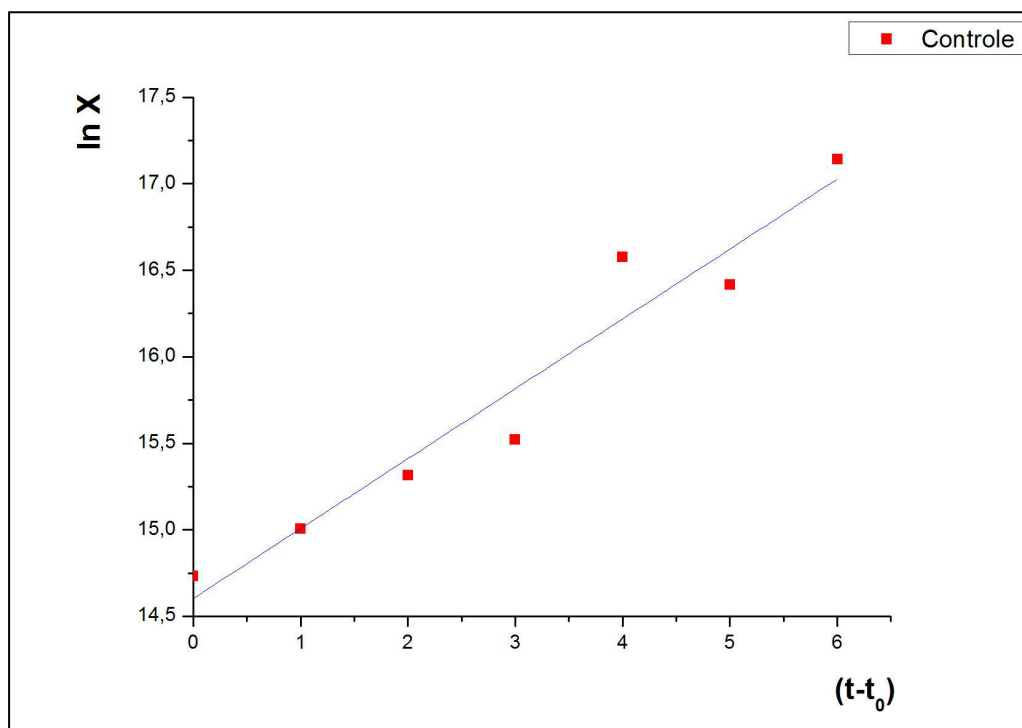


Figura 54 – Análise da fase de crescimento exponencial (Meio de Controle).
 $R^2 = 0,9273$

As Tabela 04 e 05 mostram as velocidades máximas de crescimento calculadas a partir da regressão linear dos dados (Figuras 34 a 54), onde o coeficiente angular da reta representa o valor de $\mu_{\text{máx}}$.

Tabela 04 – Valores de $\mu_{\text{máx}}$ para o meio WC com adição de NaCl.

| Meio WC + NaCl | |
|------------------------------------|---|
| Concentração (mg.L ⁻¹) | $\mu_{\text{máx}}$ (dia ⁻¹) |
| Meio de Controle | 0,4039 |
| 1000 | 0,2832 |
| 2000 | 0,2475 |
| 3000 | 0,1842 |
| 4000 | 0,2516 |
| 5000 | 0,3139 |
| 6000 | 0,2505 |
| 7000 | 0,5699 |
| 8000 | 0,3332 |
| 9000 | 0,4413 |
| 10000 | 0,2797 |

Tabela 05 – Valores de $\mu_{\text{máx}}$ para o meio WC com adição de MgCl_2 .

| Meio WC + MgCl_2 | |
|---|---|
| Concentração (mg.L^{-1}) | $\mu_{\text{máx}}$ (dia^{-1}) |
| Meio de Controle | 0,4039 |
| 1000 | 0,4484 |
| 2000 | 0,5191 |
| 3000 | 0,4899 |
| 4000 | 0,3655 |
| 5000 | 0,2759 |
| 6000 | 0,5615 |
| 7000 | 0,2230 |
| 8000 | 0,7357 |
| 9000 | 0,3239 |
| 10000 | 0,3220 |

Os valores obtidos representam a velocidade máxima de crescimento, que é atingida na fase *Log*. Comparando-se os resultados observa-se que na maioria dos casos o valor de $\mu_{\text{máx}}$ foi maior nos meios contendo o cloreto de magnésio, exceto nos meios com concentração de (5000, 7000 e 9000) mg.L^{-1} . Este fato pode indicar que a cinética de crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. é favorecida nos meios com adição de MgCl_2 , pois o magnésio é um dos nutrientes essenciais ao crescimento da microalga. Apesar da quantidade de cloreto ser maior nos meios contendo cloreto de magnésio, este fato não impediu o crescimento da microalga.

É importante destacar que embora os valores de $\mu_{\text{máx}}$ nos meios com NaCl tenham sido menores, comparando-se com o meio de controle os valores indicam a possibilidade de crescimento da microalga nos meios contendo este sal, embora em taxas menores, principalmente com as concentrações de (7000, 8000 e 9000) mg.L^{-1} .

As Tabela 06 e 07 mostram os valores dos demais parâmetros cinéticos calculados, sendo eles a produtividade em biomassa (células/mL.h) e o tempo de geração (h).

