



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS**  
**MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**DÁGON MANOEL RIBEIRO**

**ESTUDO SOBRE CULTIVOS E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE  
MICROALGAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
AMBIENTAL**

**DOURADOS - MS**  
**FEVEREIRO/2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS**  
**MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL**

**DÁGON MANOEL RIBEIRO**

**ESTUDO SOBRE CULTIVOS E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DE  
MICROALGAS**

**Orientador: Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca**

Dissertação de mestrado submetida ao programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Ambiental, como um dos requisitos necessários para a obtenção do título de mestre em Ciência e Tecnologia na área de concentração em Ciência Ambiental.

**DOURADOS - MS**  
**FEVEREIRO/2016**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

R484e	Ribeiro, Dágon Manoel. Estudo sobre cultivos e aplicações biotecnológicas de microalgas. / Dágon Manoel Ribeiro. – Dourados, MS : UFGD, 2016. 58f.  Orientador: Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados.  1. . 2. . 3. . 4. . I. Título.
-------	--

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.**

**©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.**




MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

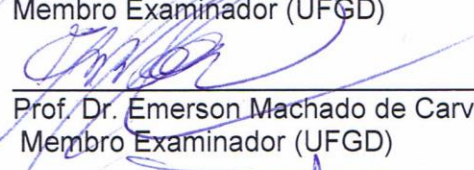
---

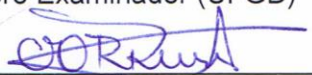
### Termo de Aprovação

Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: “**Estudo sobre cultivos e aplicações biotecnológicas de microalgas**”, de autoria de **Dágon Manoel Ribeiro**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca  
Presidente da banca examinadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Roberta Damiani  
Membro Examinador (UFGD)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Emerson Machado de Carvalho  
Membro Examinador (UFGD)

  
\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia Regina Russo  
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 22 de fevereiro de 2016.

“Existe uma única estrada e somente uma, e essa é a estrada que eu amo. Eu a escolhi. Quando trilho nessa estrada as esperanças brotam, e, o sorriso se abre em meu rosto. Dessa estrada nunca, jamais fugirei.”

**Daisaku Ikeda**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Ao Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca, pela orientação, confiança e oportunidade de desenvolver este trabalho.

Aos meus familiares, minha mãe Vera que sempre me apoiou, meu irmão Thiago que sempre foi um exemplo e que sempre me incentivou, meu avô Oscar que sempre me acordava e me apoiava, pessoas que me ajudaram durante todos esses anos e com isso fez com que eu conseguisse ter a minha formação e também em memória a minha avó Henriqueta, onde grande parte das minhas características eu devo a ela.

Aos companheiros de laboratório, pela ajuda, companheirismo e amizade desfrutada nos dias e noites de trabalho, acompanhados sempre de muitas risadas e brincadeiras que me ajudaram muito durante esta caminhada. A pós-graduação já valeu pelas amizades que conquistei.

Aos professores e técnicos que sempre me apoiaram, professores que fizeram de tudo e mais um pouco para que eu aprendesse algo e me desenvolver tornando um profissional ainda mais qualificado.

Ao CNPQ, CAPES e FUNDECT pelo apoio financeiro.

A UFGD pela formação profissional proporcionada.

A minha grande organização que pertencço, a BSGI, onde todos os dias me ensina a me tornar um grande valor para a sociedade, a todos os membros da organização, ao Taiyo Ongakutai e ao meu grande mestre da vida, Daisaku Ikeda.

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.1.</b> Principais nutrientes no cultivo de microalgas.....	7
<b>Tabela 1.2.</b> Principais sistemas de cultivo de microalgas e suas vantagens e desvantagens.....	8
<b>Tabela 2.1.</b> Parâmetros cinéticos obtidos nos diferentes cultivos. ....	16
<b>Tabela 3.1.</b> Parâmetros cinéticos das diferentes microalgas.....	22
<b>Tabela 3.2.</b> Umidade e teor de lipídios presente na biomassa das microalgas após 49 dias de cultivo.....	22
<b>Tabela 3.3.</b> Perfil de ácidos graxos dos óleos da biomassa das diferentes de microalgas.....	24
<b>Tabela 4.1.</b> Descrição dos diferentes tipos de tratamentos.....	30
<b>Tabela 4.2.</b> Porcentagem de sobrevivência dos peixes.....	33
<b>Tabela 4.3.</b> Análises microbiológicas.....	34
<b>Tabela 5.1.</b> Parâmetros cinéticos dos cultivos.....	40
<b>Tabela 5.2.</b> Germinação e massa seca das sementes.....	41

## Lista de Figuras

<b>Figura 2.1.</b> Cinética da microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> nos diferentes meios e fotoperíodos.....	15
<b>Figura 3.1.</b> Cinéticas de crescimento de <i>Chlorella</i> sp., <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> , <i>Coelastrum</i> sp., <i>Coelastrum sphaericum</i> , <i>Scenedesmus spinosus</i> e <i>Scenedesmus acuminatus</i> em tanques raceway durante 49 dias .....	21
<b>Figura 4.1.</b> (A) Acompanhamento do peso dos peixes nos diferentes tratamentos, (B) Acompanhamento do comprimento dos peixes nos diferentes tratamentos.....	31
<b>Figura 4.2.</b> (A) Medida final e inicial o Oxigênio dissolvido nos diferentes tratamentos, (B) Medida final e inicial do nitrito nos diferentes tratamentos.....	32
<b>Figura 5.1.</b> Cinética de crescimento da <i>Chlorella sorokiniana</i> em diferentes meios de cultura.....	39
<b>Figura 5.2.</b> Cinética de germinação das sementes de alface.....	40



## Resumo

Neste trabalho foram desenvolvidos estudos relacionados a cultivos e aplicações biotecnológicas de microalgas que foram divididas em quatro diferentes estratégias iniciando com uma introdução geral sobre o tema da dissertação. A primeira estratégia iniciada no segundo capítulo teve como objetivo realizar cultivos de *Chlorella sorokiniana* em diferentes meios descritos na literatura onde concluiu-se que o cultivo com o meio Bold Basal no fotoperíodo de 24 h/ 0 h foi o que obteve maior densidade óptica de 1,5<sub>670nm</sub> e a melhor taxa de crescimento específico ( $\mu_{\max}$ ) de 0,23 dia<sup>-1</sup>. No capítulo seguinte o objetivo foi a caracterização de lipídios e ácidos graxos de diferentes microalgas cultivadas em tanque abertos onde foi observado que a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* obteve maior taxa de crescimento específico ( $\mu_{\max}$ ) de 0,12 dia<sup>-1</sup> com uma quantidade de 19,74% de lipídios totais em sua composição e na caracterização dos ácidos graxos foi observado que ácido palmítico foi que teve maior quantidade em todas as microalgas testadas e foram detectadas conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados (C21 e C25) nas microalgas dos gênero *Scenedesmus* que possuem aplicações especiais como alimento funcional. Nos dois últimos capítulos os estudo foram direcionados em aplicações biotecnológicas na área animal e vegetal, o terceiro capítulo teve como objetivo o estudo da aplicação de microalgas em tanques de Tilápia do Nilo sem renovação da água, onde foi relatado que os peixes que foram tratados com ração e aeração e ração, microalgas e aeração foram os que obtiveram as melhores taxas de crescimento, porém devido a maior volume de matéria o tratamento com ração, microalgas e aeração teve a menor taxa de sobrevivência de 53%. No último capítulo foi realizado o estudo da influência/toxicidade dos efluentes dos cultivos de *Chlorella sorokiniana* na germinação de sementes de alface onde foi observado que não houve diferença significativa na germinação das sementes, mas houve um aumento da massa seca nos tratamentos com os efluentes dos cultivos, não foi observado toxicidade em nenhum dos tratamentos testados.

**Palavras-chave:** Cinética, aplicações tecnológicas e biodiversidade

## Abstract

In this work was developed studies related to growing and biotechnological applications of microalgae that have been divided into four different strategies, starting with a general introduction on the topic of the dissertation. The first strategy initiated in the second chapter aimed to grow *Chlorella sorokiniana* in different mediums described in the literature, where it was concluded that the cultivation with medium Bold Basal in photoperiod of 24 h/ 0 h had the highest optical density of 1,5<sub>670nm</sub> and the better specific growth rate ( $\mu_{max}$ ) 0.23 day<sup>-1</sup>. In the following chapter the objective is the characterization of lipids and fatty acids from different microalgae grown in open tank where it was observed that the microalgae *Pseudokirchmeriella subcapitata* has a higher specific growth rate ( $\mu_{max}$ ) of 0.12 day<sup>-1</sup> with a quantity of 19.74% of total lipids in its composition and characterization of fatty acids was observed that palmitic acid has had greater amount in all experiments tested and were detected content of polyunsaturated fatty acids (C21 and C25) in microalgae of the genus *Scenedesmus* which have special applications as functional food. In the last two chapters of the study they were targeted in biotechnological applications in animal and vegetal, the third chapter aimed to the study of microalgae application Nile Tilapia tanks without water renewal, where it was reported that the fish were treated with feed and aeration and feed, microalgae and aeration were the ones with the best growth rates, however due to the larger volume of organic material the treatment with feed, microalgae and aeration had the lower survival rate of 53%. In the last chapter was realized the study of the effect/toxicity of effluents from cultivation of *Chlorella sorokiniana* on germination of lettuce seed where it was observed that there was no significant difference in seed germination but there was an increase in dry matter in the treatments with the effluent of cultivations, toxicity was not observed in any of the treatments tested.

**Key-words:** Kinetics, technological applications and biodiversity

## Sumário

<b>1. Introdução Geral.....</b>	<b>9</b>
1.1. Microalgas .....	9
1.2. Cultivo de Microalgas .....	10
1.3. Aplicações Biotecnológicas .....	12
1.4. Objetivos .....	13
1.4.1. Objetivos Específicos .....	13
1.5. Referências .....	14
<b>2. Cultivo de Microalgas em Diferentes Meios de Cultivo e Fotoperíodos .....</b>	<b>16</b>
2.1. Introdução.....	16
2.2. Materiais e Métodos .....	17
2.3. Resultados e Discussão .....	18
2.4. Conclusão.....	19
2.5. Referências .....	20
<b>3. Caracterização de Lipídios e Ácidos Graxos de Diferentes Microalgas Cultivadas em Tanques Abertos .....</b>	<b>22</b>
3.1. Introdução.....	22
3.2. Materiais e Métodos .....	23
3.2.1. Microrganismo.....	23
3.2.2. Cultivo de microalgas em tanques abertos .....	23
3.2.3. Análise dos lipídios e ácidos graxos.....	23
3.3. Resultados e Discussão .....	24
3.4. Conclusão.....	29
3.5. Referências .....	29
<b>4. Crescimento e Sobrevivência de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) em Tanques sem Renovação de Água Suplementados com Ração, Aeração e Microalgas.....</b>	<b>31</b>
4.1. Introdução.....	31
4.2. Materiais e Métodos .....	32
4.3. Resultados e Discussão .....	33
4.4. Conclusão.....	36
4.5. Referências .....	37

<b>5. Reutilização do Efluente do Cultivo de <i>Chlorella sorokiniana</i> em Diferentes Meios de Cultura em Germinação de Sementes de Alface .....</b>	<b>38</b>
5.1. Introdução.....	38
5.2. Materiais e Métodos .....	39
5.2.1. Microalga.....	39
5.2.2. Germinação de Sementes.....	39
5.3. Resultados e Discussão .....	40
5.4. Conclusão .....	43
5.5. Referências .....	43
<b>6. Conclusão Geral .....</b>	<b>45</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>46</b>
Anexo A - Instruções para preparação de 1 Litro do Meio Bold Basal .....	46
Anexo B - Instruções para preparação de 1 Litro do Meio Nitrogenado .....	47
Anexo C - Instruções para preparação de 1 Litro do Meio NPK .....	47
Anexo D - Protocolo extração e quantificação de lipídios totais - Bligh Dyer.....	48
Anexo E - Protocolo para transesterificação de ácidos graxos – Método HCl/METANOL.....	50
Anexo F - Análises Microbiológicas: Contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbicos.....	51
Anexo G – Procedimento para contagem de colônias.....	52
Anexo H - Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos para determinação do Número Mais Provável (NMP) .....	54
Anexo I – Imagens relacionadas ao capítulo 2.....	55
Anexo J – Imagens relacionadas ao capítulo 3 .....	56
Anexo K – Imagens relacionadas ao capítulo 4 .....	57
Anexo L – Imagens relacionadas ao capítulo 5.....	58

# 1. Introdução Geral

## 1.1. Microalgas

As microalgas são organismos eucariotos e fotoautotróficos encontrados principalmente em ambientes aquáticos (Li et al., 2008, Kumar et al., 2010). As microalgas verdes possuem paredes com celulose contendo clorofilas *a* e *b* e estocam amido como as plantas o fazem (Tortora et al., 2005).

As microalgas são elos importantes em qualquer cadeia alimentar aquática devido à capacidade de fixar dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) da atmosfera em moléculas orgânicas, convertendo-as em carboidratos (Williams; Laurens, 2009) e liberando oxigênio como subproduto da fotossíntese. Os primeiros metros de profundidade de qualquer corpo de água contêm algas planctônicas e estima-se que 50 a 80% do oxigênio presente na Terra seja produzido por elas (Pulz; Gross, 2004, Tortora et al., 2005).

A fotossíntese é a principal via metabólica das microalgas, ocorrendo graças à presença da clorofila. A clorofila tem a capacidade de absorver a luz para oxidar a água, liberando assim o oxigênio e reduzindo o CO<sub>2</sub>, formando compostos carbonatados, *e. g.* moléculas de glicose, que são utilizadas para o crescimento da biomassa (Taiz et al., 2008).

A maior parte dos pigmentos servem como um complexo de antenas que coletam a luz, transferindo a energia luminosa para o complexo de centros de reações (Taiz et al., 2008; Stephenson et al., 2011). A energia luminosa é convertida em energia química por unidades funcionais chamadas fotossistemas (Taiz et al., 2008).

A utilização de microalgas em processos biotecnológicos possui vantagens como: (i) elevada absorção de CO<sub>2</sub>; (ii) crescimento rápido e exponencial comparado a plantas terrestres; (iii) alto teor de compostos de interesse, como lipídios, proteínas e carboidratos; (iv) capacidade de crescimento em águas salinas, salobras ou contaminadas por resíduos municipais ou agroindustriais; (v) necessidade de pouca área em relação às culturas tradicionais como milho e cana de açúcar, podendo-se aproveitar terras impróprias para a agricultura (Chisti, 2008; Waltz, 2009; Xu et al., 2011).

As principais pesquisas realizadas pelo Departamento Energético dos Estados Unidos (*National Alliance for Biofuels and Bioproducts* – NAABB) e demais pesquisadores na área de

microalgas objetivam: obtenção de novos microrganismos, compreensão da bioquímica para a produção de compostos de interesse, secreção de lipídios, sistemas de cultivo, inovações nos fotobiorreatores, recuperação da biomassa, conversão em bioprodutos e modelagem de um balanço energético/econômico (Malcata, 2011; Richardson; Johnson, 2015).

