

Estudo bioenergético do cultivo de *Spirulina platensis* utilizando uréia como fonte de nitrogênio. Resultados preliminares

Carlos Eduardo Nascimento Sassano¹, João Carlos Monteiro de Carvalho¹, Attilio Converti², Luiz Antonio Gioielli¹, Sunao Sato¹, Paolo Torre², Iracema de Oliveira Moraes³

RESUMO

Neste trabalho são apresentados e comparados os resultados experimentais de ensaios de crescimento da cianobacteria *Spirulina platensis*, conduzidos utilizando alternativamente uréia ou nitrato de potássio como fontes de nitrogênio. A adição da uréia foi executada de forma descontínua, alimentada com fluxo exponencialmente crescente, com vista a minimizar fenômenos de inibição evidenciados em trabalhos anteriores. Os resultados obtidos variando a massa total de uréia alimentada por litro, de reator entre 275 e 725 mg têm sido usados em seguida para conduzir um estudo bioenergético sobre seu crescimento.

INTRODUÇÃO

O gênero *Spirulina* é representado por algas azuis-esverdeadas fotoautótrofas, pluricelula-

res, coloniais, de morfologia espiralada e filamentosa, presentes em habitat aquoso de elevada salinidade. A tendência atual é considerá-lo pertencente ao reino Monera, classe Cyanophyceae, família Oscillatoriaceae (1). Apresenta-se constituída de filamentos móveis de 1 a 12 micrômetros de diâmetro, com células cilíndricas providas de tricomas helicoidais sem ramificação. A *Spirulina* pode crescer rapidamente em lagos mornos, rasos e salobros. É um dos microrganismos (microalgas) mais comuns e abundantes em muitos lagos alcalinos na África e América (2).

A ultraestrutura e morfologia de *Spirulina platensis* são significativamente afetadas pelas condições ambientais e por fatores nutricionais. A temperatura influencia o tamanho das células e a ocorrência de diferentes organelas. O aumento da intensidade luminosa causa um aumento na concentração de vesículas de gás, no tamanho do tricoma, e um decréscimo nos ficobilossomos.

UNITERMOS: *Spirulina platensis*, Parâmetros bioenergéticos, Produção de microalgas.

1 - Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica - FCF - Universidade de São Paulo - Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bl. 16, 05508-900 - São Paulo - SP (jcmdcarv@usp.br)

2 - Dipartimento di Ingegneria Chimica e di Processo - Università di Genova - via Opera Pia 15, 16145 - Gênova - Itália (converti@unige.it)

3 - Departamento de Bioprocessos - Universidade de Guarulhos - Praça Teresa Cristina, 1 - Guarulhos - SP

A parede celular de *Spirulina platensis* consiste de quatro camadas de peptídeo-glicano (3) e tem uma espessura total de 60 nm.

O gênero *Spirulina* tem sido usado como alimento humano desde os tempos remotos em certas regiões do México e África (2, 4). Estudos nutricionais demonstraram ser um dos microorganismos de maior teor protéico já encontrado, possuindo elevado valor nutricional, boa digestibilidade e todos os aminoácidos essenciais em proporções recomendadas pela FAO, com exceção da metionina (5, 6).

Numerosos fatores influenciam o crescimento do gênero *Spirulina*, entre os quais as fontes de carbono e nitrogênio. Quanto a fonte de nitrogênio, *Spirulina* não fixa N_2 , exceto *Spirulina labyrinthiformis*, que é uma espécie termofílica, sendo com isto, obrigatória a suplementação deste nutriente no meio de cultivo (4). Segundo Boussiba, a uréia como fonte de nitrogênio pode servir como ótima fonte para o crescimento de microalgas verde-azuladas (7). O mesmo autor verificou que *Spirulina platensis* pode crescer perfeitamente em duas fontes de nitrogênio, nitrato e amônia, dando preferência para o segundo. Em *Spirulina platensis* a deficiência de nitrogênio pode afetar o crescimento (8), influenciar a composição dos em ácidos graxos (9), aumentar o conteúdo em lipídeos (10) e levar a um decréscimo na produção de ficocianina e clorofila, com consequente perda de suas características de cor verde azulada (11). A uréia, que apresenta menor custo, tem mostrado ser a mais efetiva fonte de nitrogênio para a produção de biomassa, bem como para a produção do ácido graxo g-linolênico (10). *Spirulina* cresce satisfatoriamente em meios pouco concentrados de uréia enquanto que

adições acima de 300-500 mg/L demonstraram-se fortemente inibitórias (12, 13).