Tabela 06 – Resultados da produtividade em biomassa e tempo de geração (Meio WC + NaCl)

| Meio WC + NaCl | | |
|---|---------------------------------------|----------------------------|
| Concentração (mg.L⁻¹) | P_x (células/mL.dia) | t_g (dia) |
| Meio de Controle | 3,59.10 ⁶ | 2,14 |
| 1000 | 7,45.10 ⁵ | 2,75 |
| 2000 | 7,22.10 ⁵ | 3,60 |
| 3000 | 7,31.10 ⁵ | 4,05 |
| 4000 | 6,58.10 ⁵ | 3,94 |
| 5000 | 3,95.10 ⁵ | 1,82 |
| 6000 | 8,69.10 ⁵ | 1,44 |
| 7000 | 3,84.10 ⁵ | 1,37 |
| 8000 | 5,05.10 ⁵ | 1,87 |
| 9000 | 4,09.10 ⁵ | 1,81 |
| 10000 | 5,10.10 ⁵ | 1,37 |

Tabela 07 – Resultados da produtividade em biomassa e tempo de geração (Meio WC + MgCl₂)

| Meio WC + MgCl₂ | | |
|---|---------------------------------------|----------------------------|
| Concentração (mg.L⁻¹) | P_x (células/mL.dia) | t_g (dia) |
| Meio de Controle | 3,59.10 ⁶ | 2,14 |
| 1000 | 8,56.10 ⁵ | 1,72 |
| 2000 | 1,19.10 ⁶ | 1,01 |
| 3000 | 1,24.10 ⁶ | 1,27 |
| 4000 | 1,98.10 ⁶ | 1,35 |
| 5000 | 1,12.10 ⁶ | 1,48 |
| 6000 | 2,79.10 ⁵ | 1,50 |
| 7000 | 4,65.10 ⁵ | 2,03 |
| 8000 | 6,25.10 ⁵ | 1,57 |
| 9000 | 7,09.10 ⁵ | 2,14 |
| 10000 | 7,29.10 ⁵ | 2,15 |

Analisando-se os dados obtidos observa-se que a produtividade em termos de biomassa, que representa o desempenho do crescimento da microalga, mostrou seu maior valor no meio de controle e apresentou para os meios com (2000, 3000, 4000 e 5000) mg.L⁻¹ de MgCl₂ valores da mesma ordem de grandeza que este meio. Para o meio de cultivo com adição do cloreto de sódio todos os valores da produtividade foram da ordem de grandeza de 10⁵.

Comparando-se o desempenho na produção de biomassa observa-se melhores resultados nos meios contendo o cloreto de magnésio. Porém, é importante observar que em ambos os meios com adição dos sais a diferentes concentrações não são observadas quedas expressivas nos valores de produtividade em biomassa.

Com relação ao tempo de geração o maior valor deste parâmetro para os meios com NaCl foi para o meio com 3000 mg.L⁻¹ do sal (4,05 dias) e o menor valor foi para o meio com (7000 e 10000) mg.L⁻¹ (1,37 dia). No meio WC com adição de MgCl₂ o maior valor de t_g foi para a concentração de 10000 mg.L⁻¹ (2,15 dias) e o menor valor foi de 2000 mg.L⁻¹ (1,01 dia). Estes valores comprovam o fato de que a cinética de crescimento apresentou melhores resultados nos meios com a adição do sal cloreto de magnésio, pois, em geral, os menores valores do tempo de geração foram para estes meios.

Os dados cinéticos obtidos revelam a possibilidade de produção da microalga *Scenedesmus* sp. em águas salobras, já que os valores dos parâmetros cinéticos (produtividade em biomassa, velocidade máxima de crescimento e tempo de geração) não mostraram grandes diferenças em relação ao meio sem a adição de sais. Por isso torna-se viável o reaproveitamento de águas salobras para a produção de biomassa microalgal, baseado na cinética de crescimento.

Tendo em vista a proporção de moléculas do NaCl é de 1:1 e no MgCl₂ esta proporção é de 1:2, ou seja, uma molécula de sódio para uma de cloro e uma molécula de magnésio para duas de cloro, portanto um determinado valor da concentração de cloreto de magnésio equivale ao dobro da concentração de cloreto de sódio, em termos de quantidade do íon cloreto dissolvido no meio. Por este motivo foram observados os valores de t_g dos meios WC com adição dos sais (principalmente com concentrações maiores), indicando semelhanças nos valores deste parâmetro entre os meios contendo o dobro da concentração de cloreto de sódio, indicando que a influência do íon cloreto foi similar nos meios comparados, conforme é mostrado na Tabela 08.

Tabela 08 – Comparação dos tempos de geração.

| Concentração | t_g (dia) |
|---|----------------------------|
| 1000 mg.L ⁻¹ MgCl ₂ | 1,72 |
| 2000 mg.L ⁻¹ NaCl | 3,60 |
| 2000 mg.L ⁻¹ MgCl ₂ | 1,01 |
| 4000 mg.L ⁻¹ NaCl | 3,94 |
| 3000 mg.L ⁻¹ MgCl ₂ | 1,27 |
| 6000 mg.L ⁻¹ NaCl | 1,44 |
| 4000 mg.L ⁻¹ MgCl ₂ | 1,35 |
| 8000 mg.L ⁻¹ NaCl | 1,87 |
| 5000 mg.L ⁻¹ MgCl ₂ | 1,48 |
| 10000 mg.L ⁻¹ NaCl | 1,37 |

6 CONCLUSÕES

A partir dos estudos realizados e das análises dos dados obtidos chegou-se às seguintes conclusões quanto à cinética de crescimento da microalga *Scenedesmus* sp. em meios salobros:

1. Baseado nas curvas de crescimento verifica-se que todas as fases de crescimento microbiano ocorreram, conforme abordado na literatura, exceto nos casos em que a fase de latência não ocorreu, devido à adaptação da microalga ao novo meio.
2. Os meios que indicaram menor tempo de adaptação da microalga *Scenedesmus* sp. foram os meios com adição do sal cloreto de magnésio, pois na maioria destes a fase *Lag* ou de latência praticamente não ocorreu, durando somente um dia, com exceção do meio com 8000 mg.L⁻¹ do sal, onde esta fase ocorreu por três dias.
3. Observou-se que a influência do íon cloreto presente nos meios foi atenuada devido à presença dos íons magnésio e sódio, já que são nutrientes importantes para o metabolismo celular, sendo mais evidenciado nos meios contendo cloreto de magnésio.
4. Quanto à velocidade máxima de crescimento foi observado que nos meios nos meio contendo o sal cloreto de magnésio os resultados obtidos demonstram as maiores velocidades neste meio, indicando que o magnésio está exercendo uma maior influência no metabolismo celular que o íon cloreto presente no meio.
5. Quanto à produtividade em biomassa observou-se maiores valores para os meios com adição do cloreto de magnésio, indicando melhor desempenho na produção de biomassa nestes meios.
6. Quanto ao tempo de geração observou-se menores valores nos meios com adição de cloreto de magnésio, indicando uma melhor cinética de crescimento nos meios com adição de MgCl₂.
7. Comparando-se com o meio de controle, como esperado, todas as curvas ficaram abaixo da curva de crescimento do meio sem a adição de sais.

8. Comparando-se os resultados dos meios com adição de NaCl e MgCl₂ observou-se melhores resultados nos meios contendo cloreto de magnésio. Isto pode ocorrer devido ao fato de que este elemento é um dos macronutrientes importantes no crescimento das microalgas, por isso sua influência no crescimento da microalga é mais forte do que o sódio, já que este é um micronutriente requerido em menores concentrações.
9. Com base na cinética de crescimento conclui-se que é possível a adaptação e cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. em meios salobros.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Realizar estudo cinético da microalga *Scenedesmus* sp. em rejeitos do processo de dessalinização;
- Realizar o estudo da cinética de crescimento de outro tipo de microalga em meios com salinidades mais elevadas;
- Estudar a possibilidade de absorção dos sais presentes no meio pelas microalgas, verificando se tais microrganismos poderiam atuar como dessalinizadores biológicos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J. RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D., **Biologia molecular da célula**. Editora Artes Médicas, 3 ed., Porto Alegre, RS. 1997.

ANDRADE, M. R., COSTA, J. A. V. **Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes**. Ciências Agrotec. Lavras, v. 32, n. 5, p. 1551-1556, 2008.

AZEREDO, V. B. S. **Produção de biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o brasil**. 2012. 187f. Dissertação. (Mestrado Planejamento Energético) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

BAUMGARTNER, T. R. S. BURAK, J. A. M. KOGIKOSKI, M. E. SEBASTIEN, N. Y. ARROYO, P. A. **Avaliação da produtividade da microalga *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat em diferentes meios de cultivo**. Revista Brasileira de Biociências. Porto Alegre, v. 11, n 2, p. 250-255, 2013.

BICUDO, C. E. M; MENEZES, M. **Gênero de algas continentais do Brasil (chave para identificações e descrições)**. 2. ed., São Carlos: Editora Rima, 2006, 502p.

BONINI, M. A. **Cultivo Heterotrófico de *Aphanothece microscópica Nageli* e *Chlorella vulgaris* em Diferentes Fontes de Carbono e Vinhaça**. 2012. 112f. Dissertação. (Mestrado Agricultura e Ambiente) – Universidade Federal de São Carlos, Araras.

BRENNAN, L., OWENDE, P. **Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products**. Elsevier, RSER-805; 21p. 2010.

CHOI, H. J., LEE, S. M. **Effect of the N/P ratio on biomass productivity and nutrient removal from municipal wastewater**. Bioprocess Biosyst Eng. v. 38, p.761–766, 2015.

DELABARY, G. S. **Avaliação do crescimento de três microalgas para a remoção de nutrientes de efluente de estação de tratamento de dejetos**

suínos. 2012. 163f. Dissertação. (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

DZUMAN, M. J. **Efeito da reciclagem repetida do meio de cultivo da microalga *Scenedesmus sp* para a produção de biodiesel**. 2013. 100f. Dissertação. (Mestrado Engenharia Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

FOGLER, H. S. **Elementos de Engenharia das Reações Químicas**. 4ª Edição. Rio de Janeiro. 2009. 854p.

FRANCO, A. L. C. **Biodiesel de microalgas: avanços e desafios**. Química Nova, Vol. 36, No. 3, 437-448, 2013.

GRIS, L. R. S. PAIM, A.C. DOMENEGHINI E. C. BORGES, C. B. TRIERWEILER, J. O. FARENZENA, M. **Produção de Microalgas em Fotobiorreator Airlift**. In: IX Oktoberfórum – PPGEQ, 2010, Porto Alegre, RS. Anais. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

GUILLARD, R. R. L., LORENZEN, C. J. **Yellow-green algae with chlorophyllide**. J. Phycol. v.8, p.10-14, 1972.

HELLEBUST, J. A. **Mechanisms of Response to Salinity in Halotolerant Microalgae**. Plant and Soil. 89, p. 68-81, 1985.

HISS, H. SCHMIDELL, W. LIMA, U. A. AQUARONE, E. BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. Volume 2. Editora Edgard Blucher LTDA. 2011. 562p.

KLUGE, R. A. TEZOTTO-ULIANA, J. V. DA SILVA, P. P. M. **Aspectos Fisiológicos e Ambientais da Fotossíntese**. Virtual Química. Vol 7. No 1. 57-79, 2015.

KOCHEM, L. H. 2010. 47f. **Caracterização de Fotobiorreator Air-lift para Cultivo de Microalgas**. Monografia. Engenharia Química – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

LOPES, D. C. **Cultivo de microalgas para a produção de biodiesel: potencial a ser explorado**. Revista Eletrônica de Energia, v. 4, n. 1, p. 65 -74, 2014.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas- princípios e aplicações**. Rima: São Carlos, 2006.

MASOJIDEK, J. KOBLIZEK, M. TORZILLO, G. Photosynthesis in Microalgae In: RICHMOND A. (editor). **Handbook of Microalgal Culture: Biothechnology and Applied Phycology**. New York: Blacwell Publishing Ltd, 2004. p. 20-39.