## 1.2. Cultivo de Microalgas

O desafio dos pesquisadores é produzir microalgas de forma economicamente viável e que possibilite as diversas aplicações estudadas. As microalgas representam uma alternativa para melhorar o ambiente em que vivemos, desde o tratamento de resíduos como no desenvolvimento de energias limpas (Villalobos; Scholz, 2013).

Além de encontrar a melhor microalga (geneticamente modificada ou não), é preciso utilizar-se um processo de cultivo que seja econômico e eficiente, e isso inclui o meio de cultura a ser utilizado (sintético ou residual), o tipo do biorreator (fechado, aberto, tubular, *flat-plate* ou tanques abertos), o sistema de homogeneização (aeração, pás, turbinas), se haverá alimentação por CO<sub>2</sub>, o tipo de luminosidade (ciclos luminosos, diferentes potências e diferentes comprimentos de ondas), e por fim, melhores formas de colheita da biomassa e processamento da biomassa. Desta forma é possível observar que existem diversas questões a serem respondidas.

A luminosidade pode ser um dos principais fatores limitantes principalmente nos cultivos em grande escala. A produtividade de biomassa das microalgas e a eficiência de conversão em compostos de interesse são altamente dependentes de luz (Branyikova et al. 2011; John et al., 2011). No entanto, a exposição prolongada à grandes intensidades luminosas pode gerar uma fotoinibição, que são danos causados ao Fotossistema II, inativando os transportadores de elétrons que geram inibição no crescimento das microalgas (Barber; Andersson, 1992; Taiz et al., 2008).

O meio de cultivo, por sua vez, é o responsável por fornecer os nutrientes básicos para o crescimento, sendo que diversos elementos químicos são utilizados em diferentes fases do desenvolvimento das microalgas (Dragone et al., 2011; Zeng et al., 2011). Existem diversas sugestões de meio de cultivo, podendo existir um meio de cultura ideal para cada aplicação. A Tabela 1.1 mostra a importância de alguns nutrientes.

**Tabela 1.1.** Principais nutrientes no cultivo de microalgas.

<b>Nutriente</b>	<b>Fontes principais</b>	<b>Função</b>	<b>Limitação</b>	<b>Concentração</b>
Carbono (C)	CO <sub>2</sub> , HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Suprir C para toda a célula, formação de carboidratos e ácidos graxos, reserva energética	Não há crescimento	1-10 g L <sup>-1</sup>
Nitrogênio (N)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , ureia, N <sub>2</sub>	Geração de aminoácidos e proteínas	Gera acúmulo de lipídios e diminuição da quantidade de proteína e clorofila <i>a</i>	10-2000 mg L <sup>-1</sup>
Fósforo (P)	Fosfatos, hidrofosfatos	Incorporado em uma variedade de compostos, incluindo açúcares fosfatos, fosfolipídios e nucleotídeos	Aumento da clorofila <i>a</i> e acúmulo de lipídios	10-500 mg L <sup>-1</sup>
Enxofre (S)	Sulfatos	Ligado ao transporte de elétrons por meio dos grupos ferro-enxofre e a várias enzimas e coenzimas, dá origem à cisteína e à metionina e pode ser precursor de acetil-CoA	Inibição do Fotossistema II especialmente em produtos primários da fotossíntese (NAPDH), aumento na produção de carotenóides	1-200 mg L <sup>-1</sup>
Sais inorgânicos	K, Ca, Na, Mg	Manter estrutura e atividade da célula		0,1-100 mg L <sup>-1</sup>
Elementos-traço	Fe, Zn, Mn, Pb, Cd	Agir como cofator de enzimas		0,01-10 mg L <sup>-1</sup>
Vitaminas	B, C, E	Auxiliar na divisão celular		0,01-1000 µg L <sup>-1</sup>

Fonte: Forján et al., 2007; Taiz et al., 2008; Zeng et al., 2011; El-Kassas, 2013.

**Tabela 1.2.** Principais sistemas de cultivo de microalgas e suas vantagens e desvantagens.

Sistema de Cultivo	Vantagens	Desvantagens
Tanques Abertos ( <i>Open Ponds</i> )	<ul style="list-style-type: none"><li>- Relativamente baixos investimentos e custo de operação</li><li>- Fácil de limpar e manter</li><li>- Baixo custo de operação</li><li>- Fácil de escalonamento</li><li>- Tecnologia comprovada em escala relativamente grande</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Baixa produtividade de biomassa</li><li>- Requer área relativamente grande</li><li>- Pobre de mistura, luz e utilização de CO<sub>2</sub></li><li>- Baixo grau de controle</li><li>- Perdas de água elevadas</li><li>- Elevada dependência do tempo (temperatura, chuva, etc.)</li><li>- As culturas são facilmente contaminadas</li><li>- Baixa eficiência de recuperação da biomassa</li><li>- Baixa homogeneização</li></ul>
Fotobiorreatores fechados (Tubular, <i>Flat-plate</i> , Coluna de bolhas e agitação mecânica)	<ul style="list-style-type: none"><li>- Boa absorção de luminosidade</li><li>- Alta produtividade de biomassa</li><li>- Baixo risco de contaminação</li><li>- Boa homogeneização</li><li>- Controle do processo</li><li>- Possibilidade de construção de estruturas horizontais</li><li>- Baixa perda de água</li><li>- Melhor uso de CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub></li><li>- Melhor controle dos parâmetros</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Alto custo de instalação</li><li>- Alto custo energético</li><li>- Difícil escalonamento</li><li>- Estresse hidrodinâmico</li><li>- Alto custo de operação</li></ul>

Fonte: Carvalho et al., 2006, Mata et al., 2010, Brennan; Owende 2010.

Os principais sistemas de cultivos são: (1) tanques abertos, podendo ser construídos em concreto, lonas ou materiais poliméricos, e (2) sistemas fechados, podendo ser de vidro, acrílico ou plástico, sendo que cada sistema tem suas vantagens e desvantagens, como podemos visualizar na Tabela 1.2.

### 1.3. Aplicações Biotecnológicas

A cada dia surgem novas possibilidades de aplicações das microalgas em processos biotecnológicos, sendo como organismos vivos para manutenção de pisciculturas, lagos e



biorremediação ou como biomassa seca ou úmida para a produção de bioprodutos, como ração, fármacos e biocombustíveis (Chisti, 2008; Mata et al., 2010).

Como exemplo de aplicação tem-se o cultivo de microalgas destinado para a produção de biocombustíveis, que apresenta diversas vantagens, como: (1) menor gasto de água, (2) maior eficiência fotossintética, (3) utilização de terras degradadas, (4) possibilidade de obtenção de CO<sub>2</sub> e nutrientes necessários para cultivo, especialmente nitrogênio e fósforo, a partir de efluentes líquidos industriais; (5) produção não sazonal; (6) capacidade de acúmulo de diferentes compostos de interesse que podem ser empregados na produção de diferentes biocombustíveis (biodiesel, gasolina, bioquerosene, etanol e biogás), (7) crescimento rápido, sendo que algumas espécies chegam a dobrar sua biomassa em 3,5 h na fase de crescimento exponencial (Chisti, 2008; Waltz, 2009; Xu, et al., 2011).

Uma energia renovável e com capacidade de fixação do CO<sub>2</sub> é desejável para poder desenvolver energeticamente todo o mundo em substituição aos biocombustíveis de primeira geração, produzidos através de milho, cana de açúcar e soja, que necessitam de terras produtivas, são de baixa eficiência fotossintética e poderiam ser utilizados como alimento (Patil; Tran; Giselrød, 2008).

No Brasil a produção de microalgas ainda é em pequena escala e as poucas empresas que existem não possuem uma produção que alcance todo o país. Mais especificamente no estado do Mato Grosso do Sul existem apenas estudos, porém não há empresas tampouco comércio nesta área, o que justifica a importância deste trabalho como incentivo para futuras aplicações comerciais no estado.

## **1.4. Objetivos**

O presente trabalho teve como objetivos desenvolver diferentes estudos relacionados à cultivos e aplicações biotecnológicas de microalgas.

### **1.4.1. Objetivos Específicos**

- ❖ Avaliar o crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana* CTT 7727 cultivada em diferentes meios descritos na literatura em dois diferentes fotoperíodos.
- ❖ Quantificar os lipídios e caracterizar os ácidos graxos de 6 linhagens de microalgas (*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Coelastrum sphaericum*, *Scenedesmus spinosus*,

*Coelastrum* sp., *Chlorella* sp. e *Scenedesmus acuminatus*) bioprospectadas na Região Centro-Oeste do Brasil e cultivadas em tanques abertos em condições ambientais.

- ❖ Avaliar o crescimento/desenvolvimento da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em seis tratamentos diferentes, tendo a combinação entre ração comercial, fornecimento de microalgas (*Chlorella sorokiniana*) e aeração da água em tanques sem renovação da água a fim de compreender a fisiologia dos peixes durante os primeiros estágios de crescimento.
- ❖ Avaliar a influência e/ou toxicidade das microalgas e da água residual dos cultivos de microalgas na germinação de sementes de alface.

## 1.5. Referências

BARBER J., ANDERSSON B.; Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis, **Trends in Biochemical Sciences** **17**, n. 2, p. 61–66, 1992.

Branyikova I., Marsalkova B., Doucha J., Branyik T., Bisova K., Zachleder V., Vitova M.; Microalgae - Novel Highly Efficient Starch Producers. **Biotechnology and Bioengineering** **108**, n. 4, 2011.

Brennan L., Owende P.; Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, **Renewable and Sustainable Energy Reviews** **14**, p. 557–577, 2010.

Carvalho A. P., Meireles L. A., Malcata F. X.; Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. **Biotechnology Progress** **22**, n. 6, 2006.

CHISTI Y.; Biodiesel from microalgae beats bioethanol, **Trends Biotechnology** **26**, n. 3, p. 126-31, 2008.

Dragone G., Fernandes B., Vicente A. A., Teixeira J. A.; Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. **Applied Energy** **88**, p. 3331-3335, 2011.

El-Kassas H. Y.; Growth and fatty acid profile of the marine microalga *Picochlorum* Sp. grown under nutrient stress conditions. **Egyptian Journal of Aquatic Research** **39**, p. 233–239, 2013.

Forján E., Garbayo I., Casal C., Vílchez C.; Enhancement of carotenoid production in *Nannochloropsis* by phosphate and sulphur limitation. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, Ed. A. Méndez-Vilas, 2007.

John R. P., Anisha G. S., Nampoothiri K. M., Pandey A.; Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology** **102**, 186–193, 2011.

Kumar A., Ergas S., Yuan X., Sahu A., Zhang Q., Dewulf J., Malcata F. X., Langenhove H. V.; Enhanced CO<sub>2</sub> fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. **Trends in Biotechnology** **28**, n. 7, p. 371–380, 2010.

- Li Y., Horsman M., Wu N., Lan C. Q., Dubois-Calero N.; Biofuels from Microalgae, **Biotechnology Progress** **24**, n. 4, 2008.
- Malcata F. X.; Microalgae and biofuels: A promising partnership?, **Trends in Biotechnology** **29**, n. 11, 2011.
- Mata T. M., Martins A. A., Caetano N. S.; Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** **14**, p. 217–232, 2010.
- PATIL V., TRAN K., GISELRØD H. R.; Towards Sustainable Production of Biofuels from Microalgae. **International Journal of Molecular Sciences**, p. 1188–1195, 2008.
- Pulz O., Gross W.; Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology Biotechnology** **65**, 635-648, 2004.
- RICHARDSON J. W., JOHNSON M. D.; Financial Feasibility analysis of NAABB developed technologies. **Algal Research** **10**, p. 16–24, 2015.
- STEPHENSON P.G., MOORE C.M., TERRY M.J., ZUBKOV M.V., BIBBY T.S.; Improving photosynthesis for algal biofuels: toward a green revolution. **Trends Biotechnology** **29**, n. 12, p. 615-23, dez. 2011.
- Taiz L., Zeiger E.; **Fisiologia vegetal**. 4° Edição, Porto Alegre, 2008.
- Tortora G. J., Funke B. R., Case C. L.; **Microbiologia**. 8° Edição, Porto Alegre, 2005.
- VILLALOBOS N., SCHOLZ C. Y.; Microalgas en estanques de tilapia y su potencial biotecnológico, ambiental e industrial, **Biocenosis** **27**, p. 50–56, 2013.
- WALTZ E.; Biotech's green gold?, **Nature Biotechnology** **27**, n. 1, p. 15-8, 2009.
- Williams P. J. B., Laurens L. M. L.; Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. **Energy & Environmental Science** **3**, p. 554–590, 2010.
- XU L., WIM BRILMAN D.W., WITHAG J. A., BREM G., KERSTEN S.; Assessment of a dry and a wet route for the production of biofuels from microalgae: energy balance analysis. **Bioresource Technology** **102**, n. 8, p. 5113-22, 2011.
- Zeng X., Danquah M. K., Chen X. D., Lu Y.; Microalgae bioengineering: from CO<sub>2</sub> fixation to biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** **15**, p. 3252– 3260, 2011.

## 2. Cultivo de Microalgas em Diferentes Meios de Cultivo e Fotoperíodos

### 2.1. Introdução

A deficiência energética e a dependência sobre combustíveis fósseis incentivam a prospecção de novas soluções no mercado de bioenergia. Obter uma solução sustentável e economicamente viável é o grande desafio dos pesquisadores. Diversas possibilidades estão sendo estudadas e entre elas estão as microalgas (Abbasi; Abbasi, 2010; Defanti et al., 2010). Avanços têm sido obtidos na produção de microalgas visando tanto a produção de biocombustíveis quanto a utilização em outros processos biotecnológicos (Stephenson et al., 2011; Richardson; Johnson, 2015).

O estudo do cultivo de microalgas é importante para incrementar o conhecimento da biologia das diferentes espécies, favorecendo a produção em ambientes controlados, no qual os meios de cultura oferecem nutrientes necessários para o crescimento ótimo de cada espécie. Entre os objetivos do cultivo de microalgas está a maximização da conversão da eficiência fotossintética para uma ótima produção de biomassa (McKim; Durford, 2006).

Vários são os fatores que podem influenciar o crescimento de microalgas e também o acúmulo de compostos de interesses, entre eles o inóculo (Converti et al., 2006), o modo de homogeneização (Ojo et al., 2014), a concentração de CO<sub>2</sub> (Zheng et al., 2011), a intensidade luminosa (Chen et al., 1996), a temperatura (Fakhry et al., 2015) além de diversos outros parâmetros, que para cada microalga existirão diferentes condições ótimas.

É possível manipular a composição bioquímica das microalgas através de suas condições de cultivo, mas o efeito pode variar de uma espécie para outra. Para algumas algas uma condição pode resultar em um acúmulo de certo composto e está mesma condição ser letal para outra espécie. Além disso existe carência no entendimento de como a microalga responde a cada meio de cultura (Brown et al., 1997).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana* CTT 7727 cultivada em diferentes meios descritos na literatura em dois fotoperíodos.

## 2.2. Materiais e Métodos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioengenharia (BIOENG) localizado na Faculdade de Engenharia (FAEN) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). A microalga utilizada nos experimentos foi a *Chlorella sorokiniana* CTT 7727 obtida da Fundação André Tosello.

