

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS**

Alisson Alves da Silva

**ESTUDO FISIOLÓGICO DE MICROALGAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES
DE CULTIVO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

DOURADOS/MS

FEVEREIRO/2017

ALISSON ALVES DA SILVA

**ESTUDO FISIOLÓGICO DE MICROALGAS EM DIFERENTES CONDIÇÕES
DE CULTIVO**

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/2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S586e Silva, Alisson Alves Da

Estudo Fisiológico de Microalgas em Diferentes Condições de Cultivo /
Alisson Alves Da Silva -- Dourados: UFGD, 2017.

64f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Gustavo Graciano Fonseca

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Faculdade de
Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Biodiversidade. 2. Metabolismo. 3. Cultivo Heterotrófico. I. Título.

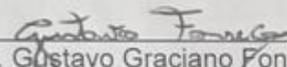
Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

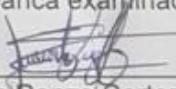


Termo de Aprovação

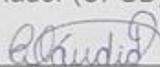
Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: "**Estudo fisiológico de microalgas em diferentes condições de cultivo**", de autoria de **Alisson Alves da Silva**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



Prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca
Presidente da banca examinadora



Prof. Dr. William Renzo Cortez Vega
Membro Examinador (UFGD)



Prof.^a Dr.^a Cláudia Roberta Damiani
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 24 de fevereiro de 2017.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, e aos meus pais e irmãos, por sempre estarem comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela força e coragem durante toda esta caminhada, por me dar força nos momentos de frustrações e por colocar pessoas boas no meu caminho.

A minha família, fonte de constante apoio e incentivo durante todos esses anos de estudo. Obrigado Pai e Mãe por me incentivarem e dizer que tudo iria dar certo.

A minha prima e amiga Anyele, pela companhia e apoio durante todos esses anos de estudos, pelos cafés e caronas. Aos meus amigos de todos os dias, Ândrea e Camila por dividirem comigo os problemas, as despesas e claro as alegrias, Jéssica, Ana e Lie pela amizade de sempre.

Aos integrantes do Grupo de Bioengenharia, especialmente Valkirea e Cinthia pelo conhecimento, Nathanya e Rose pela companhia e amizade durante estes anos.

Ao prof. Dr. Gustavo Graciano Fonseca, pela confiança em mim depositada.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A UFGD pela formação profissional proporcionada e pelo espaço físico para a execução da pesquisa.

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

Resumo

Neste trabalho foram desenvolvidos estudos onde se objetivou estudar a fisiologia e o crescimento de microalgas em diferentes condições de cultivo. O trabalho é apresentado em quatro partes, sendo a primeira uma introdução geral, seguida pelos capítulos onde foram divididos em três artigos e avaliadas diferentes estratégias de estudo. A primeira avaliação, capítulo dois, teve por objetivo conhecer a biodiversidade local de microalgas, foi realizado a bioprospecção de microalgas dulcícolas no município de Bonito-MS. A partir das amostras coletadas isolou-se sete táxons de microalgas. A segunda avaliação, capítulo três, objetivou-se estudar o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* em condições heterotróficas de cultivo, utilizando meio Basal Bold e NPK (nitrogênio, fósforo e potássio), suplementados com diferentes fontes de carbono. Dentre todos os tratamentos analisados o maior valor de velocidade específica máxima de crescimento encontrado foi de $0,030 \text{ h}^{-1}$ no tratamento utilizando meio Basal Bold suplementado com glicose. A terceira avaliação, capítulo quatro, teve por objetivo estudar o crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana* em meio Basal Bold em diferentes formas de cultivo. Dentre todos os tratamentos analisados o tratamento com concentração triplicada de sais de meio Basal Bold apresentou maior concentração celular. Devido a vários fatores que influenciam no crescimento das microalgas, estas apresentam diferentes comportamentos de acordo com a forma em que são cultivadas. A escolha de qual o melhor sistema para produção dependerá do objetivo do cultivo, o produto que se deseja, da espécie utilizada bem como das características da microalga.

Palavras-chave: Biodiversidade; Metabolismo; Cultivo heterotrófico.

Abstract

The aim of this work was to study the physiology and growth of microalgae in different culture conditions. It is presented in four parts, the first one being a general introduction, followed by the chapters where they were divided into three papers and evaluated different study strategies. The first evaluation, chapter two, aimed to know local microalgae biodiversity. Microalgae were prospected from freshwater in Bonito city. Seven microalgae taxa were isolated from the collected samples. The second evaluation, chapter three, aimed to study the growth of the microalgae *Chlorella vulgaris* under heterotrophic conditions of cultivation using Bold Basal medium and NPK (nitrogen, phosphorus and potassium), supplemented with different carbon sources. Among all the treatments analyzed, the highest value of specific growth rate found was 0.030 h^{-1} in the treatment using bold basal medium supplemented with glucose. The third evaluation, chapter four, aimed to study the growth of the microalga *Chlorella sorokiniana* in Basal Bold medium in different forms of cultivation. Among all the treatments analyzed, the treatment with triplicate concentration's Basal Bold medium salts presented higher cellular concentration. Due to several factors that influence the growth of microalgae, these have different behaviors according to the way in which they are cultivated. The choice of the best system for production will depend on the purpose of the crop, the desired product, the species used as well as the characteristics of the microalgae.