MATA, T. M., MARTINS, A. A., CAETANO, N. S., **Microalgae for biodiesel production and other applications: A review**. Renewable and Sustainable Energy Reviews v.14, p. 217–232, 2010.

MENEZES, J. S. **Desenvolvimento de Dispositivo Caseiro para Dessalinização de Água Salobra para Dessedentação Humana**. 2009. 124f. Dissertação. (Mestrado em Química). Universidade Federal da Bahia, Salvador.

MIRANDA, J. R. P. C. **Produção de Bioetanol a Partir da Microalga *Scenedesmus obliquus***. 2011. 130f. Dissertação. (Mestrado Energia e Bioenergia) - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa.

MORAIS, K. C. C. **Análise e Desenvolvimento de Aquicultura da Microalga *Phaeodactylum tricornutum* em Crescimento Autotrófico e Mixotrófico em Fotobiorreatores Compactos**. 2011. 98f. Dissertação. (Mestrado Engenharia e Ciências dos Materiais). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MORIOKA, L. R. I. MATOS, A. P. OLIVO, G. SANT'ANA, E. S. **Floculação de *Chlorella* sp. produzida em concentrado de dessalinização e estudo de método de extração de lipídeos intracelulares**. Química Nova, Vol. 37, No. 1, p. 44-49, 2014.

MOURA, A. M. M., NETO, E. B., KOENING, M. L., LEÇA, E. E. **Composição química de microalgas em cultivo semi-intensivo: *Chaetoceros gracilis* Schutt, *Isochrysis galbana* Parke e *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) G. Fryxell & Hasle**. Rev. Ciênc. Agron., v.37, n.2, p.142-148, 2006.

NETO, H. C. G. **Produção Microbiológica de Betacaroteno Usando Suco de Caju Como Fonte de Carbono**. 2010. 41f. Monografia. (Bacharel Engenharia Química). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

PIRES, J.C.M. ALVIM-FERRAZ, M. C. M. MARTINS, F. G. SIMÕES, M. **Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: engineering aspects and biorefinery concept**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 16, p. 3043 – 3053, 2012.

RAVEN, J. A. GIORDANO, M. BEARDALL, J. **CO₂ Concentrating Mechanisms in Algae: Mechanisms, Environmental Modulation, and Evolution.** Annu. Ver. Plant. Biol. v. 56, p. 99-131, 2005.

RUSSO, D. A. M. T. **Estudo do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* numa água residual tratada, sob diferentes condições de fotoperíodo e temperatura.** 2011. 111f. Dissertação. (Mestrado em Energia e Bioenergia) – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

SATYANARAYANA, K. G.; MARIANO, A. B.; VARGAS, J.V.C. **A review on microalgae, a versatile source for sustainable energy and materials.** International Journal of Energy Research, [s.i], p.1-21, 2010.

SCHMITZ, R., MAGRO, C. D., COLLA, L. M. **Aplicações Ambientais de Microalgas.** Revista CIATEC - UPF. vol.4 (1), p.p.48-60, 2012.

SOARES, A. H. TORBEY, A. I. PASSOS, F. B. MONTEIRO, L. P. C. **Técnicas de crescimento da microalga *Dunaliella salina* para produção de biodiesel e separação de óleo e biomassa produzidos no processo.** Engevista, V. 13, n. 2. p. 102-110, 2011.

SOARES, D. **Avaliação do crescimento celular e da produtividade de lipídeos de microalgas marinhas em diferentes regimes de cultivo.** 2010. 107f. Dissertação. (Mestrado Ciências – Bioquímica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SUH, I. S., LEE, C. G., **Photobioreactor Engineering: Design and Performance.** Biotechnology and Bioprocess Engineering, v. 8, p. 313-321, 2003.

SUTHERLAND, D.L., HOWARD-WILLIAMS, C., TURNBULL, M.H., BROADY, P.A., CRAGGS, R.J. **Enhancing microalgal photosynthesis and productivity in wastewater treatment Technology(no prelo). high rate algal ponds for biofuel production.** Bioresource, No 184, 222-229, 2015.

TOMASELLI, L. **The microalgal cell.** In: RICHMOND, A. (ed.). **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology.** Oxford: Blackwell Science, 2004. p. 3-19.

XU, LING, WEATHERS J. PAMELA, XIONG, XUE-RONG, LIU CHUN-ZHAO. Review: **Microalgal bioreactors: Challenges and opportunities.** Eng. Life Science, Vol 9, No 3, 178-189, 2009.

YAN, R. ZHU, D. ZHANG, Z. ZENG, Q. CHU, J. **Carbon metabolism and energy conversion of *Synechococcus* sp. PCC 7942 under mixotrophic conditions: comparison with photoautotrophic condition.** J Appl Phycol, v. 24, p.657–668, 2011.

9. ANEXOS

Anexo 01a – Médias dos números de células para cada mL de solução (0 a 5000 mg.L⁻¹ de NaCl).