Foram utilizados três diferentes meios de culturas já descritos na literatura para cultivo de microalgas. O meio Bold Basal que é um dos meios mais tradicionais da literatura descrito por Bischoff e Bold (1963), o meio nitrogenado descrito por Dragone et al. (2011) que possui uma quantidade maior de nitrogênio que tem como objetivo o favorecimento do acúmulo de amido e também o meio NPK, de baixo custo, preparado a partir de 1g do fertilizante químico N:P:K (20:5:20) diluído em 1L de água destilada, de acordo com Sipaúba-Tavares e Rocha (2003).

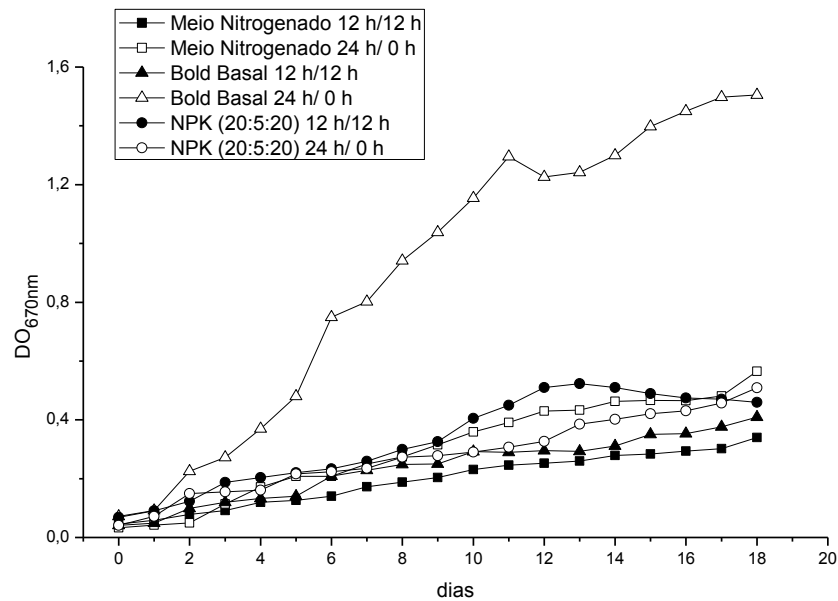
Os pré-inóculos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 ml com volume útil de 200 ml, com os três meios de culturas citados anteriormente. Após a esterilização foram mantidos em BOD equipada com agitador rotatório orbital e fotoperíodo (MA 415 Marconi) a  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$  a 200 rpm e 8 klux durante 7 dias. Ciclos de fotoperíodo de 12 h/12 h ou 24 h/ 0 h foram mantidos nas mesmas condições do cultivo principal. Os pré-inóculos são necessários para garantir a viabilidade das células e adaptação ao modo de cultivo.

Após 7 dias transferiram-se os volumes dos frascos cultivados para frascos Erlenmeyer de 6L com volume útil de 5L (considerando o volume do inóculo) mantidos a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  com aeração constante de  $1,125 \text{ L min}^{-1}$  realizada pelo compressor de ar (BigAir A420) a 8 klux em dois ciclos de fotoperíodo de 12 h/12 h ou 24 h/ 0 h durante 18 dias sendo testados em quadruplicata. Leituras de absorbâncias foram realizadas em leitora de microplacas (Biochrom modelo Anthos Zenyth 200rt) no comprimento de ondas de 670 nm a cada 24 h.

A fase exponencial de crescimento foi identificada pela região linear sobre  $\ln$  da absorbância ( $\text{ABS}_{670}$ ) em função do tempo de cultivo. A partir dos dados de absorbância calculou-se a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{max}}$ ) e o tempo de duplicação (DT).

### 2.3. Resultados e Discussão

A Figura 2.1 mostra o perfil cinético dos diferentes crescimentos ao longo dos 18 dias de cultivo. Podemos observar que o cultivo com Bold Basal com o fotoperíodo de 24 h/ 0 h foi o que apresentou melhor resultado no crescimento, chegando a uma densidade óptica de 1,50, enquanto o segundo melhor resultado foi de apenas 0,56 em densidade óptica, obtido com o meio nitrogenado descrito por Dragone et al. (2011) em fotoperíodo 24 h/ 0 h.



**Figura 2.1.** Cinética da microalga *Chlorella sorokiniana* nos diferentes meios e fotoperíodos.

Os três melhores resultados comparando a densidade óptica final foram os cultivos em fotoperíodo de 24 h/ 0 h, mostrando assim a resistência a fotoinibição, já que quando a luminosidade é excessiva pode inibir a fotossíntese, através de um estresse luminoso onde os transportadores de elétrons são inativados (Barber; Andersson, 1992).

Dentre as diferentes curvas de crescimento, o meio NPK possui um perfil de crescimento semelhante ao dos outros 4 cultivos e entre os cultivos de 12 h/12 h houve a maior taxa de crescimento específico ( $\mu_{max}$ ) com  $0,15 \text{ dia}^{-1}$  observada na **Tabela 2.1**.

**Tabela 2.1.** Parâmetros cinéticos obtidos nos diferentes cultivos.

MEIO	$\mu_{\max}$ (dia <sup>-1</sup> )	TD (dia)	R <sup>2</sup>
Meio Nitrogenado 12 h/12 h	0,1149	6,03	0,98
Meio Nitrogenado 24 h/ 0 h	0,1115	6,21	0,99
Bold Basal 12 h/12 h	0,1349	5,14	0,94
Bold Basal 24 h/ 0 h	0,2341	2,96	0,96
NPK (20:5:20) 12 h/12 h	0,1504	4,61	0,97
NPK (20:5:20) 24 h/ 0 h	0,0647	10,71	0,97

Sipaúba-Tavares et al. (2011) em um estudo comparando diferentes meios de cultivo também obteve a maior velocidade específica de crescimento e o menor tempo de duplicação utilizando o meio NPK em comparação com meios mais enriquecidos. Esse resultado indica que em condições de cultivo de 12 h/12 h o excesso de nutrientes pode se tornar inibitório, como no caso da amônia maior que 1 mg L<sup>-1</sup>, que causa inibição no crescimento da microalga (Sipaúba-Tavares; Pereira, 2009), o que condiz com o resultado obtido com o meio nitrogenado de Dragone et al. (2011) que possui uma carga maior de nitrogênio (ureia) e menor taxa de crescimento.

#### 2.4. Conclusão

De acordo com esse trabalho foi observado nas condições estudadas que a melhor opção para cultivo de microalgas é a utilização do meio Bold Basal com o fotoperíodo de 24 h/ 0 h, pois nestas condições a *Chlorella sorokiniana* obteve uma maior taxa de crescimento. Mais estudos são necessários principalmente para o entendimento do acúmulo dos diferentes compostos de interesse.

## 2.5. Referências

ABBASI T., ABBASI S.A.; Biomass energy and the environmental impacts associated with its production and utilization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** **14**, p. 919–937, 2010.

BARBER J., ANDERSSON, B.; Too much of a good thing: light can be bad for photosynthesis. **Trends in Biochemical Sciences** **17**, n. 2, p. 61–66, 1992.

Bischoff H.W., Bold H.C.; Phycological studies. IV. Some soil algae from enchanted rock and related algal species, **University of Texas Publications** **6318**, p 1-95, 1963.

Brown M.R., Jeffrey S.W., Volkman J.K., Dunstan G.A.; Nutritional properties of microalgae for mariculture, **Aquaculture** **151**, p. 315-331, 1997.

Chen F., Zhang Y, Guo S.; Growth and phycocyanin formation of *Spirulina platensis* in photoheterotrophic culture, **Biotechnology Letters** **18**, n. 5 p. 603-608, 1996.

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

Defanti L. S., Siqueira N. S., Linhares P. C.; Produção de biocombustíveis a partir de algas fotossintetizantes. **Revista de divulgação do Projeto Universidade Petrobras e Instituto Federal Fluminense** **1**, p. 11-21, 2010.

Dragone G., Fernandes B., Vicente A. A., Teixeira J. A.; Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. **Applied Energy** **88**, p. 3331-3335, 2011.

Fakhry E. M., Maghraby D. M. E.; Lipid accumulation in response to nitrogen limitation and variation of temperature in *Nannochloropsis salina*. **Botanical Studies**, p. 56-62, 2015.

McKIM S.M., DURNFORD D.G.; Translational regulation of light-harvesting complex expression during photoacclimation to high-light, **Plant Physiology and Biochemistry** **44**, p. 857-865, 2006.

OJO E.O., AUTA H., BAGANZ F., LYE G.J.; Engineering characterization of a shaken, single-use photobioreactor for early stage microalgae cultivation using *Chlorella sorokiniana*, **Bioresource Technology** **173**, p. 367–375, 2014.

RICHARDSON J. W., JOHNSON M. D.; Financial Feasibility analysis of NAABB developed technologies. **Algal Research** **10**, p. 16–24, 2015.

SIPAÚBA-TAVARES L. H, IBARRA L. C. C., FIORESI T. B.; Cultivo de *ankistrodesmus gracilis* (reisch) korsikov (chlorophyta) em laboratório utilizando meio CHU<sub>12</sub> e de macrófita com NPK, **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo 35, n. 1, p. 111 - 118, 2009.

SIPAÚBA-TAVARES L. H., MILLAN R. N., BERCHIELLI F. A., Braga F. M. S. B.; Use of alternative media and different types of recipients in a laboratory culture of *Ankistrodesmus*



*gracilis* (Reinsch) Korshikov (Chlorophyceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences** **33**, n. 3, p. 247-253, 2011.

SipaÚba-Tavares L.H., Rocha O.; **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. 2<sup>a</sup>. ed. São Carlos: Rima, 2003.

STEPHENSON P.G., MOORE C.M., TERRY M.J., ZUBKOV M.V., BIBBY T.S.; Improving photosynthesis for algal biofuels: toward a green revolution. **Trends Biotechnology** **29**, n. 12, p. 615-23, 2011.

ZHENG Y., CHEN Z., LU H., ZHANG W.; Optimization of carbon dioxide fixation and starch accumulation by *Tetraselmis subcordiformis* in a rectangular airlift photobioreactor, **African Journal of Biotechnology** **10**, p. 1888-1901, 2011.

### 3. Caracterização de Lipídios e Ácidos Graxos de Diferentes Microalgas Cultivadas em Tanques Abertos

#### 3.1. Introdução

As microalgas são microrganismos fotossintetizantes com grande capacidade de absorção de CO<sub>2</sub> para a transformação em energia e utilizando alguns nutrientes como potássio, fósforo e nitrogênio podem ser cultivadas em tanques abertos ou fotobiorreatores fechados (Tortora et. al., 2005, Chisti, 2007). Com essa capacidade de baixa necessidade de nutrientes podem ser cultivadas em diferentes resíduos agroindustriais, resíduos domésticos ou fertilizantes de baixo valor agregado (Sipaúba-Tavares; Rocha, 2003, Chisti, 2007, Dragone et al., 2010).

Existem diversas aplicações de microalgas na agroindústria e nas indústrias de fármacos e cosméticos, além de um grande potencial para a produção de biocombustíveis. Com a capacidade de acúmulo de lipídios nas microalgas, a produção de biodiesel se torna viável e por esta razão a otimização desse acúmulo torna-se importante (Yen et al., 2013). O cultivo de microalgas em tanques abertos é considerado a melhor alternativa para a produção de biomassa em larga escala devido a sua fácil construção, manutenção e operação (Park et al., 2011).

Além do acúmulo dos lipídios, a caracterização dos ácidos graxos saturados e insaturados formados é essencial para a determinação da qualidade do biodiesel. Esta informação pode ser utilizada para uma seleção mais precisa de uma espécie de microalga eficiente na produção do biodiesel (Nascimento et al., 2013). A análise dos ácidos graxos pode também caracterizar três atributos importantes das comunidades microbianas: biomassa microbiana viável, estrutura da comunidade e do estado nutricional/fisiológico (Piotrowska-Seget, 2003).

O objetivo deste trabalho foi quantificar os lipídios e caracterizar os ácidos graxos de 6 linhagens de microalgas (*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Coelastrum sphaericum*, *Scenedesmus spinosus*, *Coelastrum* sp., *Chlorella* sp. e *Scenedesmus acuminatus*) bioprospectadas na Região Centro-Oeste do Brasil e cultivadas em tanques abertos em condições ambientais.

## 3.2. Materiais e Métodos

### 3.2.1. Microrganismo

As linhagens analisadas foram *S. spinosus*, *Coelastrum* sp., *Chlorella* sp., *S. acuminatus* (Minillo et al., 2013) e *P. subcapitata* e *C. sphaericum*, todas isoladas na Região Centro-Oeste.

Para o pré-inóculos foi utilizado o meio CHU12 (Sipaúba-Tavares; Rocha, 2003, Minillo et al., 2013) em galões de 9 L, com o objetivo de se obter uma maior densidade celular para posterior inóculo nos tanques de 2000 L.

### 3.2.2. Cultivo de microalgas em tanques abertos

Após 60 dias do pré-inóculos realizou-se a transferência para os tanques de 2000L com adição do fertilizante químico N:P:K (20:5:20 g L<sup>-1</sup>), de acordo com SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA (2003). Nos tanques, as microalgas foram expostas a condições ambientais (luz solar, temperatura e chuva.) sem que houvesse controle desses parâmetros. A cada 7 dias amostras eram coletadas para a medição da absorvância ( $A_{600nm}$ ) para observar a variação da densidade óptica (DO) e monitorar a produção de biomassa, totalizando 49 dias de cultivo.

A fase exponencial de crescimento foi identificada pela região linear sobre ln da absorvância ( $ABS_{600}$ ) em função do tempo dos cultivos. A partir dos dados de absorvância calculou-se a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ) e o tempo de duplicação (DT).

### 3.2.3. Análise dos lipídios e ácidos graxos

Ao final do cultivo, a biomassa foi coletada dos tanques e realizada a análise da umidade por secagem em estufa de circulação a 70°C e em seguida direcionada para a quantificação de lipídios realizada pelo método a frio (Bligh; Dyer, 1959). Para a caracterização de ácidos graxos foi realizada a transesterificação pelo método HCl em metanol, no qual aos extratos de lipídios também extraídos pelo método a frio, foi adicionado 500 ml de HCl a 5% em metanol e a mistura foi incubado durante 2 h a 100 °C. Após a reação esperar chegar a temperatura ambiente e adicionar 1.25 mL de água destilada, os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) são extraídos com adição de 1,25 ml de hexano (Martins et al., 2012).

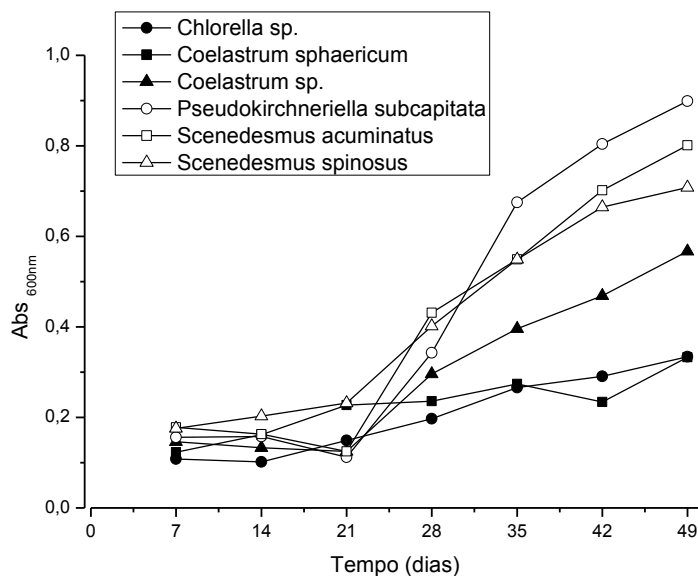
Posteriormente os FAMES foram determinados através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, sendo utilizado o cromatógrafo gasoso CG-EM (Agilent, model 7890A), equipado com coluna capilar HP-5MS de 30m x 0,25mm x 0,25µm e gás hélio

como gás de arraste na razão split 1:10. As determinações foram realizadas a 180°C e taxa de aquecimento de 10°C/min até 300°C. A temperatura do detector foi de 325°C e 300°C para o injetor, sendo a análise cromatográfica realizada em duplicata.