Quanto ao tipo de processo, Chen e Zhang mostraram que o processo descontínuo alimentado possibilita o alcance de concentração celular e produção de ficocianinas 5,1 e 2,8 vezes maiores que o por batelada (14). A alimentação exponencialmente crescente utilizada neste estudo é recomendada para culturas em que se pode ter uma inibição do crescimento microbiano exercida pelo nutriente (uréia no caso investigado), pois as maiores taxas de alimentação de nutrientes ocorrem nos instantes finais, correspondentes a maiores concentrações celulares. Dessa forma, obteve-se com uréia como fonte de nitrogênio, produção de *Spirulina platensis* em concentrações equivalentes àquelas obtidas em meio com nitrato de potássio (~1200 mg/L) (13).

Os resultados de ensaios conduzidos variando a massa total alimentada da fonte de nitrogênio (uréia) têm sido usados neste trabalho para conduzir, pela primeira vez, para *Spirulina platensis*, um estudo bioenergético sobre seu crescimento.

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo

A cepa *Spirulina platensis*, proveniente do Laboratório de Microbiologia Zootécnica da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga, foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr Rogério Lacaz Ruiz.

Para a manutenção da cultura foi utilizado o meio mineral de Paoletti et al. (15), cuja composição consta na **Tabela 1**. O repique da cepa era executado

Solução principal (g/L)	
NaCl	0,92
Na ₂ SO ₄	1,88
Na ₂ HPO ₄	0,50
Na ₂ CO ₃	8,89
NaHCO ₃	15,15
CaCl ₂ ·H ₂ O	0,05
KNO ₃	2,57
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,57
solução de Fe-EDTA	1,0 ml
solução de microelementos	1,0 ml
Solução de Fe EDTA (mg/L)	
EDTA·Na ₂	29,8
FeSO ₄ ·7H ₂ O	24,9
Solução de microelementos (mg/L)	
SnCl ₂ ·2H ₂ O	304
MnCl ₂ ·4H ₂ O	173
CoCl ₂ ·6H ₂ O	194
SeCl ₂ ·6H ₂ O	146
BaCl ₂ ·2H ₂ O	183
LiCl	293
CuSO ₄ ·5H ₂ O	186
FeSO ₄ ·7H ₂ O	704
NiSO ₄ ·6H ₂ O	717
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	121

TABELA 1 - Meio mineral de Paoletti et al. (15) utilizado para a manutenção de *Spirulina platensis*.

asépticamente em câmara de fluxo laminar. Após o repique, os frascos de Erlenmeyer eram colocados em shakers (100 rpm) a 30°C, em presença de uma intensidade luminosa de 6,0 klux.

O inóculo era preparado filtrando a suspensão de *Spirulina* em crescimento exponencial e ressuspendendo-a em meio isento de nitrato. A concentração inicial (em massa seca) utilizada era 50 mg/l e o volume da suspensão de inóculo não excedia 10% do volume útil dos mini-tanques.

A quantidade de uréia total a ser adicionada durante os cultivos foi inicialmente aquela sugerida por Cezare (13) (40 mg/L). Após estes testes preliminares, se optou pelo aumento da quantidade total de uréia adicionada por volume de meio (80 mg/L), levando-se em conta que o tanque era aberto, facilitando-se assim a evaporação de amônia do meio para o ambiente.

Equipamento e condições de fermentação

Dentre os vários sistemas de algacultura descritos na literatura (16-18), foram adotados mini-

tanques de forma alongada (**Figura 1**), construídos de lâminas de PVC. A movimentação da cultura foi executada por pás rotativas na frequência de 23 rotações por minuto.