Keywords: Biodiversity; Metabolism; Heterotrophic culture.

SUMÁRIO

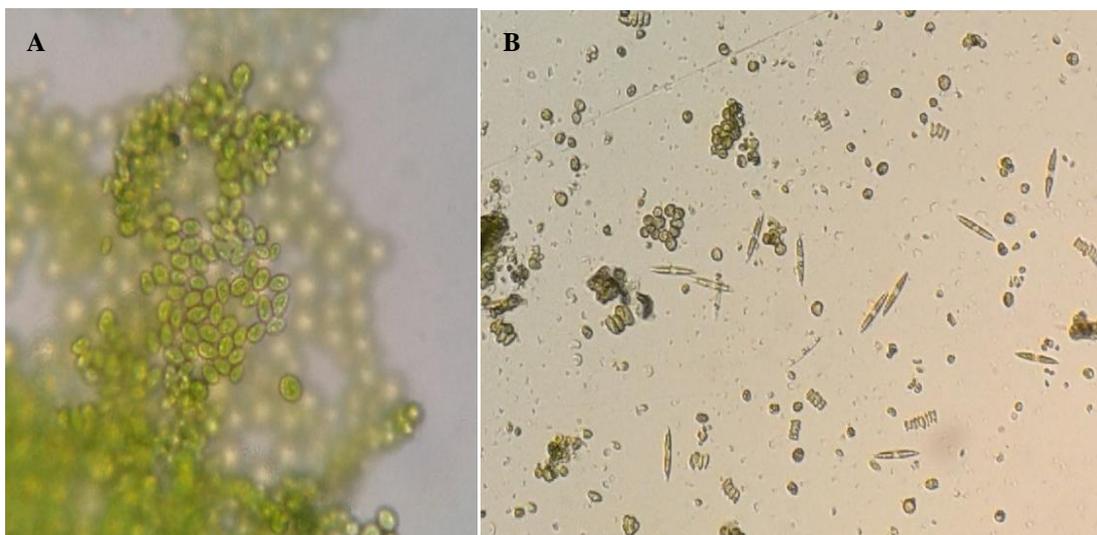
1	INTRODUÇÃO GERAL	7
1.1	Microalgas	7
1.2	Cultivo e Nutrientes	8
1.3	Aplicações de microalgas	10
1.4	<i>Chlorella</i>	11
1.5	Objetivo Geral	12
1.5.1	Objetivos Específicos	12
1.6	Referências	13
2	BIOPROSPECÇÃO DE MICROALGAS DE ÁGUA DOCE NA REGIÃO DE BONITO, MS	16
2.1	Introdução	16
2.2	Material e métodos	19
2.3	Resultados e discussão	19
2.4	Conclusão	23
2.5	Referências	24
3	CULTIVO HETEROTRÓFICO DE <i>Chlorella vulgaris</i> EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO	28
3.1	Introdução	28
3.2	Material e métodos	29
3.3	Resultados e discussão	32
3.4	Conclusão	36
3.5	Referências	37
4	AValiação DA INFLUÊNCIA DOS SAIS DE MEIO BASAL BOLD NO CRESCIMENTO DA MICROALGA <i>Chlorella sorokiniana</i>	40
4.1	Introdução	40
4.2	Material e métodos	41
4.3	Resultados e discussão	43
4.4	Conclusão	56
4.5	Conclusão geral	57
4.6	Referências	58
6	Anexos	63

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Microalgas

As microalgas (Figura 1) e as cianobactérias estão entre os seres vivos mais antigos da Terra e são responsáveis por pelo menos 60% da produtividade primária do planeta, podendo ser encontradas em ambiente marinho, em água doce e no solo (PORTUGAL, 2010).

Figura 1a,b - Microalgas



Fonte: o autor.

O termo microalgas é utilizado para definir seres unicelulares que possuem a capacidade de crescer com pouca água, poucos nutrientes e pouco dióxido de carbono, absorvendo a energia solar e utilizando fotossíntese como mecanismo para adquirir energia. Por meio da fotossíntese são capazes de criar biomassa e potenciais nutrientes, tais como proteínas, aminoácidos, lipídios, polissacarídeos, carotenoides e outras moléculas biologicamente ativas (ASHA et al., 2011; MULBRY et al., 2008).

O mecanismo fotossintético das microalgas é comparável ao das plantas terrestres, mas devido à sua estrutura celular simples e ao meio líquido em que vivem, apresentam trocas mais eficientes de água, CO₂ e nutrientes com o meio do que as plantas superiores, o que conduz a taxas mais elevadas de conversão de energia solar em biomassa (CARLSSON et al., 2007).