A identificação dos FAMES foi realizada por comparação do tempo de retenção dos constituintes da amostra com uma mistura constituída de 19 padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME Mix, Sigma-Aldrich) e por comparação com os espectros de massa da biblioteca NISTMS Search 2.0, presente no software do cromatógrafo. A quantificação foi efetuada em relação ao padrão interno, tricosanoato de metila (23:0) (Sigma-Aldrich) (Menegazzo et al., 2014).

### 3.3. Resultados e Discussão

A **Figura 3.1** mostra a cinética que durou 49 dias possibilitando observar crescimento das microalgas.



**Figura 3.1.** Cinéticas de crescimento de *Chlorella* sp., *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Coelastrum* sp., *Coelastrum sphaericum*, *Scenedesmus spinosus* e *Scenedesmus acuminatus* em tanques raceway durante 49 dias.

A taxa de crescimento em tanques abertos geralmente é menor em comparação com os cultivos em fotobiorreatores fechados (Mata et al., 2010). Para que o crescimento em tanques abertos seja otimizado é importante uma melhor homogeneização, principalmente quando o CO<sub>2</sub> é adicionado, o controle dos parâmetros do cultivo, como pH, luz e nutrientes, e a redução da contaminação (Park et al., 2011).

Avaliando os parâmetros cinéticos na Tabela 3.1 observamos que a microalga que obteve maior velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) e o menor tempo de duplicação (TD) foi a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* com os valores de 0,12 e 5,40 respectivamente. Em trabalhos com *Pseudokirchneriella subcapitata* cultivados em NPK, CARVALHO e colaboradores (2012) obtiveram uma taxa de crescimento exponencial de 0,11 a 0,13 dia<sup>-1</sup>, mostrando resultados satisfatórios na utilização destas microalgas.

**Tabela 3.1.** Parâmetros cinéticos das diferentes microalgas.

<b>Microalgas</b>	<b><math>\mu_{\max}</math> (dia<sup>-1</sup>)</b>	<b>TD (dia)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<i>Chlorella</i> sp.	0,045	15,40	0,99
<i>Coelastrum sphaericum</i>	0,028	24,76	0,98
<i>Coelastrum</i> sp.	0,030	22,88	0,98
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	0,128	5,40	0,98
<i>Scenedesmus acuminatus</i>	0,030	23,02	0,98
<i>Scenedesmus spinosus</i>	0,036	19,25	0,98

A Tabela 3.2 mostras que a porcentagem da umidade se manteve na faixa de 90,33 a 94,77% nas diferentes microalgas enquanto o conteúdo de lipídios atingiu os melhores resultados nas microalgas *Coelastrum sp.* e *Pseudokirchneriella subcapitata*, que apresentaram em média 20% do peso seco total.

**Tabela 3.2.** Umidade e conteúdo de lipídios presente na biomassa das microalgas após 49 dias de cultivo.

Microalgas	Umidade (%)	Lipídios (%)
<i>Chlorella</i> sp.	94,76 ± 0.2a	11,52 ± 0.8d
<i>Coelastrum sphaericum</i>	93,57 ± 0.1b	12,16 ± 0.4c
<i>Coelastrum</i> sp.	92,67 ± 0.1c	19,98 ± 1.4a
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	90,33 ± 0.1d	19,74 ± 0.2a
<i>Scenedesmus acuminatus</i>	94,54 ± 0.1a	9,77 ± 0.4d
<i>Scenedesmus spinosus</i>	94,66 ± 0.1a	15,31 ± 0.7b

A Tabela 3.3 apresenta a composição em ácidos graxos dos óleos obtidos ao final dos cultivos das biomassas das diferentes espécies de microalgas estudadas. Como visto na literatura, o ácido palmítico é o ácido graxo predominante na maioria dos extratos lipídios de microalgas (Nascimento et al., 2013).

O ácido graxo com maior acúmulo em todas as microalgas estudadas foi o ácido palmítico (C16). Segundo Kalpesh (2012) uma alta intensidade luminosa aumenta a síntese desse ácido, o que está relacionado à proteção das células. *Chlorella* sp. foi a microalga que obteve um maior acúmulo de ácido palmítico (69,71%), resultado similar ao relatado por Costa (2006), em que *C. vulgaris* foi cultivada em condições de alta temperatura (35°C) e alta intensidade luminosa (2,5 klux), chegando a acumular 68,39% de ácido palmítico.

Foi possível observar também que o gênero *Scenedesmus* apresenta um perfil diferente das demais espécies devido ao seu conteúdo maior de ácidos graxos poli-insaturados (C21 e C25), especialmente da série ômega, que apresentam uma série de aplicações especiais principalmente como alimento funcional, ajudando no desenvolvimento físico, fisiológico e mental do organismo humano (Martins et al., 2008) (Tabela 3.3).

**Tabela 3.3.** Composição em ácidos graxos dos óleos obtidos na biomassa das diferentes espécies de microalgas estudadas referentes ao primeiro ciclo.

Ácido graxo	<i>Chlorella</i> sp.	<i>Coelastrum sphaericum</i>	<i>Coelastrum</i> sp.	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	<i>Scenedesmus acuminatus</i>	<i>Scenedesmus spinosus</i>
Ácido Palmítico (C16)	69,71 ± 2,0a	59,95 ± 1,13b	61,4 ± 3,64b	61,46 ± 2,10b	60,06 ± 2,0b	60,80 ± 2,73b
Ácido Esteárico (C18)	26,10 ± 2,09a	22,82 ± 0,19a	21,83 ± 1,90a	14,36 ± 1,53b	21,89 ± 4,11a	23,53 ± 0,34a
Ácido Oleico (C18:1c)	4,19 ± 0,06c	17,23 ± 1,11ab	13,90 ± 6,22abc	24,16 ± 3,6a	10,06 ± 2,8bc	5,87 ± 2,35c
Ácido Araquidônico (C21)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2,84 ± 0,99a	1,63 ± 0,57a
Ácido Beénico (C22)	n.d.	n.d.	2,87 ± 0,67a	n.d.	5,15 ± 2,35a	3,10 ± 0,71a
Ácido Lignocérico (C25)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5,07 ± 2,48

n.d. não detectado

Os valores de ácidos graxos podem ser alterados devido ao seu acúmulo ou ao seu uso como fonte energética. Essas alterações ocorrem através de enzimas que agem na rota de  $\beta$ -oxidação, variando as cadeias de ácidos graxos em duas unidades de carbono, o que explica o porquê da maioria das vezes as cadeias de ácidos graxos serem pares (Voet et al., 2008; Taiz et al., 2008). Somente as microalgas *Scenedesmus acuminatus* e *Scenedesmus spinosus* mostraram ácidos graxos de cadeias ímpares, o que não é geralmente observado. Isso acontece em algumas plantas e organismos marinhos, pois o último ciclo da  $\beta$ -oxidação fornece o propionil-CoA que pode ser convertido em succinil-CoA, que entra no ciclo do ácido cítrico. Para essa reação acontecer é preciso o envolvimento de três enzimas: propionil-CoA-carboxilase, metilmalonil-CoA-racemase e metilmalonil-CoA-mutase (Voet et al., 2008). A questão é que para realizar essa transformação é necessária a coenzima B<sub>12</sub>, que não é encontrada em plantas, somente em bactérias (Voet et al., 2008; Taiz et al., 2008). A hipótese é que por ser um cultivo aberto, bactérias poderiam ter contaminado o tanque, disponibilizando essa coenzima no cultivo, o que teria possibilitando a geração de ácidos graxos de cadeias ímpares.

Os ácidos graxos têm um grande valor na determinação da filogenia bacteriana, pois as bactérias incorporam os ácidos graxos, principalmente em fosfolipídios, que possuem propriedades úteis para serem biomarcadores (Piotrowska-Seget, 2003). Biomarcadores de ácidos graxos bacterianos são tipicamente ímpares, são ácidos graxos ramificados como os trans-insaturados e o ciclopropilo (Berge; Barnathan, 2005). Outro fator que poderia ser citado é a radiação ultravioleta, mas de acordo com LI (2012) essa radiação não altera o teor de ácidos graxos das microalgas.

Sahu et al. (2013) reportam que é possível classificar taxonomicamente as microalgas com a utilização da caracterização dos ácidos graxos e também definir sua destinação para outras aplicações. Estes autores complementam que o acúmulo de ácidos insaturados é atribuído à capacidade de adaptação à diversas condições extremas. A evolução das pesquisas em relação aos meios, ao modo de cultivo, tipos de fotobiorreatores e processos posteriores são de interesse global para que a o cultivo de microalgas se torne uma alternativa viável economicamente para a obtenção de energia (Pereira et al., 2012).



### 3.4. Conclusão

A realização de cultivos mais simples é importante para o entendimento das microalgas em condições ambientais. A espécie de microalga que apresentou melhor crescimento em tanques abertos foi a *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Coelastrum* sp. Apresentaram os maiores conteúdos lipídico, porém o gênero *Scenedesmus* apresentou um perfil diferenciado de ácidos graxos, com um conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados (C21 e C25), especialmente da série ômega, mostrando que estratégias de cultivos em tanques abertos podem gerar produtos diferentes devido à interação com outros microrganismos nos ambientes abertos.

### 3.5. Referências

Bergé J. P., Barnathan G.; Fatty acids from lipids of marine organisms: molecular biodiversity, roles as biomarkers, biologically active compounds, and economical aspects, **Advances in Biochemistry and Engineering and Biotechnology** **96**, p. 49-125, 2005.

BLIGH E. G., DYER W. J.; A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology** **37**, p. 911-917, 1959.

CARVALHO E. M. DE, OTTONELLI F., ANSILAGO M., GODOY H. C., NAKAGAKI J. M., RAMIRES I.; Growth kinetics of the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) in natural water enriched with NPK fertilizer, **Biochemistry and Biotechnology Reports** **1**, n.2, p. 14-18, 2012.

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

Dragone G., Fernandes B., Vicente A., Teixeira J.; Third generation biofuels from microalgae. **Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**. A. Mendez-Vilas (ed), p. 1355-1366, 2010.

Kalpesh K., Sharma H. S., Peer M. S.; High lipid induction in microalgae for biodiesel production. **Energies** **5**, p. 1532-1553, 2012.

Li P., Lin J.; Effect of ultraviolet radiation on photosynthesis, biomass, and fatty acid content and profile of a *Scenedesmus rubescens*-like microalga. **Bioresource Technology** **111**, 316-322, 2012.

MARTINS A. P., YOKOYA N. S., COLEPICOLO P.; Comparison of extraction and transesterification methods on the determination of the fatty acid contents of three Brazilian seaweed species. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** **22**, n.4, p 854-860, 2012.

Martins M. B., Suaiden A. S., Piotto R. F. Barbosa M.; Propriedades dos ácidos graxos poliinsaturados – Omega 3 obtidos de óleo de peixe e óleo de linhaça. *Revista do Instituto de Ciências da Saúde* 26, n. 2, p. 153-159, 2008.

Mata T. M., Martins A. A., Caetano N. S.; Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. ***Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14**, p. 217-232, 2010.

MENEGAZZO M. L., PETENUCI M. E., FONSECA G. G.; Production and characterization of crude and refined oils obtained from the co-products of Nile tilapia and hybrid sorubim processing, ***Food Chemistry* 157**, p. 100-104, 2014.

MINILLO A, GODOY H. C., FONSECA G. G.; Growth performance of microalgae exposed to CO<sub>2</sub>, ***Journal of Clean Energy Technologies* 1**, n. 2, 2013.

Nascimento I. A., Marques S. S. I., Cabanelas I. T. D., Pereira S. A., Druzian J. I., Souza C. O., Vich D. V., Carvalho G. C., Nascimento M. A.; Screening microalgae strains for biodiesel production: lipid productivity and estimation of fuel quality based on fatty acids profiles as selective criteria. ***BioEnergy Research* 6**, n. 1, p. 1-13, 2013.

PARK J. B. K., CRAGGS R. J., SHILTON A. N., Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. ***Bioresource Technology* 102**, n. 1, p. 35-42, 2011.

PEREIRA C. M. P., HOBUSS C. B., MACIEL J. V., FERREIRA L. R., DEL PINO F. B., MESKO M. F.; Biodiesel renovável derivado de microalgas: avanços e perspectivas tecnológicas. ***Química Nova* 35**, n. 10, p. 2013-2018, 2012.

PIOTROWSKA-SEGET Z., MROZIK A.; Signature lipid biomarker (SLB) analysis in determining changes in community structure of soil microorganisms, ***Polish Journal of Environmental Studies* 12**, n. 6, p. 669-675, 2003.

SAHU A., Pancha I, Jain D., Paliwal C., Ghosh T., Patidar S., Bhattacharya S, Mishra S.; Fatty acids as biomarkers of microalgae ***Phytochemistry* 89**, p. 53-58, 2013.

SipaÚba-Tavares L.H., Rocha O.; **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. 2ª. ed. São Carlos: Rima, 2003.

Taiz L., Zeiger E.; **Fisiologia vegetal**. 4º Edição, Porto Alegre, 2008.

TORTORA G. J., FUNKE B. R., CASE C. L.; **Microbiologia**. 8º Edição, Porto Alegre, 2005.

VOET D.; **Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

YEN H. W., HU C. CHEN C. Y, HO S. H. LEE D. J. CHANG J. S. Microalgae-based biorefinery – From biofuels to natural products ***Bioresource Technology* 135**, p. 166-174, 2013.

## **4. Crescimento e Sobrevivência de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em Tanques sem Renovação de Água Suplementados com Ração, Aeração e Microalgas**

### **4.1. Introdução**

A piscicultura é uma atividade que cresce a cada ano em uma taxa muito maior do que a observada para outras atividades rurais. No entanto, a ciência e a tecnologia envolvidas na produção ainda possuem carência de estudos e novas pesquisas são necessárias para o aumento da produção (Ostrensky et al., 1998).

A qualidade da água é uma das suas principais necessidades, uma vez que os peixes desenvolvem suas funções básicas para sobrevivência, como respiração, reprodução, alimentação e defecação na água. Assim a água é um fator determinante na alimentação devido à homogeneidade e à disponibilidade de alimento (Ostrensky et al., 1998; Roche; Rocha, 2005).