A temperatura do meio em fermentação foi mantida ao valor ótimo de 25°C (19) por aquecimento com auxílio de resistências e controlada por meio de termostatos. O tanque de cultivo era colocado numa sala com temperatura controlada (17°C) para um melhor controle da temperatura interna (do meio) e externa (temperatura ambiente). A luminosidade de 6,0 klux foi obtida por meio de lâmpadas fluorescentes de 40 W.

Técnicas analíticas

Diariamente, uma amostra de 10 ml de meio de cultivo era coletada e homogeneizada mecanicamente por agitador magnético. O material era então transferido para cubetas e analisado em espectrofotômetro a 560 nm, utilizando como branco água destilada. Para determinação da concentração celular foi usada a relação entre a concentração, em matéria seca, e a transmitância.

A intensidade luminosa foi medida através de um fotômetro Minolta Mod. TL1 (Japão).

O consumo de carbono total durante as fermentações foi determinado através de um método químico em que a fonte de carbono era convertida para carbonato mediante adição de hidró-



Figura 1 - Fotografia dos mini-tanques utilizados para a realização dos experimentos.

xido de sódio, assegurando que o pH do meio permanecesse no mínimo em 13, daí fazendo uma titulação com ácido clorídrico.

Para a determinação da concentração de amônia livre, amostras do meio de fermentação, previamente filtradas através de membranas com poros de 10 mm de diâmetro e alcalinizadas com hidróxido de sódio até pH 13, eram sujeitas à leitura da concentração de amônia livre mediante um eletrodo seletivo para amônia, utilizando um medidor de íons e pH Orion, modelo 710A. Para determinar as relações entre potencial elétrico e concentração de amônia, se usavam curvas de calibração diárias, com cinco soluções de cloreto de amônio 1.0 M em diferentes concentrações, alcalinizadas quando da execução da técnica.

Para a determinação da concentração de amônia total, realizou-se a hidrólise completa da uréia com ácido sulfúrico num bloco digestor em que eram colocados tubos com amostras do meio de cultivo. Após cerca de 10 h, a solução era colocada em tubos de ensaio para se medir a quantidade de amônia total, com o mesmo procedimento da amônia livre. Por diferença, e sabendo-se que na decomposição de 1,0 mol de uréia formam-se 2,0 moles de amônio, conseguiu-se determinar a quantidade de uréia residual ao longo do processo fermentativo.

O valor do pH do meio de cultura foi medido diariamente, com um potenciômetro Analyser, pH ION, modelo 400.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A curva tracejada da Figura 2 refere-se à média dos resultados experimentais de quatro ensaios padrão de crescimento descontínuo da

microalga *Spirulina platensis*, conduzidos empregando KNO_3 como fonte de nitrogênio. As outras curvas referem-se, ao contrário, a ensaios em que a quantidade desejada da fonte de nitrogênio, variável entre 275 e 725 mg por litro de reator, era alimentada com frequência diária durante 12 dias, utilizando uma solução de uréia suficientemente concentrada de modo a implicar uma variação desprezível do volume de reação.

A fonte de nitrogênio foi alimentada através de fluxo exponencialmente crescente de acordo com a equação (13):

$$m_a = m_o \exp(kt) \quad (1)$$

onde m_a e m_o indicam a massa de uréia alimentada por volume unitário de reator e aquela inicial (80 mg/L), t_i o tempo de alimentação (d) e k a constante de tempo (d^{-1}).

Os resultados cinéticos desses ensaios são mostrados na **Tabela 2** em termos de velocidade média de produção da biomassa, referida à metade da duração da fermentação $(DX/Dt)_{t/2}$. Pode-se observar um claro efeito de limitação devida a fonte de nitrogênio para $m_{at} < 500$ mg/L e uma inibição acima deste patamar. Como esperado, em virtude de se trabalhar com adição exponencialmente crescente da

m_{at} (mg/L)	$(\Delta X/\Delta T)_{t/2}$ (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	$(\Delta X/\Delta T)_t$ (mg L ⁻¹ d ⁻¹)
275	97	76
500	109	75
725	87	67

TABELA 2 - Velocidades médias de produção de *S. platensis* obtidas variando a quantidade total de uréia alimentada (m_{at}). $t_f = 12$ d.

fonte de nitrogênio, os efeitos de carência tendem a desaparecer no final da fermentação $(\Delta X/\Delta t)_t$. Quanto aos efeitos de inibição, estes tendem a permanecer até o final da fermentação para o maior valor de m_{at} estudado.