| Tempo (dias) | Controle | 1000 mg.L ⁻¹ | 2000 mg.L ⁻¹ | 3000 mg.L ⁻¹ | 4000 mg.L ⁻¹ | 5000 mg.L ⁻¹ |
|--------------|----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0 | 6,92.10 ⁴ | 6,92.10 ⁴ | 6,92.10 ⁴ | 6,92.10 ⁴ | 6,92.10 ⁴ | 6,92.10 ⁴ |
| 1 | 8,17.10 ⁴ | 9,50.10 ⁴ | 6,42.10 ⁴ | 9,83.10 ⁴ | 7,58.10 ⁴ | 3,58.10 ⁴ |
| 2 | 9,50.10 ⁴ | 5,42.10 ⁵ | 9,67.10 ⁵ | 7,67.10 ⁵ | 9,58.10 ⁴ | 9,67.10 ⁴ |
| 3 | 4,53.10 ⁵ | 4,00.10 ⁵ | 9,33.10 ⁵ | 1,94.10 ⁶ | 1,06.10 ⁶ | 1,88.10 ⁵ |
| 4 | 2,50.10 ⁶ | 1,40.10 ⁶ | 1,34.10 ⁶ | 1,30.10 ⁶ | 1,99.10 ⁶ | 8,08.10 ⁵ |
| 5 | 3,29.10 ⁶ | 1,53.10 ⁶ | 1,38.10 ⁶ | 1,14.10 ⁶ | 1,65.10 ⁶ | 1,39.10 ⁶ |
| 6 | 4,48.10 ⁶ | 2,79.10 ⁶ | 2,20.10 ⁶ | 1,55.10 ⁶ | 2,02.10 ⁶ | 1,62.10 ⁶ |
| 7 | 5,50.10 ⁶ | 2,32.10 ⁶ | 3,25.10 ⁶ | 3,29.10 ⁶ | 3,63.10 ⁶ | 1,90.10 ⁶ |
| 8 | 1,58.10 ⁷ | 2,82.10 ⁶ | 3,93.10 ⁶ | 2,45.10 ⁶ | 4,29.10 ⁶ | 3,32.10 ⁶ |
| 9 | 1,35.10 ⁷ | 3,23.10 ⁶ | 4,78.10 ⁶ | 3,28.10 ⁶ | 5,11.10 ⁶ | 3,33.10 ⁶ |
| 10 | 2,78.10 ⁷ | 5,03.10 ⁶ | 5,65.10 ⁶ | 4,58.10 ⁶ | 6,03.10 ⁶ | 4,49.10 ⁶ |
| 11 | 2,68.10 ⁷ | 7,02.10 ⁶ | 5,83.10 ⁶ | 4,95.10 ⁶ | 9,03.10 ⁶ | 4,90.10 ⁶ |
| 12 | 2,84.10 ⁷ | 6,36.10 ⁶ | 4,95.10 ⁶ | 3,30.10 ⁶ | 4,23.10 ⁶ | 4,89.10 ⁶ |
| 13 | 2,83.10 ⁷ | 9,56.10 ⁶ | 6,03.10 ⁶ | 5,55.10 ⁶ | 6,55.10 ⁶ | 5,42.10 ⁶ |
| 14 | 3,03.10 ⁷ | 1,05.10 ⁷ | 9,82.10 ⁶ | 1,03.10 ⁷ | 9,28.10 ⁶ | 5,19.10 ⁶ |
| 15 | 5,39.10 ⁷ | 1,01.10 ⁷ | 1,09.10 ⁷ | 1,01.10 ⁷ | 9,09.10 ⁶ | 5,99.10 ⁶ |
| 16 | 5,05.10 ⁷ | 8,45.10 ⁶ | 9,43.10 ⁶ | 8,16.10 ⁶ | 8,07.10 ⁶ | 4,88.10 ⁶ |
| 17 | 4,45.10 ⁷ | 8,08.10 ⁶ | 7,48.10 ⁶ | 7,03.10 ⁶ | 7,87.10 ⁶ | 5,07.10 ⁶ |

Anexo 01b – Médias dos números de células para cada mL de solução (6000 a 10000 mg.L⁻¹ de NaCl).

| Tempo (dias) | 6000 mg.L ⁻¹ | 7000 mg.L ⁻¹ | 8000 mg.L ⁻¹ | 9000 mg.L ⁻¹ | 10000 mg.L ⁻¹ |
|--------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 0 | 6,92.10 ⁴ | 6,92.10 ⁴ | 6,92.10 ⁴ | 6,92.10 ⁴ | 6,92.10 ⁴ |
| 1 | 9,42.10 ⁴ | 2,02.10 ⁵ | 1,46.10 ⁵ | 1,36.10 ⁵ | 1,59.10 ⁵ |
| 2 | 2,49.10 ⁵ | 2,54.10 ⁵ | 1,66.10 ⁵ | 1,82.10 ⁵ | 2,34.10 ⁵ |
| 3 | 4,59.10 ⁵ | 6,53.10 ⁵ | 8,33.10 ⁵ | 1,58.10 ⁵ | 1,23.10 ⁶ |
| 4 | 2,15.10 ⁶ | 1,20.10 ⁶ | 1,46.10 ⁶ | 4,67.10 ⁵ | 2,09.10 ⁶ |
| 5 | 2,58.10 ⁶ | 2,10.10 ⁶ | 1,97.10 ⁶ | 6,50.10 ⁵ | 2,73.10 ⁶ |
| 6 | 3,85.10 ⁶ | 2,72.10 ⁶ | 2,23.10 ⁶ | 1,07.10 ⁶ | 3,08.10 ⁶ |
| 7 | 5,10.10 ⁶ | 3,13.10 ⁶ | 2,87.10 ⁶ | 1,72.10 ⁶ | 4,21.10 ⁶ |
| 8 | 5,35.10 ⁶ | 3,28.10 ⁶ | 5,03.10 ⁶ | 2,67.10 ⁶ | 5,59.10 ⁶ |
| 9 | 8,93.10 ⁶ | 3,68.10 ⁶ | 7,22.10 ⁶ | 3,35.10 ⁶ | 4,26.10 ⁶ |
| 10 | 4,92.10 ⁶ | 2,55.10 ⁶ | 2,74.10 ⁶ | 3,41.10 ⁶ | 5,49.10 ⁶ |
| 11 | 1,03.10 ⁷ | 2,88.10 ⁶ | 8,52.10 ⁶ | 5,82.10 ⁶ | 4,37.10 ⁶ |
| 12 | 1,05.10 ⁷ | 3,15.10 ⁶ | 7,67.10 ⁶ | 6,20.10 ⁶ | 4,88.10 ⁶ |
| 13 | 5,38.10 ⁶ | 2,59.10 ⁶ | 5,75.10 ⁶ | 5,38.10 ⁶ | 4,44.10 ⁶ |