A concentração de microalgas em lagos de piscicultura é um fator importante em relação à qualidade da água. É responsável pela reciclagem de nutrientes frequentemente excretados pelos peixes e proporciona também um papel importante no conteúdo de oxigênio dissolvido na água. As microalgas podem também ser consideradas como uma fonte rica de alimento para os peixes (Taelman et al., 2013). Existem vários estudos que relatam a utilização de microalgas como fonte de carbono e energia para o crescimento dos peixes (Ruangsomboon et al., 2010).

No entanto, existem ainda muitas lacunas que precisam ser preenchidas em relação à concentração de microalgas, a alimentação e a qualidade da água. Segundo Hein e Brianese (2004) os principais entraves da piscicultura são o custo de produção, devido ao alto custo das rações, a falta de capacitação dos piscicultores, às variantes climáticas, a falta de legislação e a dificuldade na comercialização.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento/desenvolvimento da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em seis tratamentos diferentes, tendo a combinação entre ração comercial, fornecimento de microalgas (*Chlorella sorokiniana*) e aeração da água em tanques sem renovação da água a fim de compreender a fisiologia dos peixes durante os primeiros estágios de crescimento.

## 4.2. Materiais e Métodos

O experimento foi realizado em uma piscicultura localizada em Dourados, MS, Brasil. Foram utilizados seis tanques circulares de 1000 L, com um volume útil de água de 500 L. A temperatura foi controlada a  $28 \pm 2$  °C usando termostatos e foi realizado em fotoperíodo de 12 h/12 h. Um total de 180 juvenis de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), com um peso médio de  $10,66 \pm 1$  g e tamanho médio de  $8 \pm 1$  cm. Um total de 30 indivíduos foram utilizados em cada tanque. A microalga utilizada nos experimentos foi a *Chlorella sorokiniana* CTT 7727 obtida da Fundação André Tosello sendo cultivada em tanque aberto utilizando o meio Bold Basal (Bischoff; Bold, 1963),

Os tratamentos avaliados foram: 1) Ração (R), 2) Ração + Aeração (RA), 3) Microalgas (M), 4) Microalgas + Aeração (MA), 5) Ração + Microalgas (RM), 6) Ração + Microalgas + Aeração (RMA). Na primeira semana para os tratamentos em que haviam só ração (R, RA) os peixes foram alimentados com ração na proporção de 20% do peso total dos alevinos, para os tratamentos que havia só microalgas foram tratados com 4 litros de cultivo de microalgas com uma concentração de  $3,90 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> (M e MA) e para os cultivos com microalga e ração foram utilizados 10% de ração e 2 litros de cultivo de microalgas (RM e RMA). Todas essas alimentações foram divididas em quatro vezes ao dia nos horários de 8, 11, 14 e 17 h.

Na segunda semana do experimento foi reduzida pela metade a alimentação dos experimentos com ração, sendo 10% para os que só havia ração (R e RA) e 5% para os que haviam ração e microalgas (RM e RMA), conforme a **Tabela 4.1**.

**Tabela 4.1.** Descrição dos diferentes tipos de tratamentos.

Tratamento	Dia 0 – 7*	Dia 8 – 14*
Ração + Microalga + Aeração	32 g (R) + 1000 mL (M)	16 g (R) + 500 mL (M)
Ração + Microalga	32 g (R) + 1000 mL (M)	16 g (R) + 500 mL (M)
Microalga	2000 mL (M)	1000 mL (M)
Microalga + Aeração	2000 mL (M)	1000 mL (M)
Ração + Aeração	64g (R)	32g (R)
Ração	64g (R)	32g (R)

(R): ração; (M): microalga; \*Quantidade por tanque

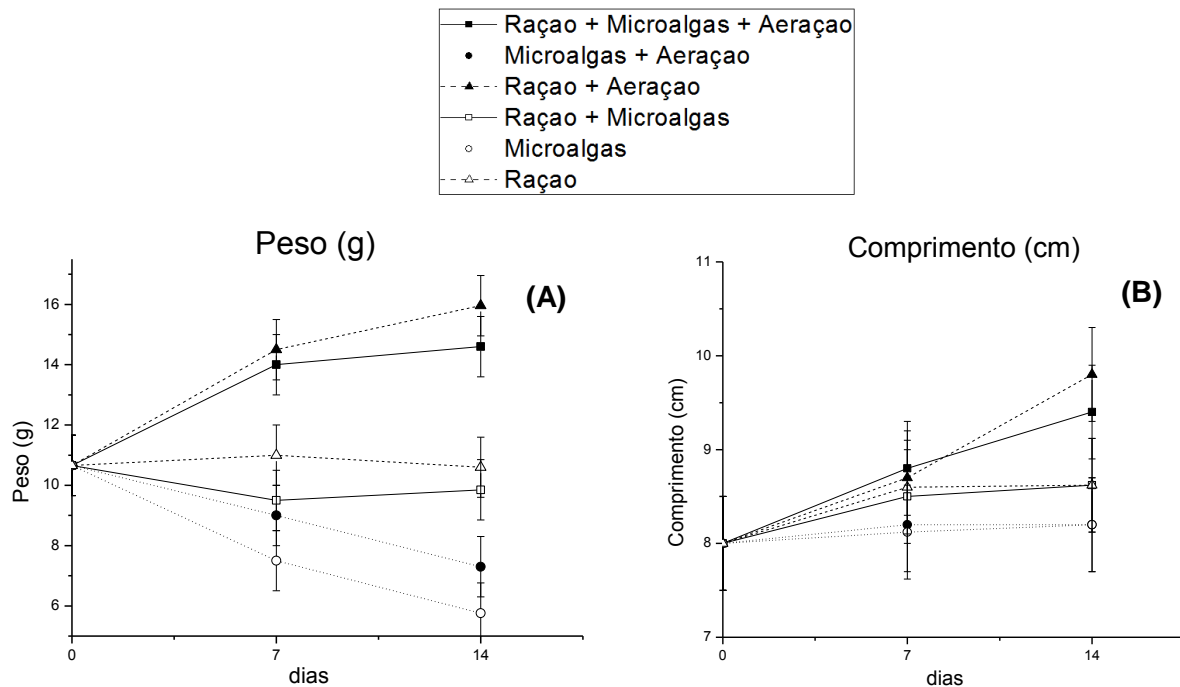
Durantes os 14 dias de experimento foram determinados periodicamente o pH, o oxigênio dissolvido, a amônia tóxica, o nitrito e a dureza da água utilizando o kit de análise de água (Labfish). Ao final do experimento a água foi coletada para a realização das análises microbiológicas.

Para as análises microbiológicas foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos para a detecção e a confirmação dos coliformes totais e as contagens de *Escherichia coli* e de mesófilos totais conforme metodologia clássica (Silva, 2005).

### 4.3. Resultados e Discussão

Podemos visualizar na Figura 4.1 (A) a alteração do peso dos peixes nos diferentes tratamentos. Observa-se que o tratamento ração com aeração (RA) obteve o maior ganho de peso, aproximado com o resultado do tratamento com ração, microalgas e aeração (RMA), que teve 50% menos ração do que o tratamento só com RA. Assim, constatou-se que presença da microalga supriu em parte a quantidade de ração diminuída.

A Figura 4.1 (B) mostra o comprimento dos peixes nos diferentes tratamentos, sendo que o perfil foi semelhante ao da Figura 4.1 (A).

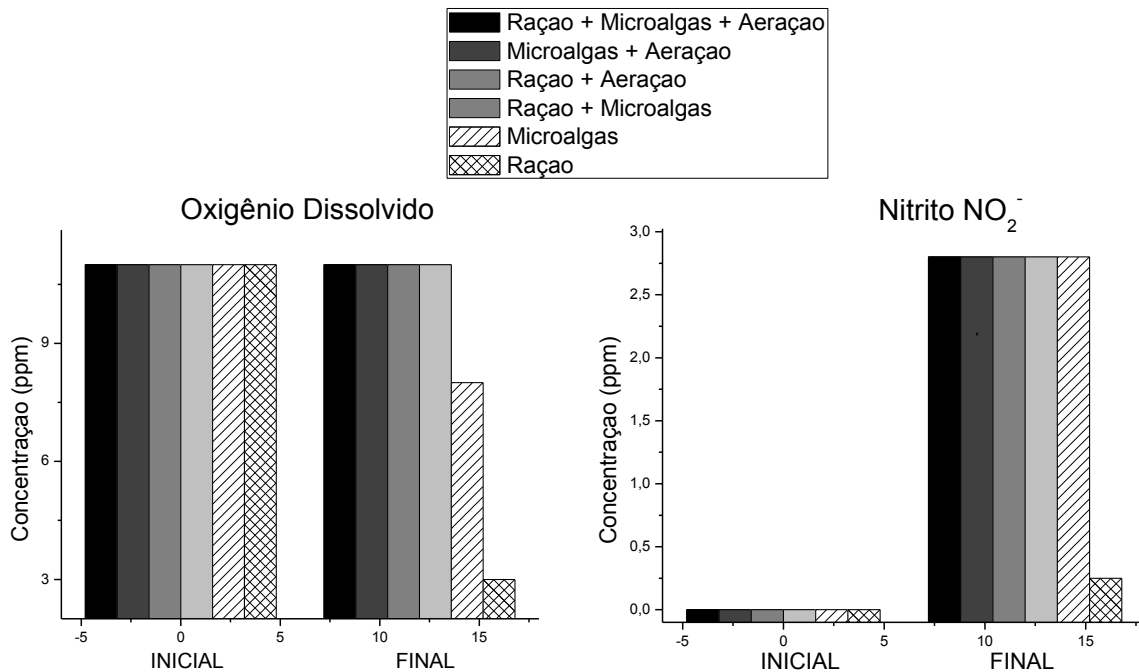


**Figura 4.1.** (A) Acompanhamento do peso dos peixes nos diferentes tratamentos, (B) Acompanhamento do comprimento dos peixes nos diferentes tratamentos.

Nos tratamentos somente com ração (R) e ração e microalgas (RM) os peixes mantiveram seu peso, apesar da disponibilidade de alimento. Isso revela a importância da aeração no meio para que haja o crescimento e o ganho de peso, segundo HEIN e BRIANESE (2004) qualquer estresse pode influenciar o apetite e assim impossibilitar seu crescimento. Nos tratamentos que não haviam a aeração, as microalgas tiveram um papel essencial na oxigenação dos tanques, mantendo o oxigênio dissolvido necessário para que os peixes sobrevivessem, conforme mostrado na Figura 4.2 (A).

A média de ganho de peso em escala comercial chega a faixa de 2 a 3 g/dia (Cruz-Casallas et al., 2010), muito superior a relatada neste experimento, onde o melhor crescimento atingiu um ganho de 5 g após 14 dias, representando uma média de 0,3 g/dia.

Os tratamentos com apenas microalgas (M) e microalgas e aeração (MA) resultaram em perda de peso, mostrando que apenas as microalgas não são suficientes para a alimentação dos peixes. Somente o oxigênio dissolvido e o nitrito obtiveram diferenças significativas nos diferentes tratamentos, dados demonstrados no valor inicial e final nas Figuras 4.2(A) e 4.2(B).



**Figura 4.2.** (A) Medida final e inicial o Oxigênio dissolvido nos diferentes tratamentos, (B) medida final e inicial do nitrito nos diferentes tratamentos.

Nos parâmetros de qualidade da água, o pH, a amônia tóxica e a dureza da água se mantiveram dentro das condições adequadas para a produção segundo o manual técnico SNatural

(2015). O pH ficou na faixa entre 6,5 e 7, a amônia tóxica se manteve sempre inferior a 0,02 ppm e a dureza não se alterou em nenhum dos tratamentos.

Analisando as Figuras 4.2(A) e 4.2(B) podemos observar que o oxigênio dissolvido possui uma grande importância na formação do nitrito. Todos os experimentos chegaram a níveis críticos de nitrito, maiores que 2,5 ppm, exceto o tratamento só com ração, onde o oxigênio dissolvido foi o mais baixo. Isso ocorre, pois, a produção de nitrito é realizada por bactérias nitrificantes aeróbicas, em que o nitrito representa uma fase intermediária entre a amônia (forma mais reduzida) e o nitrato (forma mais oxidada) (Esteves, 1998). Constatou-se que o alto valor de nitrito foi estressante para os alevinos, influenciando seu desenvolvimento e consequentemente causando risco de morte.

A ação do nitrito funciona através da ligação com a hemoglobina, que é o pigmento responsável pelo transporte de oxigênio para os órgãos e células de peixes. Quando as concentrações de nitrito na água são elevadas, combina-se com o nitrito de hemoglobina para formar a metemoglobina, que não é capaz de transportar oxigênio (Duborow et al., 1997). O resultado é que os peixes morrem devido a falta de oxigênio (anoxia), mesmo com uma grande quantidade de oxigênio dissolvido estar presente na água das lagoas.

Outro fator que gerou morte foi a queda de oxigênio dissolvido no tratamento apenas com ração. A taxa de sobrevivência pode ser visualizada na **Tabela 4.2**. É possível observar que nos tratamentos onde não havia aeração, a fotossíntese das microalgas exerceu um papel essencial na oxigenação dos tanques, mantendo o oxigênio dissolvido necessário para a sobrevivência de peixe (**Figura 4.2 (A)**).

**Tabela 4.2.** Porcentagem de sobrevivência dos peixes.

<b>Tratamento</b>	<b>Inicial</b>	<b>Final</b>	<b>Sobrevivência (%)</b>
Ração + Algas + Aeração	30	16	53,33
Ração + Algas	30	25	83,33
Algas + Aeração	30	28	93,33
Algas	30	28	93,33
Ração + Aeração	30	29	96,67
Ração	30	26	86,67

As análises microbiológicas mostraram que o tratamento RMA apresentou uma carga maior de microrganismos tanto em quantidade de *Escherichia coli* como de bactérias mesófilas, representando a menor taxa de sobrevivência entre os tratamentos. Segundo Liuson (2003) a

determinação microbiológica é um indicativo que informa o grau de poluição microbiana que as Tilápia estão expostos no tanque e que podem prejudicar toda cadeia produtiva. É importante entender o comparativo de algumas questões básicas e encontrar uma correlação entre alimentação, com qualidade da água e a carga microbiológica envolvendo microalgas.

**Tabela 4.3.** Análises microbiológicas

<b>Tratamento</b>	<b>CT 24 h</b>	<b>CT 48 h</b>	<b><i>E. coli</i> (UFC/g)</b>	<b>Bactéria mesofílica (UFC/g)</b>
Ração + Microalgas + Aeração	+	+	2,43 x 10 <sup>5</sup>	1,08 x 10 <sup>6</sup>
Ração + Microalgas	+	+	4,98 x 10 <sup>4</sup>	6,57 x 10 <sup>5</sup>
Microalgas + Aeração	-	+	5,29 x 10 <sup>4</sup>	1,68 x 10 <sup>5</sup>
Microalgas	+	+	5,60 x 10 <sup>4</sup>	9,03 x 10 <sup>5</sup>
Ração + Aeração	-	+	4,27 x 10 <sup>4</sup>	2,24 x 10 <sup>5</sup>
Ração	+	+	2,21 x 10 <sup>5</sup>	2,47 x 10 <sup>5</sup>

CT: Coliformes totais (após 24/48 h); +: presença; -: ausência

A alta quantidade de nitrito causou um aumento na carga microbiológica dos tanques. Nos tanques em que não foi feita a renovação da água o risco do desenvolvimento da carga microbiológica aumentou. Uma possibilidade para a utilização em cultivos sem renovação é a utilização de filtros ou de cultivos de vegetais para realizar a ciclagem de amônia e nitrito na água.