Sendo desprezível a variação de volume nas condições de operação utilizadas, pode-se razoavelmente considerar a modelagem do processo como aquela do processo descontínuo. As variações das condições de alimentação podem, portanto, ser consideradas responsáveis por mudanças na composição do meio de cultivo e, conseqüentemente, na velocidade específica de crescimento. Por isto o estudo bioenergético a seguir, basear-se-á sobre os efeitos que diversas condições de alimentação exercem sobre este parâmetro.

Os dados experimentais apresentados na **Figura 2** foram utilizados para calcular a velocidade específica de crescimento celular, de acordo com a equação:

$$\mu = \frac{1}{t_i - t_{i-1}} \ln \frac{X_i}{X_{i-1}} \quad (2)$$

que vale notoriamente para o processo descontínuo. Os valores de μ têm sido usados em seguida para a estimativa da energia de Gibbs necessária para o crescimento celular, $1/Y_{GX}$, mediante o método termodinâmico apresentado por Heijnen (20), que baseia-se na equação:

$$\frac{1}{Y_{GX}} = \frac{1}{Y_{GX}^{max}} + \frac{m_G}{\mu} \quad (3)$$

onde m_G representa a velocidade específica de dissipação da energia de Gibbs para a manutenção celular e $1/Y_{GX}^{max}$ o valor limite que $1/Y_{GX}$ assumiria para $\mu \rightarrow \infty$.

De acordo com este autor, a Equação (3), que contém um termo de crescimento e um de

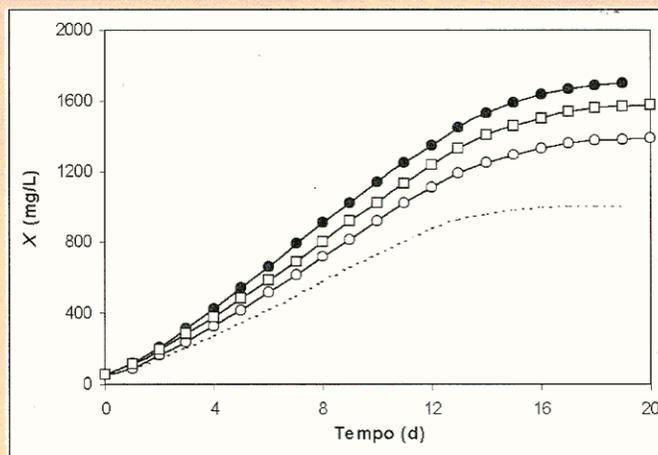


Figura 2 - Comportamento da concentração celular em função do tempo de cultivo. $t_H = 12$ d. m_{at} (mg/L): (□) 275; (●) 500; (○) 725. (- - -) Ensaio padrão com KNO_3 .

dissipação da energia de Gibbs, vale para uma grande variedade de sistemas de crescimento microbiano (heterótrofos, autótrofos, aeróbicos, anaeróbicos, etc.) e num amplo intervalo de temperatura. Nesta equação m_G depende somente da temperatura, de acordo com a relação empírica:

$$m_G = 4,5 \exp \left[- \frac{E^*}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T^*} \right) \right] \quad (4)$$

onde $E^* = 69.000$ J/mol, $T^* = 298,16$ K e $R = 8,314$ J mol⁻¹ K⁻¹. A 25°C, calcula-se para o sistema considerado $m_G = 4,5$ kJ C-mol_X⁻¹ h⁻¹. Como m_G é independente do sistema microbiano utilizado, é razoável deduzir que o metabolismo aeróbico difere do fotossintético, do ponto de vista bioenergético, pelo fato de a energia de Gibbs provir no primeiro caso da oxidação da fonte de carbono enquanto no segundo da absorção da luz.