| | | | | | |
|----|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 14 | 5,15.10 ⁶ | 5,45.10 ⁶ | 4,43.10 ⁶ | 4,47.10 ⁶ | 3,75.10 ⁶ |
| 15 | 3,26.10 ⁶ | 4,00.10 ⁶ | 4,51.10 ⁶ | 4,52.10 ⁶ | 4,14.10 ⁶ |
| 16 | 5,17.10 ⁶ | 3,94.10 ⁶ | 6,13.10 ⁶ | 6,62.10 ⁶ | 8,23.10 ⁶ |
| 17 | 3,33.10 ⁶ | 2,71.10 ⁶ | 8,65.10 ⁶ | 6,47.10 ⁶ | 3,49.10 ⁶ |

Anexo 02a – Médias dos números de células para cada mL de solução (0 a 5000 mg.L⁻¹ de MgCl₂).

| Tempo (dias) | Controle | 1000 mg.L ⁻¹ | 2000 mg.L ⁻¹ | 3000 mg.L ⁻¹ | 4000 mg.L ⁻¹ | 5000 mg.L ⁻¹ |
|--------------|----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0 | 6,92.10 ⁴ | 6,92.10 ⁴ | 6,92.10 ⁴ | 6,92.10 ⁴ | 6,92.10 ⁴ | 6,92.10 ⁴ |
| 1 | 8,17.10 ⁴ | 2,11.10 ⁵ | 1,78.10 ⁵ | 1,66.10 ⁵ | 2,05.10 ⁵ | 2,16.10 ⁵ |
| 2 | 9,50.10 ⁴ | 5,75.10 ⁵ | 9,08.10 ⁵ | 7,08.10 ⁵ | 2,15.10 ⁶ | 1,87.10 ⁶ |
| 3 | 4,53.10 ⁵ | 8,33.10 ⁵ | 1,58.10 ⁶ | 1,66.10 ⁶ | 2,35.10 ⁶ | 2,02.10 ⁶ |
| 4 | 2,50.10 ⁶ | 1,33.10 ⁶ | 3,00.10 ⁶ | 2,04.10 ⁶ | 2,98.10 ⁶ | 3,27.10 ⁶ |
| 5 | 3,29.10 ⁶ | 1,70.10 ⁶ | 5,37.10 ⁶ | 4,56.10 ⁶ | 5,18.10 ⁶ | 3,64.10 ⁶ |
| 6 | 4,48.10 ⁶ | 3,03.10 ⁶ | 6,60.10 ⁶ | 6,41.10 ⁶ | 8,28.10 ⁶ | 4,43.10 ⁶ |
| 7 | 5,50.10 ⁶ | 5,82.10 ⁶ | 5,40.10 ⁶ | 8,27.10 ⁶ | 1,17.10 ⁷ | 7,88.10 ⁶ |
| 8 | 1,58.10 ⁷ | 4,67.10 ⁶ | 5,67.10 ⁶ | 1,00.10 ⁷ | 1,59.10 ⁷ | 5,28.10 ⁶ |
| 9 | 1,35.10 ⁷ | 5,78.10 ⁶ | 6,44.10 ⁶ | 8,27.10 ⁶ | 1,30.10 ⁷ | 6,48.10 ⁶ |
| 10 | 2,78.10 ⁷ | 6,28.10 ⁶ | 7,11.10 ⁶ | 8,34.10 ⁶ | 1,27.10 ⁷ | 6,51.10 ⁶ |
| 11 | 2,68.10 ⁷ | 6,33.10 ⁶ | 9,43.10 ⁶ | 8,13.10 ⁶ | 1,23.10 ⁷ | 7,55.10 ⁶ |
| 12 | 2,84.10 ⁷ | 6,43.10 ⁶ | 7,89.10 ⁶ | 8,00.10 ⁶ | 1,14.10 ⁷ | 6,33.10 ⁶ |
| 13 | 2,83.10 ⁷ | 1,12.10 ⁷ | 1,55.10 ⁷ | 8,03.10 ⁶ | 9,73.10 ⁶ | 6,04.10 ⁶ |
| 14 | 3,03.10 ⁷ | 7,74.10 ⁶ | 1,06.10 ⁷ | 7,77.10 ⁶ | 9,53.10 ⁶ | 6,18.10 ⁶ |
| 15 | 5,39.10 ⁷ | 7,31.10 ⁶ | 9,90.10 ⁶ | 8,03.10 ⁶ | 9,48.10 ⁶ | 6,08.10 ⁶ |
| 16 | 5,05.10 ⁷ | 7,15.10 ⁶ | 9,88.10 ⁶ | 7,99.10 ⁶ | 9,70.10 ⁶ | 6,08.10 ⁶ |
| 17 | 4,45.10 ⁷ | 7,07.10 ⁶ | 9,57.10 ⁶ | 8,28.10 ⁶ | 9,65.10 ⁶ | 6,03.10 ⁶ |