#### 4.4. Conclusão

Os peixes tratados com ração, microalgas e aeração obtiveram um maior ganho de peso, porém a taxa de sobrevivência foi reduzida devido ao aumento da carga microbiológica. As microalgas foram eficientes para manter o oxigênio dissolvido necessário para a produção de peixe, mas não são suficientes para serem usadas na alimentação. Em tanques de produção de Tilápia do Nilo em que não há renovação da água as microalgas não foram capazes de reciclar os nutrientes de maneira eficiente que pudesse controlar o crescimento microbiológico.



#### 4.5. Referências

- CRUZ-CASALLAS N. E., MARCIALES-CARO L. J., DIAZ-OLARTE J. J.; Productive performance of yaque (*Leiarius marmoratus*) under different stocking densities in ground ponds. **Revista Colombiana de Ciencia Pecuária** **23**, n.3, p.325-335, 2010.
- DUBOROW R.M., CROSBY D.M., BRUNSON M.W.; Ammonia in fish ponds. Stoneville, **Southern Regional Aquaculture Center**, 1997.
- ESTEVEZ F. A.; **Fundamentos de Limnologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998.
- Hein G., Brianese R. H.; **Modelo Emater de produção de tilápia**. Toledo – PR, 2004.
- LIUSON, E. **Pesquisa de coliformes totais, fecais e Salmonella spp em tilápias de pesqueiros da região metropolitana de São Paulo**. 94 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – USP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo-SP, 2003.
- Ostrensky A., Boeger W.; Piscicultura: Fundamentos e técnicas de manejo . **Guaíba: Agropecuária**, p. 211, 1998.
- ROCHE K. F., ROCHA O.; **Ecologia trófica de peixes com ênfase na planctivoria em ambientes lênticos de água doce no Brasil**, 1. ed. São Carlos: Rima Editora, 136 p. 2005.
- Ruangsomboon S., Choochote S., Taveekijakarn P.; Growth performance and nutritional composition of red tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. mossambicus*) fed diets containing raw *Spirulina platensis*. **The International Conference on Sustainable Community Development 2010**, Khon Kaen University, Nongkhai Campus, Thailand and Vientiane, Lao PDR, 2010.
- SILVA N. DA., NETO R. C., JUNQUEIRA V. C. A., SILVEIRA N. F. A.; **Manual de métodos de análise microbiológicas da água**. São Paulo: Livraria Varela, 2005.
- SNatural** – Manual Técnico. Tratamento de Água e Efluentes, Piscicultura - Fazenda de Peixe acessado em novembro de 2015. [www.snatural.com.br/PDF\\_arquivos/Manual-Tecnico-de-Operacao-Fabrica-peixe.pdf](http://www.snatural.com.br/PDF_arquivos/Manual-Tecnico-de-Operacao-Fabrica-peixe.pdf)
- Taelman S. E., Meester S. De., Roef L., Michiels M., Dewulf J.; The environmental sustainability of microalgae as feed for aquaculture: A life cycle perspective. **Bioresource Technology** **150**, p. 513–522, 2013.

## **5. Reutilização do Efluente do Cultivo de *Chlorella sorokiniana* em Diferentes Meios de Cultura em Germinação de Sementes de Alface**

### **5.1. Introdução**

Pesquisas com o cultivo de microalgas vêm crescendo com o passar dos anos e avanços ainda estão sendo realizados em diversas partes da produção de microalgas, principalmente para o entendimento da fisiologia das microalgas, avaliação de fotobiorreatores, recuperação da biomassa e desenvolvimento de produtos e aplicações (Stephenson et. al., 2011; Richardson; Johnson, 2015).

Com o aumento dos estudos e a tecnologia de produção de microalgas se tornando cada vez mais presente, cresce a preocupação com o destino dos efluentes desta produção. Cada cultivo pode produzir diferentes compostos extracelulares e podem gerar diferentes metabólitos e fito-hormônios presentes nas microalgas que podem ser benéficos ou não para outros organismos.

A alface é uma das principais hortaliças produzidas no Brasil devido ao seu baixo custo de produção, pouca suscetibilidade a pragas e doenças e a comercialização segura. Assim, tem um papel importante para pequenos produtores e sua semente é uma das principais utilizadas em pesquisas de toxicidade em sementes por dar respostas rápidas e de fácil avaliação (Usepa; Osver, 1994, Asahide et. al., 2012).

A utilização de fertilizantes sintéticos pode acarretar desequilíbrios nutricionais nas plantas, podendo causar danos ao solo e ao lençol freático, além de enfraquecer a planta. Contudo a utilização de biofertilizantes é um estratégia de baixo custo que tende a contribuir para uma maior produtividade no desenvolvimento vegetativo e melhorar as características químicas, físicas e biológicas do solo (Souza; Resende, 2003, Diniz et al., 2011) .

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência e/ou toxicidade das microalgas e da água residual dos cultivos de microalgas na germinação de sementes de alface.

## 5.2. Materiais e Métodos

### 5.2.1. Microalga

Os cultivos foram realizados no Laboratório de Bioengenharia (BIOENG) localizado na Faculdade de Engenharia (FAEN) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), utilizando a microalga *Chlorella sorokiniana* CTT 7727 obtida da Fundação André Tosello.

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 ml com volume útil de 200 ml em triplicata testando quatro diferentes meios de cultivo, o meio Bold Basal descrito por BISCHOFF e BOLD (1963), o Meio Nitrogenado descrito por DRAGONE et al. (2011), o meio NPK preparado de acordo com SIPAÚBA-TAVARES; ROCHA (2003) e o Meio Misto composto por 50% Bold Basal, 50% NPK mais  $1\text{ g L}^{-1}$  de glicose, mantidos em BOD equipada com agitador rotatório orbital e fotoperíodo (MA 415 Marconi) a  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$  a 200 rpm e 8 klux durante 28 dias com fotoperíodo de 12 h/12 h.

Leituras de absorvâncias foram realizadas em leitora de microplacas (Biochrom modelo Anthos Zenyth 200rt) no comprimento de ondas de 670 nm a cada 24 h. A fase exponencial de crescimento foi identificada pela região linear sobre  $\ln$  da absorvância ( $\text{ABS}_{670}$ ) em função do tempo de cultivos. A partir dos dados de absorvância calculou-se a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\text{max}}$ ) e o tempo de duplicação (DT).

### 5.2.2. Germinação de Sementes

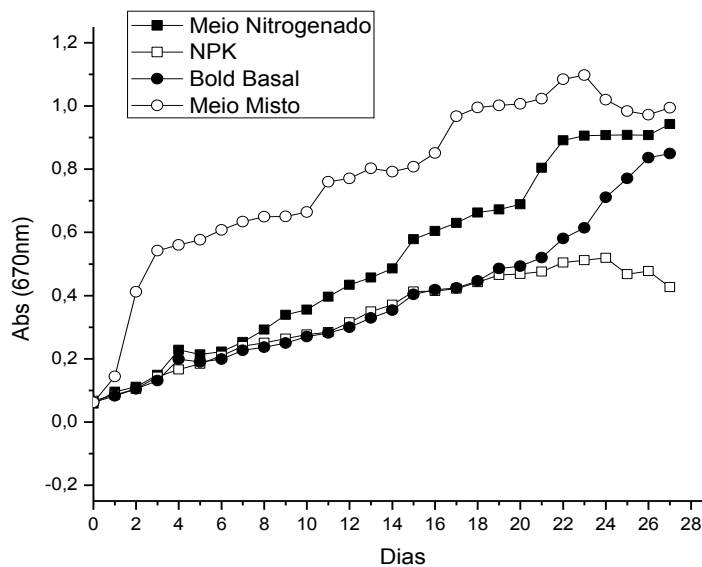
Para os testes de germinação foram utilizadas três concentrações de microalgas ( $2,7 \times 10^7$ ,  $1,23 \times 10^7$  e  $0,15 \times 10^7 \text{ cell}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) cultivadas em meio Bold Basal e os efluentes dos cultivos descritos na secção 5.2.1, após autoclavagem ( $121^\circ\text{C}$ , 15 min.).

Os testes de germinação foram realizados de acordo com as recomendações previamente descritas (Brasil, 2009). Utilizaram-se 4 repetições de 25 sementes semeadas em placas de Petri autoclavadas, contendo duas folhas de papel de filtro umedecidas com os diferentes efluentes e microalgas testadas e incubadas em BOD (MA 415 Marconi) a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  sob luz fluorescente branca. A germinação foi realizada pelo registro de plântulas normais germinadas no período de 10 dias. A massa seca foi obtida pela pesagem das plântulas germinadas realizando uma média para cada tratamento.

Os resultados dos testes realizados foram analisados segundo delineamento inteiramente casualizado. As médias obtidas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico SISVAR.

### 5.3. Resultados e Discussão

Após 28 dias de cultivo podemos observar o perfil cinético dos cultivos e visualizar as diferenças na Figura 5.1. O meio misto onde se obteve melhor crescimento entre os meios testados devido à presença de glicose como fonte de carbono. No cultivo misto podemos observar que após os três primeiros dias de cultivo ocorre uma diminuição do crescimento exponencial sugerindo o esgotamento da glicose e iniciando um crescimento autotrófico em que neste estudo foi apresentada em diferentes cálculos da fase exponencial (0-3 e 3-28) presente na Tabela 5.1.



**Figura 5.1.** Cinética de crescimento da *Chlorella sorokiniana* em diferentes meios de cultura.

Com esse resultado podemos confirmar a ação mixotrófica da *Chlorella sorokiniana*. Algumas microalgas têm a capacidade de absorver as fontes de carbono na forma orgânica, como glicose ou na forma inorgânica, como  $\text{CO}_2$  a partir do ar atmosférico, onde a disponibilidade de luz está diretamente relacionada ao consumo de carbono inorgânico (Derner, 2006).

O crescimento das microalgas não pode ser considerado igual a um crescimento convencional de bactérias e leveduras devido ao crescimento autotrófico, pois nesta condição apresenta um crescimento constante sem a diferenciação das fases de latência, logarítmica e

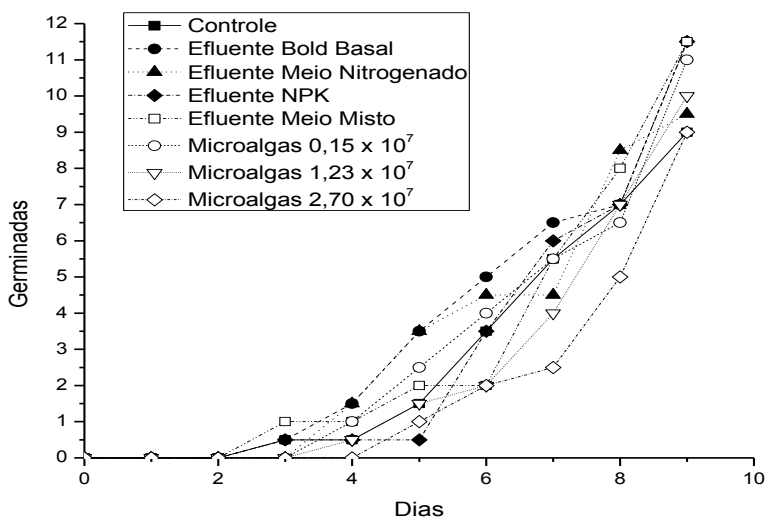
estacionária. No entanto é possível observar o início da fase de declínio no cultivo com NPK gerado pelo esgotamento dos nutrientes no meio de cultura.

**Tabela 5.1.** Parâmetros cinéticos dos cultivos.

Meio	$\mu_{\max}$ (dia <sup>-1</sup> )	DT (dia)	R <sup>2</sup>
Meio Nitrogenado	0,090	7,7620	0,98
Meio NPK	0,065	10,664	0,97
Meio Bold Basal	0,067	10,3455	0,99
Meio Misto 0-3 dias	0,94	0,7374	0,99
Meio Misto 3-28 dias	0,04	17,3287	0,94

A maior velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) e conseqüentemente o menor tempo de duplicação (TD) foi do Meio Misto nos três primeiros dias seguidas pelo meio nitrogenado, Bold Basal e NPK respectivamente. O meio NPK obteve crescimento semelhante ao meio Bold Basal mostrando ser uma opção em cultivos onde se objetiva menores gastos com meio de cultura.

Ao analisarmos a germinação de sementes podemos visualizar que não se observou diferenças significativas na germinação entre os tratamentos apresentados na Figura 5.2.



**Figura 5.2.** Cinética de germinação das sementes de alfaca.

Na Tabela 5.2 podemos observar a taxa de germinação e as diferenças na massa seca resultante da pesagem das plântulas germinadas.

**Tabela 5.2.** Germinação e massa seca das sementes.

<b>Tratamentos</b>	<b>Germinação (%)</b>	<b>Massa Seca (g)</b>
Controle	36 a	0,1455
Efluente Bold Basal	48 a	0,1454
Efluente Meio Nitrogenado	43 a	0,1798
Efluente NPK	46 a	0,1513
Efluente Meio Misto	47 a	0,1798
Microalgas $2,70 \times 10^7$	37 a	0,1843
Microalgas $1,23 \times 10^7$	43 a	0,1765
Microalgas $0,15 \times 10^7$	43 a	0,1606
CV	28,8%	

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Os biofertilizantes tem maior efetividade após a germinação quando se está em contato com a parte vegetal. Os tratamentos onde houve a utilização dos efluentes e microalgas como biofertilizantes obteve uma maior massa seca, isso tende a refletir em um maior crescimento vegetativo, uma maior produtividade das plantas e possibilidade de geração de sementes com maior potencial fisiológico (Carvalho et al., 2001; Santos et al., 2008).

O desenvolvimento de aplicações de microalgas em processos com alto valor agregado, em conjunto com a utilização delas como biofertilizantes agindo como fixadores de nitrogênio ou como condicionadores de solo se torna um promissor mercado econômico de aplicação biotecnológica (Pulz e Gross, 2004).

## 5.4. Conclusão

A utilização dos efluentes da microalga como biofertilizantes para desenvolvimento de plantas é uma opção em aplicações biotecnológicas, neste experimento não obtivemos diferenças significativas na taxa de germinação em todos os tratamentos, mostrando que em sementes os nutrientes dos efluentes não foram aproveitados na germinação, mas houve um ganho de massa seca das plântulas germinadas.

## 5.5. Referências

ASAHIDE C. A., MAGRIN F., LOUZADA T. P. O., SILVA D.P.B., COSTA C. R.; Utilização de sementes de alface na avaliação da toxicidade de sais de metais potencialmente tóxicos. **52º Congresso Brasileiro de Química, 2012.**

BISCHOFF H. W., BOLD H. C., Phycological studies. IV. Some soil algae from enchanted rock and related algal species. - **University of Texas Publications 6318**, 1-95, 1963.

BRASIL; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009.

CARVALHO M. A. C., ARF O., SÁ M.E., BUZETTI S., SANTOS N. C. B.; BASSAN D. A. Z.; Produtividade e qualidade de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) sob influência de parcelamentos e fontes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciências do Solo 25**, p.617-624, 2001.