O mesmo Heijnen tem recentemente proposto, seja para o metabolismo heterótrofo quanto para o autótrofo sem transporte inverso de elétrons (RET), uma correlação empírica que possibilita calcular $1/Y_{GX}^{max}$ em função do tipo de fonte de carbono usada e, em particu-

lar, de seu grau de redução (γ_s) e do número de átomos de carbono por molécula (n_c) (20):

$$1/Y_{GX}^{\max} = 200 + 18(6-n_c)^{1.8} + \exp[(3,8-\gamma_s)^{0,32}(3,6+0,4n_c)] \quad (5)$$

Mediante esta relação, pode-se estimar para o caso considerado, em que o dióxido de carbono seja utilizado como fonte de carbono ($\gamma_s = 0$; $n_c = 1$), uma dissipação de energia de Gibbs para o crescimento de 986 kJ/C-mol_X.

Combinando as equações anteriores e os dados experimentais da concentração celular (X), foi possível estudar o andamento de Y_{GX} em função do tempo para os diversos ensaios de crescimento (Figura 3). Pode-se notar, a este propósito, que o rendimento de biomassa produzida por unidade de energia de Gibbs dissipada decresce em função do tempo, ou seja, com o empobrecimento do meio de cultivo. Os valores de Y_{GX} estimados são notavelmente inferiores aos de qualquer crescimento heterótrofo (cerca de 4 C-mmol_X/kJ) (20), de acordo com as maiores necessidades energéticas para o crescimento autótrofo a partir de CO₂ como fonte de carbono, devido a envolvimento de um maior número de vias anabólicas.

Um confronto entre as diversas curvas de crescimento evidencia as maiores diferenças bioenergéticas exatamente na fase final, durante a qual a cultura que usava KNO₃ como fonte de nitrogênio mantinha uma velocidade de crescimento menor. Como no final do cultivo a elevada concentração celular pode levar a menor suprimento energético líquido, em particular nas camadas mais inferiores do reator, a utilização de KNO₃ seria dificultada pois envolve gasto energético para sua redução à amônia. Isto não acontece quando do uso da

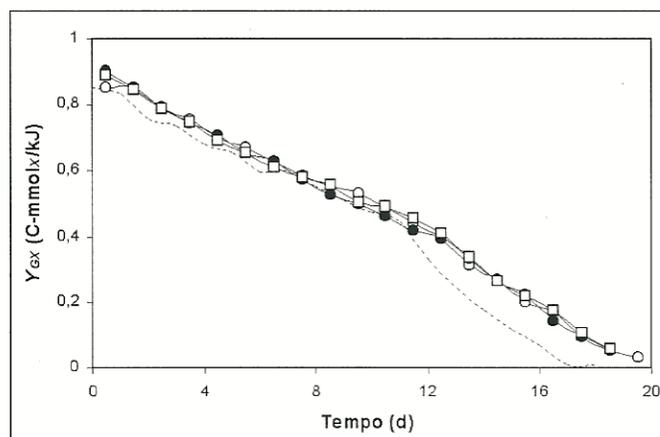


Figura 3 - Rendimento de biomassa produzida por unidade de energia de Gibbs dissipada em função do tempo. $t_{fi} = 12$ d. m_{at} (mg/L): (□) 275; (●) 500; (○) 725. (---) Ensaio padrão com KNO₃.

uréia, pois esta é espontaneamente hidrolisada a NH₃ em pH básico. Portanto, isto explicaria o melhor comportamento bioenergético do sistema no final do cultivo, quando se usa uréia, como fonte de nitrogênio (Figura 3).

Confrontando estes comportamentos com aqueles da Figura 2, temos a obrigação de ressaltar como este parâmetro, embora de grande utilidade na caracterização bioenergética de um sistema biológico, forneça escassas indicações metabólicas, por ser capaz de evidenciar as diferenças de maior valor exatamente na fase final do crescimento.