Anexo 02b – Médias dos números de células para cada mL de solução (6000 a 10000 mg.L⁻¹ de MgCl₂)

| Tempo (dias) | 6000 mg.L ⁻¹ | 7000 mg.L ⁻¹ | 8000 mg.L ⁻¹ | 9000 mg.L ⁻¹ | 10000 mg.L ⁻¹ |
|--------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 0 | 6,92.10 ⁴ | 6,92.10 ⁴ | 6,92.10 ⁴ | 6,92.10 ⁴ | 6,92.10 ⁴ |
| 1 | 8,75.10 ⁴ | 1,21.10 ⁵ | 8,33.10 ⁴ | 1,44.10 ⁵ | 1,03.10 ⁵ |
| 2 | 1,12.10 ⁵ | 1,94.10 ⁵ | 1,08.10 ⁵ | 1,88.10 ⁵ | 1,46.10 ⁵ |
| 3 | 1,33.10 ⁵ | 2,28.10 ⁵ | 2,18.10 ⁵ | 2,22.10 ⁵ | 1,78.10 ⁵ |
| 4 | 2,09.10 ⁵ | 2,88.10 ⁵ | 8,17.10 ⁴ | 3,90.10 ⁵ | 3,82.10 ⁵ |
| 5 | 3,37.10 ⁵ | 3,37.10 ⁵ | 2,73.10 ⁵ | 4,18.10 ⁵ | 4,45.10 ⁵ |
| 6 | 4,50.10 ⁵ | 4,50.10 ⁵ | 2,90.10 ⁵ | 4,42.10 ⁵ | 9,00.10 ⁵ |
| 7 | 1,21.10 ⁶ | 4,86.10 ⁵ | 3,61.10 ⁶ | 1,06.10 ⁶ | 8,08.10 ⁵ |
| 8 | 2,23.10 ⁶ | 2,03.10 ⁶ | 4,10.10 ⁶ | 1,43.10 ⁶ | 1,22.10 ⁶ |
| 9 | 2,34.10 ⁶ | 2,38.10 ⁶ | 4,58.10 ⁶ | 1,78.10 ⁶ | 1,48.10 ⁶ |
| 10 | 2,76.10 ⁶ | 3,58.10 ⁶ | 4,95.10 ⁶ | 2,17.10 ⁶ | 2,43.10 ⁶ |

| | | | | | |
|----|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 11 | 3,11.10 ⁶ | 4,50.10 ⁶ | 7,08.10 ⁶ | 2,98.10 ⁶ | 2,66.10 ⁶ |
| 12 | 3,64.10 ⁶ | 5,46.10 ⁶ | 8,42.10 ⁶ | 3,55.10 ⁶ | 3,42.10 ⁶ |
| 13 | 3,69.10 ⁶ | 5,92.10 ⁶ | 9,67.10 ⁶ | 8,75.10 ⁶ | 5,63.10 ⁶ |
| 14 | 2,61.10 ⁶ | 6,58.10 ⁶ | 1,04.10 ⁷ | 9,67.10 ⁶ | 7,29.10 ⁶ |
| 15 | 2,40.10 ⁶ | 6,08.10 ⁶ | 1,05.10 ⁷ | 1,07.10 ⁷ | 1,10.10 ⁷ |
| 16 | 2,10.10 ⁶ | 5,59.10 ⁶ | 1,04.10 ⁷ | 1,04.10 ⁷ | 1,04.10 ⁷ |
| 17 | 2,30.10 ⁶ | 5,17.10 ⁶ | 1,07.10 ⁷ | 8,98.10 ⁶ | 8,96.10 ⁶ |

Anexo 03a – Leitura do pH ao longo do tempo de cultivo (0 a 5000 mg.L⁻¹ de NaCl).

| Tempo (dias) | Controle | 1000 mg.L⁻¹ | 2000 mg.L⁻¹ | 3000 mg.L⁻¹ | 4000 mg.L⁻¹ | 5000 mg.L⁻¹ |
|---------------------|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 0 | 9,02 | 9,52 | 9,07 | 10,05 | 9,80 | 8,79 |
| 1 | 9,39 | 9,44 | 9,03 | 10,23 | 9,79 | 8,57 |
| 2 | 9,31 | 9,52 | 9,15 | 10,68 | 9,76 | 8,51 |
| 3 | 9,00 | 9,56 | 9,21 | 10,26 | 9,91 | 8,37 |
| 4 | 8,98 | 9,91 | 9,25 | 8,63 | 8,16 | 8,44 |
| 5 | 8,84 | 10,00 | 9,71 | 9,03 | 8,84 | 8,26 |
| 6 | 8,82 | 10,02 | 9,91 | 9,15 | 8,92 | 8,40 |
| 7 | 8,50 | 9,87 | 9,97 | 9,18 | 8,74 | 8,76 |
| 8 | 8,54 | 9,70 | 9,95 | 8,46 | 8,53 | 7,70 |
| 9 | 9,03 | 9,80 | 8,48 | 8,54 | 7,61 | 7,89 |
| 10 | 10,79 | 8,46 | 8,4 | 8,46 | 7,84 | 8,27 |
| 11 | 11,36 | 8,59 | 9,12 | 8,02 | 8,24 | 8,82 |
| 12 | 10,93 | 8,02 | 9,18 | 8,52 | 8,43 | 8,73 |
| 13 | 10,16 | 8,15 | 9,22 | 8,64 | 8,56 | 8,83 |
| 14 | 9,51 | 8,18 | 9,28 | 8,71 | 8,59 | 8,37 |
| 15 | 9,46 | 8,22 | 9,34 | 8,62 | 9,08 | 8,30 |
| 16 | 9,37 | 8,27 | 9,26 | 8,67 | 8,77 | 8,26 |
| 17 | 9,21 | 8,27 | 9,30 | 8,70 | 8,62 | 8,84 |

Anexo 03b – Leitura do pH ao longo do tempo de cultivo (6000 a 10000 mg.L⁻¹ de NaCl).