DERNER R. B., OHSE S., VILLELA M., DE CARVALHO S. M., FETT R.; Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural 36**, n.6, p.1959-1967, 2006.

DINIZ A. A., CAVALCANTE L. F., REBEQUI A. M., NUNES J., BREHM M. A. S.; Esterco líquido bovino e uréia no crescimento e produção de biomassa do maracujazeiro amarelo. **Revista Ciência Agronômica 42**, n.3, p.597-604, 2011.

DRAGONE G., FERNANDES B., VICENTE A. A., TEIXEIRA J. A.; Nutrient limitation as a strategy for increasing starch accumulation in microalgae. **Applied Energy 88**, p. 3331-3335, 2011.

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

RICHARDSON J. W., JOHNSON M. D.; Financial Feasibility analysis of NAABB developed technologies. **Algal Research 10**, p. 16-24, 2015.

SANTOS H. C., VIANA J. S., GONÇALVES E. P., BRUNO R. L. A., FRAGA V. S.; Qualidade fisiológica de sementes de sorgo em resposta a adubação com zinco. **Revista Caatinga** **21**, n. 1, p. 64-74, 2008.

SIPAÚBA-TAVARES L. H., ROCHA O.; **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. 2<sup>a</sup>. ed. São Carlos: Rima, 2003.

SOUZA J. L., RESENDE P.; **Manual de horticultura orgânica**. Viçosa: Aprenda Fácil, 564p, 2003.

STEPHENSON P.G., MOORE C.M., TERRY M.J., ZUBKOV M.V., BIBBY T.S. Improving photosynthesis for algal biofuels: toward a green revolution. **Trends Biotechnology** **29**, n. 12, p. 615-23, 2011.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA), OFFICE OF SOLID WASTE AND EMERGENCY RESPONSE (OSWER), **Catalogue of Standard Toxicity Tests for Ecological Risk Assessment. Intermittent Bulletin** **2**, n. 2. 1994.



## 6. Conclusão Geral

Pesquisas com microalgas crescem e se consolidam a cada ano e este trabalho cumpre o objetivo de desenvolver diferentes estudos relacionados à cultivos e aplicações biotecnológicas de microalgas.

No primeiro trabalho observamos que nas condições testadas o fotoperíodo de 24 h/ 0 h foi melhor para todos os meios, e entre os meios testados o meio Bold Basal obteve a maior velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) de  $0,23 \text{ dia}^{-1}$ .

Na segunda estratégia de estudo a espécie de microalga que apresentou melhor crescimento em tanques abertos foi a *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Coelastrum* sp. obtiveram os maiores conteúdos lipídicos de 19,74% e 19,98% respectivamente, porém o gênero *Scenedesmus* apresentou um perfil diferenciado de ácidos graxos, com um conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados (C21 e C25).

No terceiro trabalho foi possível concluir que os peixes tratados com ração e aeração e ração, microalgas e aeração obtiveram os melhores resultados no desenvolvimento dos alevinos, porém a taxa de sobrevivência no tratamento ração, microalgas e aeração foi reduzida devido ao aumento da carga microbiológica. As microalgas foram eficientes para manter o oxigênio dissolvido, mas não se mostraram suficientes para serem usadas na alimentação dos alevinos nas condições testadas. Em tanques de produção de Tilápia do Nilo em que não há renovação da água as microalgas não foram capazes de reciclar os nutrientes de maneira eficiente que pudesse controlar o crescimento microbiológico.

Na última estratégia desenvolvida podemos concluir que a utilização do efluente dos cultivos de microalgas como biofertilizantes não obtiveram diferenças significativas na taxa de germinação em todos os tratamentos, mas foi possível observar uma ganho de massa seca nas plântulas germinadas.

Diversas podem ser as iniciativas para os estudos dos cultivos e aplicações biotecnológicas das microalgas e este trabalho pioneiro no Mato Grosso do Sul poderá servir de base para muitos outros estudos que viram.

## ANEXOS

### Anexo A - Instruções para preparação de 1 Litro do Meio Bold Basal

**1.** Preparar as soluções estoques:

Solução	Nome	Fórmula	Por litro
1	Nitrato de Sódio	NaNO <sub>3</sub>	25 g L <sup>-1</sup>
2	Sulfato de Magnésio Heptahidratado	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7,5 g L <sup>-1</sup>
3	Coreto de Sódio	NaCl	2,5 g L <sup>-1</sup>
4	Fosfato de Potássio Dibásico	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,5 g L <sup>-1</sup>
5	Fosfato Monopotássico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,5 g L <sup>-1</sup>
6	Cloreto de Cálcio Dihidratado	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2,5 g L <sup>-1</sup>
7	Sulfato de Zinco Heptahidratado	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,82 g L <sup>-1</sup>
	Cloreto de Manganês (II) Tetrahidratado	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,44 g L <sup>-1</sup>
	Trióxido de Molibdênio	MoO <sub>3</sub>	0,71 g L <sup>-1</sup>
	Sulfato de Cobre Pentahidratado	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1,57 g L <sup>-1</sup>
	Nitrato de Cobalto (II) Hexahidratado	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,49 g L <sup>-1</sup>
8	Ácido Bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,42 g L <sup>-1</sup>
9	Ácido Etilenodiamino tetra-acético (EDTA)	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	50 g L <sup>-1</sup>
	Hidróxido de Potássio	KOH	31 g L <sup>-1</sup>
10	Sulfato de ferro (III) <i>Heptahidratado</i>	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4,98 g L <sup>-1</sup>
	Ácido Sulfúrico	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 ml L <sup>-1</sup>

**2.** Após o preparo das 10 soluções estoques para realizar 1 L do meio Bold Basal:

Soluções Estoques	por litro
Solução Estoque 1 - 6	10 ml de cada solução
Solução Estoque 7 - 10	1 ml de cada solução

## Anexo B - Instruções para preparação de 1 Litro do Meio Nitrogenado

1. Preparar solução de 200 ml com:

Nome	Fórmula	Por Litro
Ureia		1,10 g L <sup>-1</sup>

2. Preparar solução de 800 ml com:

Nome	Fórmula	Por Litro
Fosfato Monopotássico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,238 g L <sup>-1</sup>
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,204 g L <sup>-1</sup>
Ácido Etilenodiamino tetra-acético (EDTA)	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>8</sub> N <sub>2</sub> NaFe	0,040 g L <sup>-1</sup>
<i>Cloreto de Cálcio Dihidratado</i>	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,116 g L <sup>-1</sup>
Solução Micronutrientes	Micronutrientes	2 ml L <sup>-1</sup>

3. Autoclavar separadamente as duas soluções e misturar após a autoclavagem e o esfriamento esse cuidado é para evitar a precipitação dos sais.

### Preparação da solução estoque de micronutrientes

Solução	Nome	Fórmula	Por litro
	Ácido Bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,416 g L <sup>-1</sup>
	Sulfato de Cobre Pentahidratado	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,473 g L <sup>-1</sup>
	Cloreto de Manganês (II) Tetrahidratado	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,647 g L <sup>-1</sup>
	Sulfato de Cobalto Heptahidratado	CoSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,308 g L <sup>-1</sup>
	Sulfato de Zinco Heptahidratado	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,339 g L <sup>-1</sup>
	Molibdato de Amônio Tetrahidratado	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	0,086 g L <sup>-1</sup>
	Metavanato de Amônio	(NH <sub>4</sub> )VO <sub>3</sub>	0,007 g L <sup>-1</sup>

## Anexo C - Instruções para preparação de 1 Litro do Meio NPK

1. Pesar 1 g do Fertilizante N:P:K (20:5:20) e diluir em 1 Litro de água destilada.

## **Anexo D - Protocolo extração e quantificação de lipídios totais - Bligh Dyer**

### **Introdução:**

Esta metodologia pode ser aplicada a biomassas animais e vegetais. O procedimento a seguir está descrito para biomassa seca de microalgas, portanto será considerada umidade igual a zero para efeito de cálculo.

### **Materiais Necessários:**

- Erlenmeyers de 50 – 100 ml
- Pipetas de vidro (preferencialmente volumétricas)
- Pipetadores ou peras
- Agitadores magnéticos
- Sistema de filtração
- Filtros qualitativos (20 micrômetros de abertura)
- Frascos com tampa rosqueável (resistente a clorofórmio – plásticos comuns podem derreter em contato com clorofórmio)
- Cadinhos ou formas de metal de baixo peso

### **Químicos Necessários:**

- Clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ )
- Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )
- Água destilada
- Sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )

### **Procedimento:**

- 1) Pesar 50 mg de biomassa seca de microalgas
- 2) Condicionar em Erlenmeyer
- 3) Adicionar 10 ml ( $\text{CHCl}_3$ ) + 20 ml ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) + 8 ml  $\text{H}_2\text{O}$
- 4) Agitar por 30 minutos
- 5) Em seguida adicionar 10 ml ( $\text{CHCl}_3$ ) + 5 ml ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  solução 1.5%)
- 6) Agitar por 10 minutos
- 7) Esperar até a total separação das fases (aprox 20 minutos)
- 8) Filtrar a fração clorofórmica em filtro qualitativo totalmente livre de umidade, adicionar sobre o filtro uma ponta da espátula de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  em pó, também totalmente livre de umidade (auxilia a remoção de água residual do processo de separação)
- 9) Utilizar um volume conhecido da fração clorofórmica para realizar a secagem em recipiente já pré pesado.
- 10) Realizar a secagem a 60 graus Celsius em placa aquecedora em capela de fluxo
- 11) Após realizar a pesagem realizar os cálculos abaixo

**Quantificação:**

Peso dos lipídios extraídos = **A**

Volume da fração clorofórmica utilizado na secagem = **B**

Volume total de clorofórmio utilizado = 20 ml

Massa total de biomassa utilizada na extração = 50 mg

A ml ----- B mg

20 ml ----- X mg

50 mg ---- 100 %

X mg ---- Y % (PORCENTAGEM DE LIPÍDIOS TOTAIS)

**Vejamos um Exemplo:**

Após a extração foi calculado um peso em lipídios de 3 mg em 5 ml de fração clorofórmica utilizada:

5 ml ----- 3 mg

20 ml ----- X mg = 12 mg lipídios totais

50 mg ---- 100 %

12 mg ---- Y % = 24 % (PORCENTAGEM DE LIPÍDIOS TOTAIS)

## **Anexo E - Protocolo para transesterificação de ácidos graxos – Método HCl/METANOL**

### **Introdução:**

Esta metodologia é recomendado para análises de óleos vegetais. O procedimento a seguir está descrito para ácidos graxos de microalgas provenientes do processo de extração pelo método de Bligh Dyer.

### **Materiais Necessários:**

- Tubos de borosilicato com tampa rosqueável e autoclavável
- Pipetas automáticas (100 – 1000 uL)
- Ponteiras
- Manta aquecedora
- Frascos de vidro, âmbar, tipo vial

### **Químicos Necessários:**

- Ácido clorídrico (HCl)
- Metanol (CH<sub>3</sub>OH)
- Água destilada
- Hexano (CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>)

### **Procedimento**

- 1) Transferir a fração clorofórmica (idealmente 5 – 10 ml) para um tubo de borosilicato com tampa rosqueável e autoclavável (termoresistente)
- 2) Secar em atmosfera livre de oxigênio (utilizando gás N<sub>2</sub>)
- 3) Após remoção total do clorofórmio adicionar 500uL de HCl 5% em methanol
- 4) Incubar a mistura por 2h a 100 graus Celsius
- 5) Após a reação adicionar 1.25 mL de água destilada (esperar chegar a temperatura ambiente)
- 6) Os FAME devem ser extraídos com hexano (1.25 ml)
- 7) A fração de hexano, contendo os FAME, deve ser retirada com pipeta e transferida para um frasco tipo vial, para posterior análise em GC/MS.

**OBSERVAÇÃO:** Após transferência para o vial, injetar um pouco de N<sub>2</sub> para remoção do O<sub>2</sub> (oxidação dos ácidos graxos) e manter a amostra a -18 graus Celsius até o momento da análise.

## **Anexo F - Análises Microbiológicas: Contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbicos**

### **Introdução**

Estabelecer procedimento para a contagem padrão de microrganismos mesófilos aeróbios estritos e facultativos viáveis. Aplica-se a amostras de matérias-primas, água e alimentos. Baseia-se na semeadura da amostra ou de suas diluições em ágar padrão para contagem seguida de incubação em temperatura de  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 48 horas.

### **Materiais e Reagentes necessários:**

Vidraria e demais insumos básicos obrigatórios em laboratórios de microbiologia de alimentos; Agar padrão para contagem (PCA);  
Solução salina peptonada 0,1%.

### **Procedimentos:**

- 1) Pesagem e preparo da amostra: Pesar  $25 \pm 0,2$  g ou pipetar  $25 \pm 0,2$  mL da amostra
- 2) Adicionar 225 mL de solução salina peptonada 0,1%
- 3) Homogeneizar por aproximadamente 60 segundos em “stomacher”, diluição  $10^{-1}$
- 4) Inoculação em placas: A partir da diluição inicial (10-1), efetuar as demais
- 5) diluições desejadas em solução salina peptonada 0,1%, de acordo com as instruções
- 6) contidas no Anexo II, “Diluições e soluções”, deste Manual.
- 7) Semear 1 mL de cada diluição selecionada em placas de Petri estéreis.
- 8) Adicionar cerca de 15 a 20 mL de PCA fundido e mantido em banho-maria a  $46-48^\circ\text{C}$ .
- 9) Homogeneizar adequadamente o ágar com o inóculo.
- 10) Deixar solidificar em superfície plana.
- 11) 5.3 Incubação: Incubar as placas invertidas a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 48 horas.
- 12) 5.4 Leitura: Segundo o tipo de amostra em análise, realizar a leitura
- 13) selecionando as placas de acordo com o seguinte critério, contando todas as colônias
- 14) presentes:
- 15) Produtos em geral: Placas que contenham entre 25 e 250 colônias;
- 16) Amostras de água: Placas que contenham entre 30 e 300 colônias.

### **Resultados:**

A partir dos dados obtidos, calcular o número de microrganismos presentes na amostra em análise, seguindo as instruções contidas no Anexo IV, “Procedimentos para contagem de colônias”, deste Manual. Expressar o resultado em UFC/g ou mL.

## **Anexo G – Procedimento para contagem de colônias**

### **Introdução**

A aplicação de procedimentos de controle durante o processo analítico visa à garantia da confiabilidade do resultado final, assegurando a sua repetibilidade, precisão e exatidão. A precisão e a exatidão do método também dependerão da correta observação e aplicação dos procedimentos padronizados estabelecidos para a área analítica. A garantia da validade dos resultados da contagem estará assegurada quando os resultados dos controles indicarem não haver qualquer falha em nenhuma etapa do processo analítico.