CONCLUSÕES

Os resultados cinéticos de cultivos de *S. plautensis*, conduzidos adicionando uréia segundo o processo descontínuo alimentado com fluxo exponencialmente crescente, foram usados para estimar os parâmetros bioenergéticos deste sistema microbiano. A variação da massa total de uréia alimentada por litro de reator em 12 dias

($275 < m_{at} < 725$ mg) tem evidenciado um claro efeito de limitação devida à fonte de nitrogênio para $m_{at} < 500$ mg/L e uma inibição acima deste patamar. Como esperado, em virtude de se trabalhar com adição exponencialmente crescente

da fonte de nitrogênio, os efeitos de sua carência tendem a desaparecer no final da fermentação. Quanto aos efeitos de inibição, estes tendem a permanecer até o final da fermentação para o maior valor de m_{at} estudado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1994), Vol. 31, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD, USA
2. Richmond A. (1983) Phototrophic microalgae. In: Rehm H.-J. and Reed G., eds., *Biotechnology*, Dellweg (volume ed.) Vol. 3, Verlag Chemie, Weinheim, Alemanha, pp. 109-143.
3. Sonntag N.O.V. (1979) Structure and composition of fats and oils. In: Swern D., ed., *Baileys Industrial Oil and Fat Products*. 4th ed., New York: Wiley-Interscience, v. 1, p. 1-98.
4. Ciferri O, Tiboni O. (1985) The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. *Microbiol. (Italy)* 39, 503-526.
5. Balloni W., Tomaselli L., Giovannetti L., Margheri M.C. (1980) Biologia fondamentale del genere *Spirulina*. In: *Atti del Convegno Prospettive della coltura di Spirulina in Italia*. Firenze.
6. Durand-Chastel H. (1980) Production and use of *Spirulina* in Mexico. Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands, p. 851.
7. Boussiba B. (1989) Ammonia uptake in the alkalophilic cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Plant Cell Physiol.* 30, 303-308.
8. Piorreck M., Baasch K.L., Pohl P. (1984) Biomass production, total protein, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes. *Phytochemistry* 23, 207-213.
9. Funteu F., Guet C., Wu B., Trémolières A. (1997) Effects of environmental factors on the lipid metabolism in *Spirulina platensis*. *Plant Physiol. Biochem.* 35, 63-71.
10. Mahajan G., Kamat M. (1995) g-Linolenic acid production from *Spirulina platensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 466-469.
11. Pirt S.J., Walach M.R., Bazin M.J. (1987) Computer control of carbon-nitrogen ratio in *Spirulina platensis*. *Biotechnol. Bioeng.* 24, 520-528.
12. Faintuch B.L. (1989) Análise comparativa da produção de biomassa a partir de três cianobactérias empregando distintas fontes nitrogenadas, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo.
13. Cezare E.A. (1998) Contribuição ao estudo da produção de biomassa de *Spirulina platensis* empregando uréia como fonte de nitrogênio por meio de processo descontínuo alimentado, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, São Paulo.
14. Chen F., Zhang Y. (1997) High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. *Enzyme Microb. Technol.* 20, 221-224.
15. Paoletti C., Pushparaj B., Tomaselli, L. (1975) Ricerche sulla nutrizione minerale di *Spirulina platensis*. In: *Atti del 17° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia*, Padova.
16. Kosaric N., Nguyen H.T., Bergougnon M.A. (1974) Growth of *Spirulina maxima* algae in effluents from secondary waste-water treatment plants. *Biotechnol. Bioeng.* 26, 881-896.
17. Balloni W., Materassi, R., Pelosi E., Pushparaj B., Florenzano G., Stengel E., Soeder C.J. (1981) Comparison of two different culture devices for mass production of microalgae at Firenze (Italy) and Dortmund (Germany). I. Yields of *Scenedesmus obliquus* and *Coelastrum sphaericum* at Firenze. *Arch. Hydrobiol. Suppl. Stuttgart* 60, 324-331.
18. Balloni W., Florenzano G., Marerassi R., Tredici M., Soeder C., Wagener K. (1983) Mass culture of algae for energy farming in coastal deserts. In: Strub A., Charrier, P. and Schleser G., eds., *Energy from Biomass*, Applied Science Publishes, London.
19. Lynch D.V., Thompson G.A. (1984) Microsomal phospholipid molecular species alternation during low temperatures acclimation in *Dunaliella*. *Plant Physiol.* 74, 193-197.
20. Heijnen J.J. (2001) Stoichiometry and kinetics of microbial growth from a thermodynamic perspective. In: Ratledge C. and Kristiansen B., eds., *Basic Biotechnology*, 2nd ed., Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 45-58.