| Tempo (dias) | 6000 mg.L⁻¹ | 7000 mg.L⁻¹ | 8000 mg.L⁻¹ | 9000 mg.L⁻¹ | 10000 mg.L⁻¹ |
|---------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 0 | 9,56 | 8,35 | 8,34 | 8,29 | 8,39 |
| 1 | 9,50 | 8,36 | 8,30 | 8,24 | 8,37 |
| 2 | 8,63 | 8,34 | 8,23 | 8,21 | 8,23 |
| 3 | 8,55 | 8,36 | 7,11 | 8,18 | 7,93 |
| 4 | 8,49 | 8,49 | 7,43 | 8,23 | 8,03 |
| 5 | 8,58 | 8,53 | 7,97 | 8,59 | 8,45 |
| 6 | 8,62 | 8,58 | 8,46 | 8,43 | 8,76 |

| | | | | | |
|----|------|------|------|------|------|
| 7 | 8,80 | 8,60 | 8,45 | 8,62 | 9,09 |
| 8 | 8,83 | 8,61 | 8,44 | 7,89 | 8,78 |
| 9 | 8,87 | 8,64 | 8,55 | 7,92 | 8,14 |
| 10 | 9,51 | 9,16 | 7,7 | 9,2 | 8,05 |
| 11 | 9,80 | 9,35 | 8,10 | 8,46 | 8,30 |
| 12 | 8,13 | 9,43 | 8,10 | 8,51 | 8,34 |
| 13 | 7,29 | 9,59 | 8,10 | 7,08 | 8,35 |
| 14 | 8,29 | 8,40 | 8,09 | 6,60 | 7,93 |
| 15 | 7,32 | 9,32 | 8,43 | 8,32 | 8,49 |
| 16 | 7,52 | 9,32 | 8,51 | 8,43 | 8,53 |
| 17 | 7,09 | 7,28 | 7,95 | 7,37 | 7,91 |

Anexo 04a – Leitura do pH ao longo do tempo de cultivo (0 a 5000 mg.L⁻¹ de MgCl₂).

| Tempo (dias) | Controle | 1000 mg.L ⁻¹ | 2000 mg.L ⁻¹ | 3000 mg.L ⁻¹ | 4000 mg.L ⁻¹ | 5000 mg.L ⁻¹ |
|--------------|----------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 0 | 9,02 | 8,51 | 8,34 | 9,07 | 9,40 | 8,52 |
| 1 | 9,39 | 8,22 | 8,31 | 9,12 | 9,42 | 8,48 |
| 2 | 9,31 | 8,29 | 8,36 | 10,08 | 9,84 | 8,34 |
| 3 | 9,00 | 8,41 | 7,46 | 10,04 | 9,81 | 8,76 |
| 4 | 8,98 | 8,51 | 8,58 | 9,85 | 9,02 | 7,95 |
| 5 | 8,84 | 7,47 | 8,73 | 9,68 | 8,82 | 8,66 |
| 6 | 8,82 | 7,51 | 8,74 | 9,69 | 8,85 | 8,67 |
| 7 | 8,50 | 7,55 | 8,88 | 9,41 | 8,78 | 8,73 |
| 8 | 8,54 | 7,57 | 9,43 | 8,62 | 8,50 | 9,16 |
| 9 | 9,03 | 8,10 | 8,79 | 8,58 | 8,13 | 8,71 |
| 10 | 10,79 | 10,08 | 7,66 | 8,5 | 8,39 | 8,72 |
| 11 | 11,36 | 6,66 | 9,03 | 8,80 | 8,04 | 9,97 |
| 12 | 10,93 | 8,99 | 9,17 | 8,52 | 7,91 | 7,82 |
| 13 | 10,16 | 9,00 | 9,21 | 8,54 | 8,00 | 7,85 |
| 14 | 9,51 | 8,84 | 9,09 | 8,68 | 7,94 | 8,00 |
| 15 | 9,46 | 8,79 | 8,97 | 8,66 | 7,90 | 8,16 |
| 16 | 9,37 | 8,72 | 8,91 | 8,71 | 7,92 | 8,20 |
| 17 | 9,21 | 8,67 | 8,94 | 8,63 | 7,95 | 8,19 |

Anexo 04b – Leitura do pH ao longo do tempo de cultivo (6000 a 10000 mg.L⁻¹ de MgCl₂).

| Tempo (dias) | 6000 mg.L ⁻¹ | 7000 mg.L ⁻¹ | 8000 mg.L ⁻¹ | 9000 mg.L ⁻¹ | 10000 mg.L ⁻¹ |
|--------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 0 | 8,11 | 8,04 | 8,14 | 8,23 | 8,01 |
| 1 | 8,13 | 8,02 | 8,11 | 8,20 | 7,99 |
| 2 | 8,11 | 8,05 | 8,11 | 8,20 | 8,01 |
| 3 | 8,15 | 8,09 | 8,13 | 8,22 | 8,03 |

| | | | | | |
|----|------|------|------|------|------|
| 4 | 8,32 | 8,39 | 8,23 | 8,40 | 8,25 |
| 5 | 8,37 | 8,44 | 8,27 | 8,63 | 8,28 |
| 6 | 8,05 | 9,38 | 7,84 | 9,00 | 8,25 |
| 7 | 9,42 | 9,18 | 7,60 | 7,52 | 8,29 |
| 8 | 9,20 | 9,29 | 8,49 | 7,89 | 8,34 |
| 9 | 8,33 | 9,04 | 7,97 | 9,16 | 8,55 |
| 10 | 8,96 | 8,73 | 8,02 | 8,62 | 8,65 |
| 11 | 8,62 | 8,79 | 8,02 | 8,76 | 8,69 |
| 12 | 8,65 | 8,80 | 8,06 | 8,82 | 8,73 |
| 13 | 8,77 | 8,56 | 8,54 | 7,17 | 8,79 |
| 14 | 9,43 | 8,80 | 8,56 | 8,26 | 8,57 |
| 15 | 9,13 | 8,92 | 8,54 | 8,32 | 8,43 |
| 16 | 8,57 | 8,59 | 9,55 | 8,45 | 8,44 |
| 17 | 8,57 | 8,61 | 9,29 | 8,53 | 8,66 |