### **Recomendações Gerais**

- ✓ Sempre utilizar mais de uma placa, seja uma duplicata da mesma diluição, seja duas ou mais diluições diferentes.
- ✓ As contagens deverão ser realizadas imediatamente após o período de incubação das placas.
- ✓ Na impossibilidade de realizar a contagem imediatamente após o período de incubação, manter as placas sob refrigeração em temperatura de 4°C a 7°C por um período não superior a 24 horas.
- ✓ Esse procedimento não deve tornar-se uma prática rotineira.
- ✓ Para a contagem, selecionar placas que contenham um número de colônias que se encontre dentro do intervalo de precisão e repetibilidade estabelecido pelo método em uso (por exemplo, 20 a 200 colônias, 25 a 250 colônias, etc).
- ✓ As colônias deverão ser contadas com o auxílio de contador de colônias equipado com placa de vidro ou acrílico, com diâmetro compatível com o das placas utilizadas, dividido milimetricamente em quadrantes com 1 cm<sup>2</sup> de área e com iluminação artificial uniforme.
- ✓ O contador de colônias deverá ter capacidade para aumento de 1 a 2 vezes, com dispositivo de regulagem de altura para melhor ajuste do foco, podendo ainda dispor de sistema eletrônico ou manual de registro das contagens.
- ✓ O contador de colônias deverá estar localizado em local onde não haja incidência direta de luz sobre a plataforma de apoio da placa, para evitar possíveis enganos na identificação das colônias.
- ✓ Utilizar o estereoscópio para observação de características morfológicas das colônias, para diferenciar microrganismos de partículas da amostra ou do meio e para seleção e isolamento de colônias.
- ✓ Verificar sempre a proporcionalidade dos resultados obtidos nas diluições sucessivas.



## Cálculos e Registros

Expressão de resultados de contagem; No cálculo das contagens, o resultado final será expresso em UFC/g ou mL, levando-se em conta a diluição empregada, da seguinte maneira:

$$R = a \times 10^b \text{ UFC/g ou mL}$$

R = resultado

a = os dois primeiros algarismos significativos, números de 0 a 9

b = expoente (0 a 10)

UFC = unidade formadora de colônias

g = grama e mL= mililitro

### Exemplos:

Diluição 10<sup>-2</sup> (1:100) Média das contagens: 25 UFC

Resultado:  $25 \times 100 = 2.500 = 2,5 \times 10^3 \text{ UFC/g ou mL}$

Diluição 10<sup>-3</sup> (1:1.000)

Média das contagens: 38 UFC

Resultado:  $38 \times 1.000 = 38.000 = 3,8 \times 10^4 \text{ UFC/g ou mL}$

O resultado final será expresso considerando-se os dois primeiros algarismos representativos, separados por vírgula. Os algarismos subsequentes, quando existirem, deverão ser arredondados e transformados em potência de 10.

## **Anexo H - Técnica de Fermentação em Tubos Múltiplos para determinação do Número Mais Provável (NMP)**

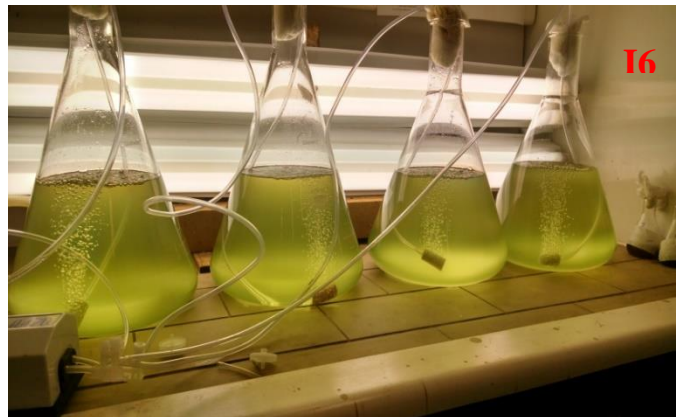
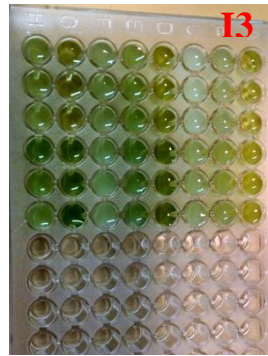
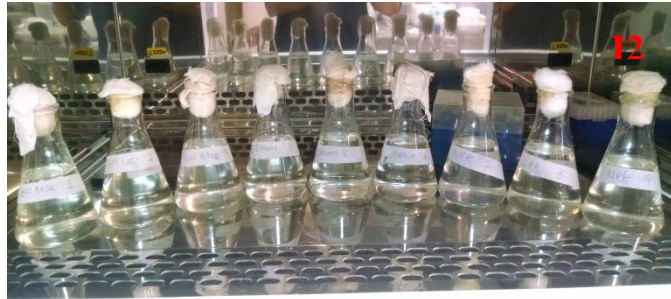
### **Introdução**

A técnica dos tubos múltiplos é um método probabilístico onde partir dela é possível determinar o Número Mais Provável de bactérias do grupo coliforme em 100 ml de água (NMP/100 ml). O NMP visa estimar a densidade de microrganismos presente na amostra de água ou alimentos baseados na frequência de resultados positivos. Costumam ser aplicados para a pesquisa de coliformes em água e alimentos e tem como objetivo estimar o número de coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli*.

### **Procedimento**

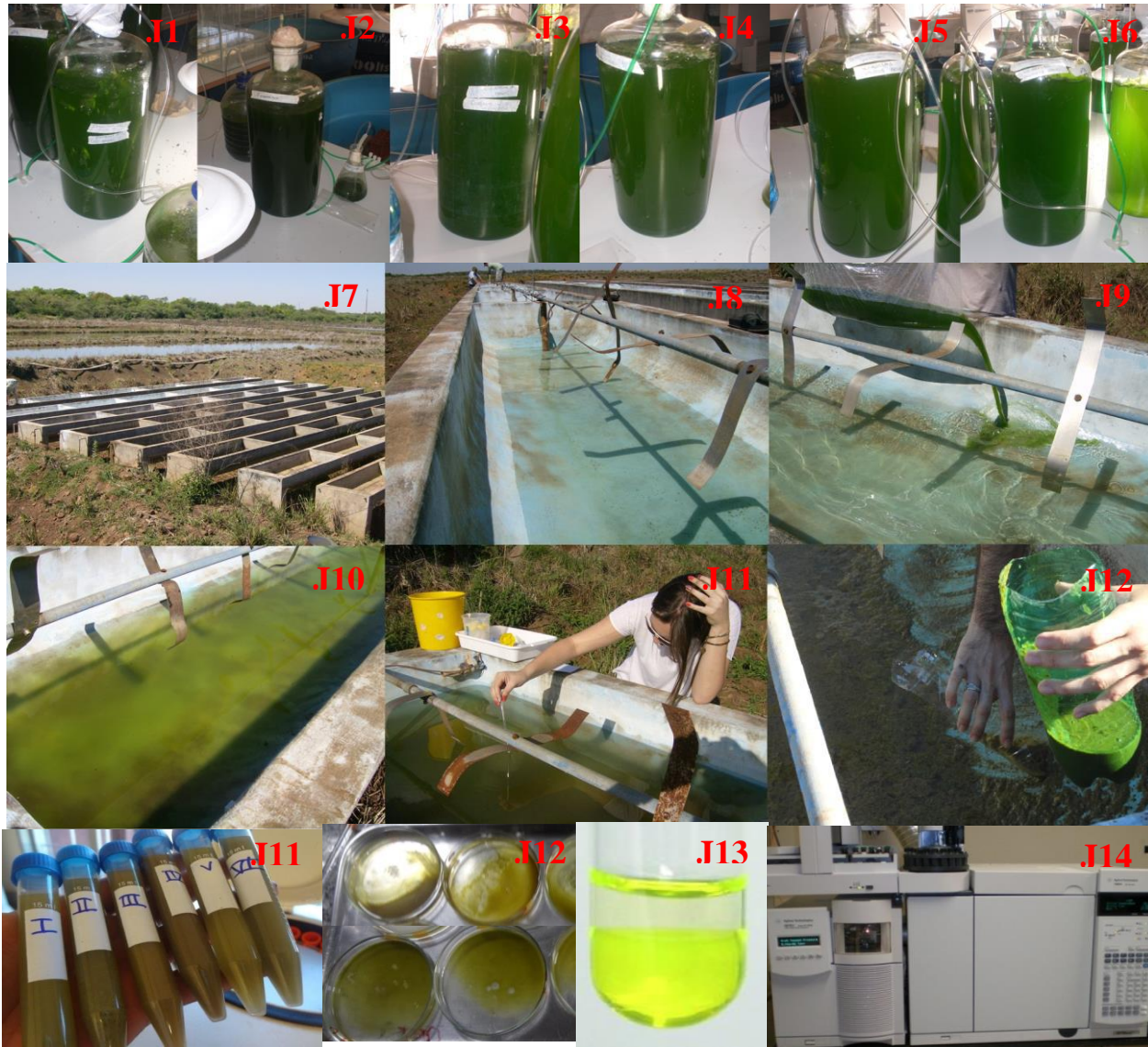
- 1) Transferiu-se 10 porções de 10mL da amostra para tubos contendo 10mL de caldo Lauril Sulfato Triptose (LST), em concentração dupla com tubo de Durhan invertido.
- 2) Os tubos foram incubados a 35-37°C por 24-48h.
- 3) A partir dos tubos de LST com produção de gás e turvação (prova presuntiva positiva) transferiu-se, com o auxílio de uma alça de níquel-cromo, porções de cultura para os tubos contendo 7 a 10mL de Caldo Lactosado Bile Verde Brilhante (CLBVB) com tubos de Durhan invertidos.
- 4) Estes foram incubados a 35-37°C por 24- 100mL 100mL 100mL + TSD-C + TSD-R 48h, sendo turvação e produção de gás a prova confirmatória positiva para coliformes totais.
- 5) A partir dos tubos de caldo LST com resultados positivos transferiu-se uma alçada para os tubos contendo 7 a 10mL de caldo EC com tubos de Durhan invertidos.
- 6) Os tubos foram incubados em banho-maria a 44,5°C durante 24h  $\pm$  2h, sendo a turvação e a produção de gás a prova considerada positiva para coliformes fecais.
- 7) Foi calculado o número mais provável de coliformes (NMP/100mL).

## Anexo I – Imagens relacionadas ao capítulo 2



I1 e I2) Pré-Inóculo, I3) Microplaca, I4) Leitora de Microplacas, I5, I6, I7 e I8) Cultivos em Erlenmeyers de 6L em diferentes estágios.

## Anexo J – Imagens relacionadas ao capítulo 3



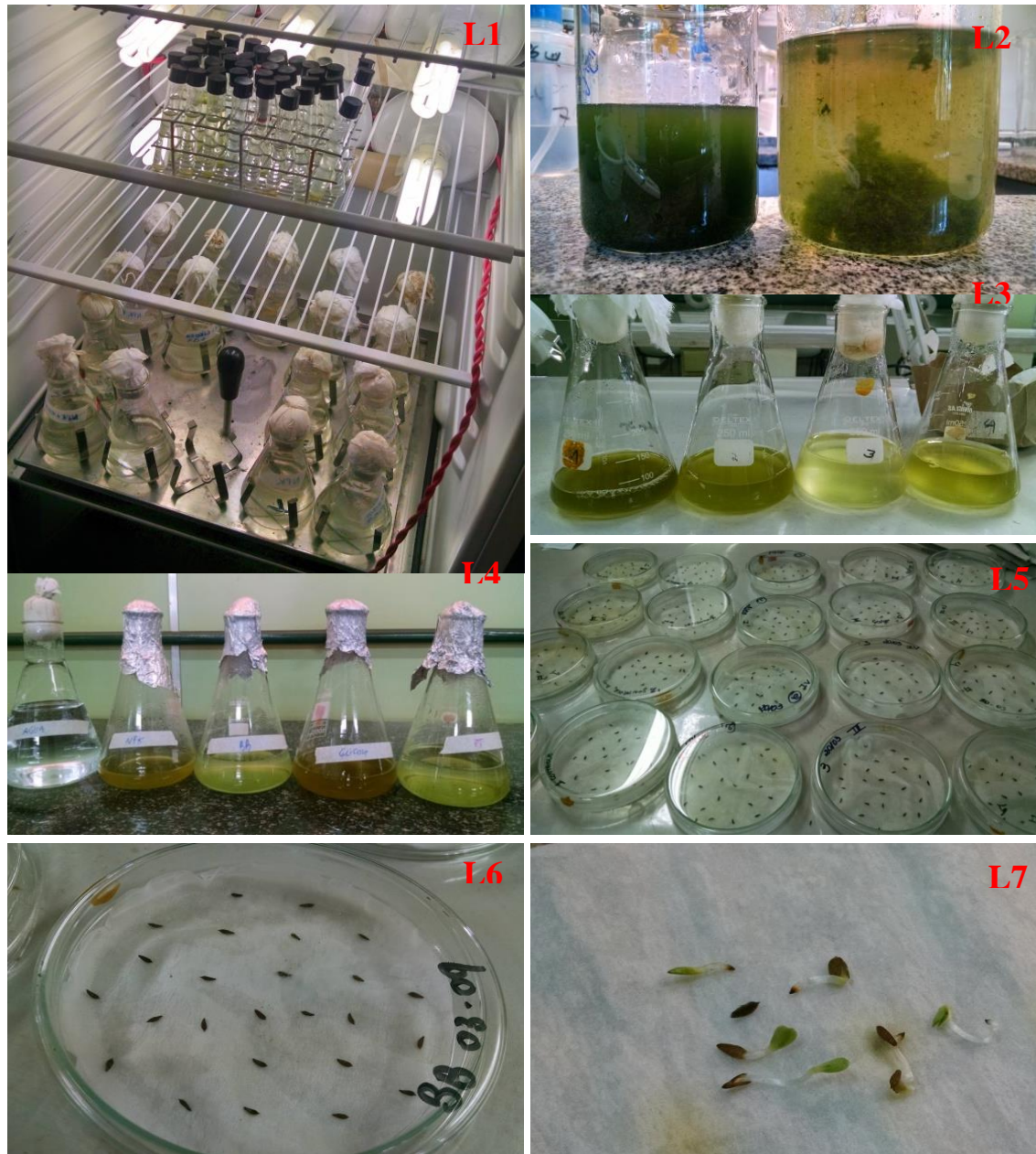
J1) *Chlorella* sp., J2) *Pseudokirchneriella subcapitata*, J3) *Coelastrum* sp., J4) *Coelastrum sphaericum*, J5) *Scenedesmus spinosus*, J6) *Scenedesmus acuminatus*, J7) Tanques de Cultivo, J8) Meio NPK no Tanque, J9) Inoculação, J10) Início do Cultivo, J11) Coleta de Amostras, J12) Recuperação da Biomassa, J11) Biomassa para análises, J12) Pesagem dos Lipídios, J13) Extração dos lipídios e J14) Cromatógrafo Gasoso CG-EM (Agilent, modelo 7890A).

## Anexo K – Imagens relacionadas ao capítulo 4



**K1)** Seleção dos alevinos, **K2)** Pesagem dos Alevinos, **K3)** Medição dos Alevinos **K4)** Cultivo da microalga e local dos experimentos, **K5)** Tanques, **K6)** Análises de Tubos Múltiplos, **K7)** Contagem de Colônias.

## Anexo L – Imagens relacionadas ao capítulo 5



**L1)** Cultivo em Diferentes Meios, **L2)** Separação da Biomassa, **L3)** Diferentes Concentrações de Microalgas, **L4)** Efluentes dos Diferentes Cultivos, **L5 e L6)** Sementes nas Placas de Petris, **L7)** Plântulas Germinadas.