1.2 Cultivo e Nutrientes

A facilidade de crescimento das microalgas permite que estas sejam cultivadas em várias formas de cultivo. Os princípios básicos de cultivo microbiano geralmente podem ser aplicados para microalgas. Chama-se de cultivo de organismos uma população que pode ser mantida viva em condições artificiais e controladas de crescimento, com finalidades diversas, desde a mera manutenção dos organismos vivos até o aproveitamento econômico da biomassa formada. Para haver um cultivo de microalga é fundamental o conhecimento dos fatores que influenciam seu crescimento. Sendo assim, é necessário que o meio de cultura contemple as necessidades nutricionais das microalgas, uma vez que, uma mesma espécie pode ter variação na sua composição celular de acordo com as condições do cultivo (PORTUGAL, 2010).

A taxa de crescimento das microalgas é influenciada por vários fatores como a intensidade luminosa, o fotoperíodo, a temperatura, o pH, a salinidade, a concentração dos nutrientes, a agitação do meio, o tamanho do inóculo, a natureza do meio de cultura, a precipitação, a evaporação e a contaminação (SOARES, 2000). De acordo com este mesmo autor, dentre os parâmetros mais relevantes podemos destacar a luz como um fator fundamental, sendo fonte de energia para a fotossíntese. A radiação utilizada na fotossíntese pelos pigmentos fotossintetizantes presentes nas microalgas, está dentro do espectro visível da luz (400-700 nm). A intensidade luminosa, o fotoperíodo e o comprimento de onda têm influência direta sobre o crescimento das mesmas. Assim, variações na intensidade luminosa influenciam as taxas de crescimento, o volume celular, as necessidades nutritivas, a assimilação do nitrogênio, a atividade enzimática e a composição bioquímica. A temperatura mínima para que ocorre a fotossíntese é variável de acordo com cada espécie.

O tipo de meio, se estático ou sob agitação também pode afetar as taxas de crescimento. Cultivos realizados em meio sob agitação, em geral são benéficos ao crescimento das microalgas, devido à distribuição homogênea de nutrientes e da luz, as maiores trocas gasosas, e por evitar a formação de grumos e sedimentação das células. As microalgas apresentam uma grande dependência do pH do meio de cultura. Cada microalga apresenta um pH ótimo de cultura que se situa entre 7 e 8 (SOARES, 2000).

O crescimento das microalgas requer recursos minerais que estão presentes no meio. Nutrientes como carbono, nitrogênio, fósforo, hidrogênio e oxigênio são

necessários para manutenção e crescimento de culturas microalgais. Assim como cálcio, magnésio, enxofre e potássio, que devem estar presentes em quantidades relativamente elevadas e por isso são chamados de macronutrientes. Ferro, manganês, cobre, molibdênio e cobalto são exigidos em menor quantidade sendo assim chamados de micronutrientes. A necessidade de cada nutriente varia de acordo com cada espécie (GRAHAM, 2009).

As microalgas podem ser cultivadas de diferentes formas, divididos em dois grupos: cultivos abertos e fechados. Os cultivos abertos podem ser subdivididos em águas naturais (lagos e lagoas) e lagos artificiais. Enquanto os sistemas fechados são denominados fotobiorreatores. Os sistemas abertos são os que mais se assemelham com o habitat natural das microalgas realizados em tanques com 15 a 20 cm de profundidade e com pás que promovem a aeração do cultivo. Esse modo de cultivar possui alguns inconvenientes, como perdas por evaporação, contaminações e difusão de CO₂. Além disso, necessita-se de grandes áreas inundadas para que haja um crescimento significativo de microalgas, uma vez que os tanques não podem apresentar grandes profundidades, pois, isso dificulta a incidência luminosa (PULZ, 2001).

Os cultivos em fotobiorreatores fechados diferem dos cultivos abertos, principalmente, pelo fato de tornar possível o controle de diversos parâmetros importantes, como temperatura, luminosidade, além da difusão gasosa, a contaminação e a evaporação. Outra vantagem desse tipo de cultivo é a utilização de fotobiorreatores compactos, o que reduz as áreas necessárias para o cultivo de microalgas (PULZ, 2001).

Os meios de cultura utilizados para a produção de microalgas podem ser completamente sintéticos, baseados em águas naturais enriquecidas com minerais ou águas residuais, ricas em matéria orgânica e compostos azotados e fosfatados (SOARES, 2000).

Dentre os modelos de cultivos existentes, na maioria das vezes é possível identificar as quatro fases de crescimento: 1) Fase lag ou adaptação; 2) Fase log ou exponencial; 3) Fase estacionária; 4) Fase de declínio ou morte celular (DERNER, 2006).

1.3 Aplicações de microalgas

Vários esforços tem sido realizados na tentativa de melhorar os sistemas de cultivo visando maior produção de biomassa para aplicações industriais. Na aquicultura, as microalgas são empregadas como fonte primária de alimento para larvas, organismos jovens e até de adultos de moluscos, bem como alimentos para crustáceos e peixes. Também na aquicultura, a presença das microalgas podem proporcionar a melhoria da qualidade de água por meio da absorção de produtos nitrogenados tóxicos (amônia e nitrito), desenvolvendo papel fundamental no balanço do oxigênio, do dióxido de carbono e dos compostos nitrogenados, sobretudo a amônia (PORTUGAL, 2010).

Além de sua importância na aquicultura, as microalgas também constituem uma fonte de matéria prima para a indústria farmacêutica. A espécie *Dunaliella salina*, por exemplo, quando encapsulada é usada como fonte de produção de β - caroteno, glicerol e de proteínas e como medicamento por seus efeitos anticancerígenos (SEBASTIEN; KLEIN, 2006).

As algas também são de grande valia dentro da indústria alimentar, farmacêutica e cosmética, podendo citar alguns exemplos, como o uso de algas macroscópicas, que têm propriedades altamente nutritivas, possuindo altos teores de vitaminas A, B1, B2, B6 e C, e ricas em potássio, ferro, cálcio e magnésio. São também utilizadas como suplementes nutritivos, como exemplo, *Spirulina*, *Chlorella* (vitamina C) e *Dunaliella* (β -caroteno). Adicionalmente os pigmentos β -caroteno e astaxantina, produzidos a partir da *Dunaliella salina* e *Haematococcus pluvialis*, respectivamente, substituem substâncias químicas e agentes corantes (SPOLAORE et al., 2006; GOUVEIA et al., 2010).

Conforme dito anteriormente, as microalgas tem aplicações em diversas áreas da biotecnologia, além de serem altamente produtivas e apresentarem alta qualidade e quantidade proteica. Desta forma, o cultivo de microalgas em larga escala em alguns países tem se estabelecido como atividade industrial, onde sua produção está sob responsabilidade de algumas empresas como Cyanothech (Figura 1.1), OceanNutrion e InnovalG, as quais tem como objetivo a obtenção de biomassa e extração de compostos de interesse industrial (PORTUGAL, 2010). Também podemos citar o uso das microalgas no tratamento de efluentes (DAL MAGRO et al., 2011) e na produção de bioetanol (COSTA; MORAIS, 2011).

Figura 1.1 – Empresa Cyanothech



Fonte: Cyanothech, 2016.

As microalgas são também um recurso energético sustentável com um grande potencial para fixação de CO₂, produção de biocombustíveis, produtos de extração como carotenoides, ácidos graxos poliinsaturados, biofertilizantes, vitaminas e enzimas. Essas características vantajosas e de grande interesse econômico destacam a importância de desenvolver pesquisas relacionadas a tecnologia de cultivo de microalgas (PORTUGAL, 2010).

1.4 *Chlorella*

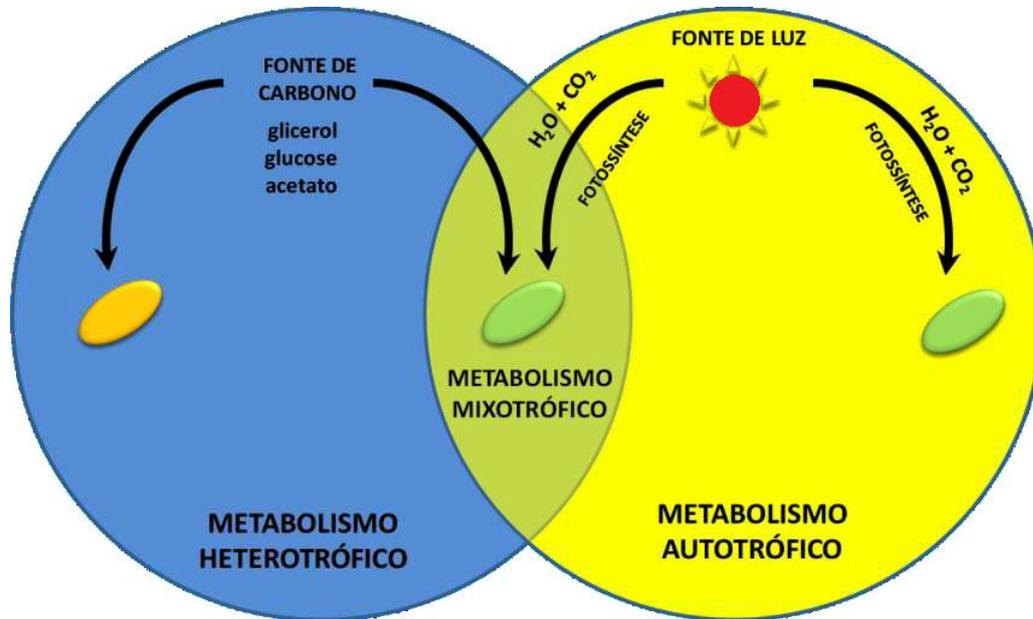
Dentre as microalgas mais estudadas, encontram-se as do gênero *Chlorella*. Este gênero apresenta inúmeras aplicações comerciais e podem ser cultivados em condições autotróficas, heterotróficas e mixotróficas (WAN et al., 2011).

O gênero *Chlorella* possui a capacidade de se adaptar a diversas condições ambientais e nutricionais. Podem ser encontrados em lagoas e lagos, colonizando o solo ou como simbiontes em protozoários ciliados (WEHR; BAINHA, 2003). Apresentam forma de vida unicelular ou colonial (KLOCK, 2010).

De acordo com os estudos taxonômicos e bioquímicos, as microalgas podem apresentar as seguintes formas de metabolismo (Figura 1.2): (1) autotrófico: quando a energia é obtida de fonte luminosa e o carbono de fonte inorgânica, pela fotossíntese; (2) heterotrófico: quando a energia e o carbono são obtidos de fonte orgânica externa,

em geral pela oxidação de açúcares; (3) mixotrófico: quando a fotossíntese e a oxidação de compostos orgânicos ocorrem concomitantemente (BUMBAK et al., 2011; PEREZ-GARCIA et al., 2011).

Figura 1.2 - Metabolismos das microalgas



Fonte: Adaptado de Mariano et al., (2010).

1.5 Objetivo Geral

Com o presente estudo objetivou-se: conhecer a biodiversidade local de espécies de microalgas e avaliar o crescimento de microalgas em diferentes condições de cultivo, verificados por meio de parâmetros cinéticos e concentração celular.

1.5.1 Objetivos Específicos

Conhecer a biodiversidade e coletar informações a respeito de espécies de microalgas no município de Bonito-MS;

Estudar o metabolismo heterotrófico da microalga *Chlorella vulgaris* e o tipo de fonte de carbono que contribui mais com seu crescimento;

Estudar o crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana* em meio Basal Bold sob diferentes formas de cultivo.

1.6 Referências

ASHA, P.; NIRA, K. S.; ASHOK, P.; EDGARD, G.; DATTA, M. Cyanobacteria and microalgae: A positive prospect for biofuels. *Bioresour. Technol.* 2011.

BUMBAK, F.; COOK, S.; ZACHLEDER, V.; HAUSER, S.; KOVAR, K. Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Heidelberg. 2011.

CARLSSON, A.; BEILEN, J.; MOLLER, R.; CLAYTON, D. *Micro and Macro-Algae: Utility for industrial applications*, CPL Press. 2007.

COSTA, J. A. V.; MORAIS, M. G. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresource Technology*. 2011.

CYANOTHECH. Cyanotech Corporation. Disponível em:
<<https://www.cyanotech.com>> Acesso em 28 de novembro de 2016.

DAL MAGRO, C.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L.M. Remoção de cromo VI e DQO de meio de cultivo adicionado de efluente com elevada concentração de cromo a partir da microalga *Spirulina platensis*. In: Simpósio Nacional de Bioprocessos, 18., 2011, Caxias do Sul. Anais. Caxias do Sul: Editora da UCS. 2011.

DERNER, R. B. Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. 2006. 140 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Florianópolis, 2006.

GOUVEIA, L.; MARQUES, A.; SOUSA, J.; MOURA, P. E BANDARRA, N. Microalgae Source of natural bioactive molecules as functional ingredients, *Food Science and Technology Bulletin: Functional Foods*. 2010.

- GRAHAM, L. E.; GRAHAM, J. M.; WILCOX, L. W. Algae. 2. Ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 616 p. 2009.
- KLOK, J. A. Optimization of lipid production in microalgae, Wageningen University: Wageningen, NL. 224 p. 2010.
- MARIANO, A. B.; RAMOS, L. P.; VARGAS, J. V. C; PULLIAN, R.; BALMANT, W.; MORAIS, K. C. C.; DZUMAN, M. J.; ARANTES, A. C. C. Comparação de meios de cultivo autotróficos, mixotróficos e heterotróficos para produção de biomassa de microalga com foco em biocombustíveis e coprodutos. Congresso Brasileiro de Geração Distribuída e Energias Renováveis, 1., 2010. Curitiba, Pr. [s.n]. 2010.
- MULBRY, W.; KONDRAD, S.; BUYER, J. Treatment of dairy and swine manure effluents using freshwater algae: fatty acid content and composition of algal biomass at different manure loading rates. 2008.
- PEREZ GARCIA, O.; DE- BASHAN, Y.; PUENTE, M. E. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. Water Research. 2011.
- PORTUGAL, C. I. Avaliação do crescimento de microalgas importantes para a aquicultura cultivadas em diferentes concentrações de nutrientes. 2010. 46 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.
- PULZ, O. Photobioreactors: production systems for phototropic microorganisms. Applied Microbiology and Biotechnology. 2001.
- SEBASTIEN, N. Y.; KLEIN, V. L. M. Efeito do meio Erd Schreiber no cultivo das microalgas *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii* e *Isochrysis galbana*. Acta Sci. Biol. Sci. 2006.
- SOARES, B. J. R. Avaliação da possibilidade de tratamento de um efluente piscícola marinho por microalgas. 2000. 151 f. Dissertação (Mestrado em Hidrobiologia). Universidade do Porto, Faculdade de Ciências. Porto, 2000.
- SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial application of microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2006.

WAN M.; LIU P.; XIA J.; ROSENBERG J. N.; OYLER G. A.; BETENBAUGH M. J.;
The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content and expression levels of
three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011.

WEHR J. R.; BAINHA. *Freshwater Algae da América do Norte: Ecologia e
classificação, Aquático Série Ecologia*, Academic Press, San Diego. 2003.

2 BIOPROSPECÇÃO DE MICROALGAS DE ÁGUA DOCE NA REGIÃO DE BONITO, MS

2.1 Introdução

O município de Bonito, localizado no estado de Mato Grosso do Sul situa-se a 265 km da capital do Estado (Campo Grande), é o principal município que integra o complexo turístico do Parque Nacional da Serra da Bodoquena. A vegetação do município revela o domínio do Cerrado nas fisionomias arbórea densa, gramíneo-lenhosa, e apresenta contato com Floresta Estacional e Floresta Estacional Decidual. Conta com o Parque Nacional da Serra da Bodoquena, criado em novembro de 2000, com 76.400 ha. O Município de Bonito pertence à Bacia Hidrográfica do Paraguai, Sub-bacia do Miranda. Os rios da região tem origem em rochas calcárias. Em Bonito, os rios possuem características peculiares: como a transparência das águas. As águas cristalinas ocorrem devido à geologia da região rochosa e principalmente pela presença do calcário (COMTUR, 2016).

Uma longa e complexa combinação de processos geológicos e evolutivos fizeram das nascentes da região sistemas naturais de elevada biodiversidade, com alto grau de unicidade e beleza cênica. A formação geológica do Planalto da Bodoquena explica parte da plasticidade das surgências. Estudos mostram que o subsolo do planalto é formado por rochas calcárias puras, originadas há 550 milhões de anos. A pureza e a antiguidade das rochas tornam as águas límpidas (BOGGIANI et al., 1999). O calcário dissolvido na água absorve e decanta as poucas impurezas restantes, tornando a água mais cristalina ainda. Em alguns locais, a visibilidade debaixo da água chega a 60 m de profundidade, uma das águas mais transparentes do mundo (SABINO; ANDRADE, 2002).

O desenvolvimento geomorfológico associado a este terreno calcário é conhecido como carste ou fenômeno cárstico. Esse fenômeno caracteriza-se pela dissolução das rochas calcárias expostas e a consequente formação de feições diferenciadas de relevo. Destacam-se neste ambiente, cavernas, abismos, dolinas, condutos subterrâneos, sumidouros, ressurgências e olhos d'água (ALMEIDA, 2005; BOGGIANI, 1999).

A rica biodiversidade da região da Serra da Bodoquena é resultado de anos de evolução biológica. Uma complexa combinação de fatores naturais permite que plantas aquáticas, peixes e toda sorte de invertebrados coexistam em nascentes de águas absolutamente cristalinas (Figura 2). Em conjunto, os organismos formam uma intrincada trama de vida, que conecta desde uma alga unicelular até os grandes predadores dos rios (SABINO, 2002).

Figura 2 - Nascente do rio Sucuri



Fonte: Sabino, 2002.

Este ambiente possui uma grande riqueza em recursos naturais, sendo o local de moradia de diferentes espécies de animais, portanto é necessário preservá-lo para manter suas características e sua biodiversidade. A preocupação com as questões ambientais tem se tornado cada vez mais evidentes em função da demasiada utilização de recursos naturais em processos produtivos, acarretando assim, a poluição desses recursos pelas indústrias (BARCELLOS et al., 2009). O uso de técnicas baseadas em processos biológicos tornou-se uma alternativa interessante no combate à poluição e na geração de novos produtos, uma vez que esses processos utilizam-se do metabolismo microbiano para degradar e remover poluentes (GADD, 2009), bem como, para transformar matérias primas gerando produtos menos nocivos ao meio ambiente. Nesses processos, existe uma gama de micro-organismos atuantes, como bactérias (CHEN et al., 2009), fungos (AKAR; TUNALI, 2006) algas e microalgas (SARAVANAN et al., 2009). Neste contexto, o destaque tem sido dado às microalgas de diversas espécies,

onde podemos citar alguns exemplos já utilizadas no tratamento de efluentes e na biossorção de metais tóxicos (MEZZOMO et al., 2010; DAL MAGRO et al., 2011), na biofixação de CO₂ (MORAIS; COSTA, 2007) e na produção de biocombustíveis (XU; MI, 2011).

Neste sentido, as microalgas vêm sendo isoladas do ambiente e cultivadas para diversos fins, não só com objetivo de recuperação ambiental e ecológica, como também para fins comerciais. Além disso, a biomassa das algas pode ter aplicações de interesse econômico. Por meio do cultivo é possível avaliar a ecofisiologia de espécies, a qual não poderia ser observada e acompanhada em campo, tais como o ciclo de vida, a plasticidade e a resposta das algas a diferentes variáveis ambientais, permitindo inclusive auxiliar na sistemática biológica dos grupos (LOURENÇO, 2006).

Para que seja possível a realização de estudos com microalgas, é necessário que se faça a coleta das mesmas. Ao realizarmos a busca e a coleta local nos ambientes aquáticos disponíveis da região, diminui-se gastos com a compra de cepas de microalgas já isoladas, além de contribuir com informações a respeito da biodiversidade local. Neste sentido, a bioprospecção de microalgas locais, com capacidade de se adaptarem ao cultivo *in vitro* é o primeiro passo para a realização de estudos mais complexos e obtenção de matéria-prima algácea efetivamente viável.

Adicionalmente, a bioprospecção de espécies é fator preponderante para o conhecimento da biodiversidade local e desenvolvimento sustentável, além de evitar a introdução de espécies oriundas de outras localidades, com riscos de introdução de espécies alóctones. A bioprospecção também contribui para a criação de coleções de cultivo de microalgas para a região, suprimindo dessa forma a demanda de organismos nos mais variados segmentos da pesquisa científica (MENDES et al., 2012). Dessa forma este estudo foi realizado com o objetivo de conhecer a biodiversidade de espécies de microalgas no município de Bonito-MS.

2.2 Material e métodos

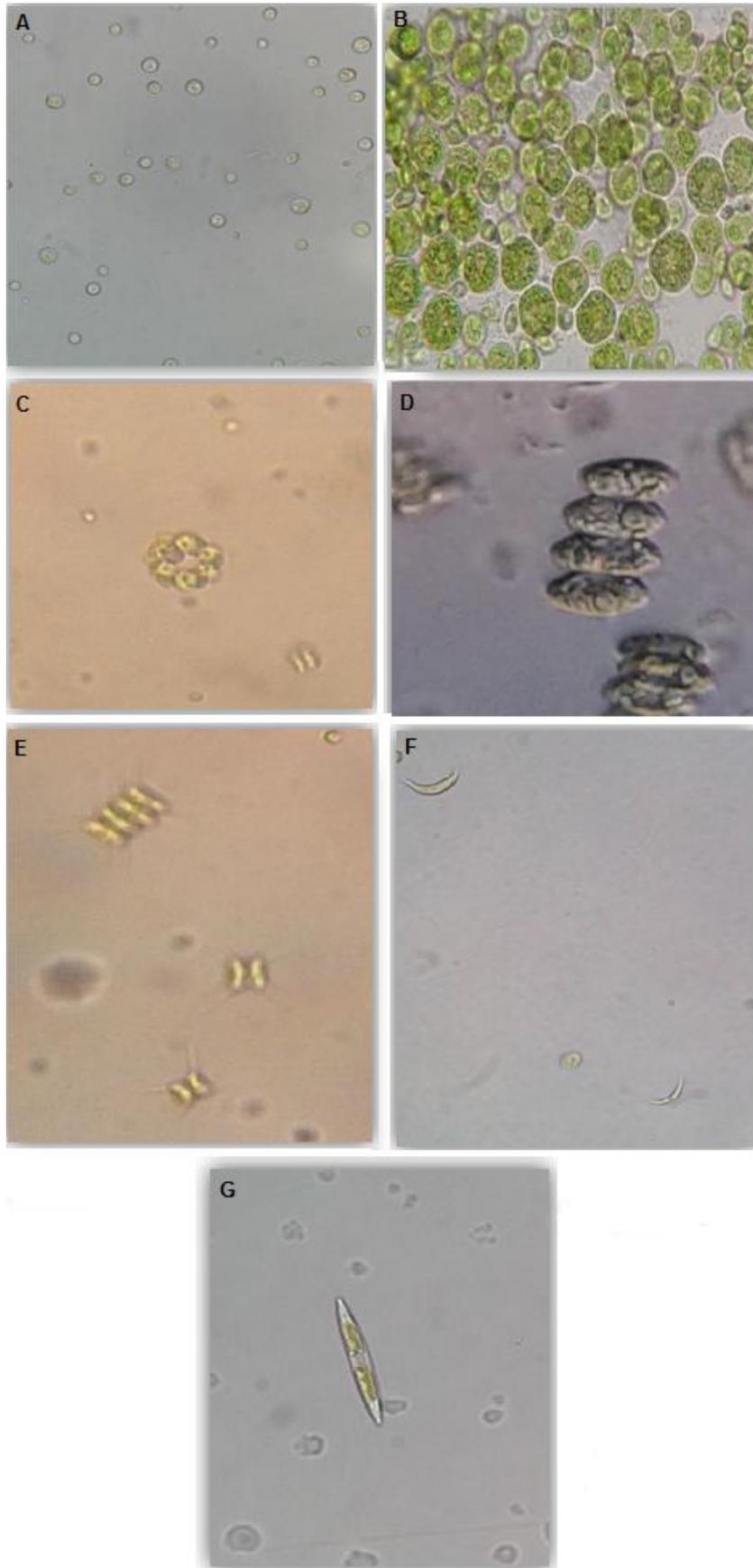
As coletas foram realizadas no município de Bonito-MS, em duas lagoas da região (21°02'18.9"S 56°33'23.7"W) e (21°02'21.0"S 56°33'04.3"W). Ambas as lagoas são cercadas por vegetações, gramíneas, arbustos e árvores, o solo da região é calcário e pedregoso, as lagoas possuem vegetação em seu interior e água variando de cristalina para turva. As amostras foram coletadas em garrafas Pet de 500 mL e armazenadas em uma caixa térmica para serem transportadas ao laboratório de bioengenharia da UFGD. As amostras foram então plaqueadas em meio Basal Bold (BISCHOFF; BOLD, 1963), polimerizados com Agar, previamente esterilizados em autoclave (121°C, 15 min). Após o plaqueamento foram mantidos em estufa BOD (MA 415 Marconi), a 25°C, com iluminação de 8 klux. Depois do crescimento das colônias, as mesmas foram repicadas em novas placas estéreis para isolamento. O isolamento foi feito em repiques sucessivos, com uma alça de platina, por meio da técnica de esgotamento por estrias. Foi utilizado um microscópio ótico para observação das microalgas e para verificação da pureza das colônias. Após o isolamento das colônias, as amostras foram cultivadas novamente em erlenmeyers com meio Basal Bold líquido (Tabela 1, anexo) para identificação. As culturas isoladas foram colocadas em placas de petri, com meio Basal Bold polimerizado com Agar e armazenadas em estufa BOD a 3°C.

As espécies foram identificadas de acordo com suas características morfológicas, tendo como base os bancos de dados de microalgas, Algae base, Culture collection of autotrophic organisms, Algário online, e, referências da literatura, trabalhos como o de Comas González (1996), Fanés et al., (2009), Komárek e Marvan (1992), Menezes e Bicudo (2006; 2008), Round (1990), Mendes et al., (2012), Godinho et al., (2010), Ramos et al., (2012). As imagens foram obtidas com o auxílio do microscópio ótico.

2.3 Resultados e discussão

Como resultado da bioprospecção, a partir das amostras coletadas isolou-se sete táxons de microalgas (Figura 2.1), quatro em nível de gênero e três em nível de espécie, sendo um da classe Trebouxiophyceae, cinco da classe Chlorophyceae e um da classe Bacillariophyceae. As características das microalgas são descritas a seguir.

Figura 2.1 – Microalgas bioprospectadas



Onde: 2.1A *Chlorella* sp; 2.1B *Chlorococcum* sp; 2.1C *Coelastrum* sp; 2.1D *Desmodesmus brasiliensis*; 2.1E *Desmodesmus communis*; 2.1F *Monoraphidium caribeum*; 2.1G *Nitzschia* sp. Fonte: O autor.

Classe Trebouxiophyceae

Família Chlorellaceae

Chlorella sp (Fig. 2.1A)

Células jovens elipsóides e as adultas esféricas, isoladas ou em pequenos aglomerados transitórios. Cloroplasto único, parietal ocupando nem sempre a totalidade da célula, presença ou não de pirenóide. Reprodução por 2-4-8 autósporos. Autósporos elípticos.

Classe Chlorophyceae

Família Chlorococcaceae

Chlorococcum sp (Fig. 2.1B)

Células esféricas com tamanhos variados, solitárias ou formando grupos, sem mucilagem. Cloroplasto poculiforme ou em forma de uma esfera que preenche internamente toda a célula. Com o aumento do material genético ocorre aumento no tamanho e o cloroplasto assume a forma estrelar. Pirenóide com capa de amido descontínua. Vacúolos contráteis. Reprodução por zoósporos elipsoidais.

Família Scenedesmaceae

Coelastrum sp (Fig. 2.1C)

Células esféricas, piramidal ou cubóide, pólos cônicos arredondados. Cenóbios esféricos, com células unidas diretamente por suas paredes. Cloroplasto único, parietal, com pirenóide. Reprodução assexuada. As células variam de forma desde esféricas, elipsóides, tetraédricas até poligonais e podem possuir um número de apêndices mais ou menos longos que as unem entre si. O único cloroplastídeo existente em cada célula tem a forma de copo (poculiforme) e um pirenóide mais ou menos central.

Desmodesmus brasiliensis (Fig. 2.1D)

Células elípticas, pólos arredondados. Cenóbios com quatro células alinhadas linearmente. Parede celular com costelas longitudinais às vezes descontínuas. Cloroplasto único, parietal com pirenóide. Podem aparecer espinhos diminutos em volta do cenóbio ou nem aparecem.

Scenedesmus quadricauda / *Desmodesmus communis* (Fig. 2.1E)

Cenóbios com quatro ou mais células alinhadas linearmente, raramente 32 células dentro do cenóbio. Células elípticas, pólos arredondados obtusos/ truncados, diferenciados pela presença de espinhos, respectivamente em suas extremidades, geralmente quatro espinhos.

Desmodesmus communis é mundialmente conhecida e amplamente distribuída geograficamente sob a combinação *Scenedesmus quadricauda* (Turpin) Brébisson sensu Chodat (1913, 1926), a qual foi substituída por Hegewald (1977) por *S. communis* Hegewald e, posteriormente, por Hegewald (2000) por *D. communis* Hegewald. Características bastante variáveis nesta espécie são as dimensões das células e dos espinhos. Hegewald (2000) propôs a nova combinação de *D. communis* e nela incluiu a maior parte das variedades taxonômicas de *S. quadricauda*, onde permanece até os dias atuais sem qualquer outra mudança.

Família Selenastraceae

Monoraphidium caribeum (Fig. 2.1F)

Células solitárias, arqueadas em um semicírculo, ligeiramente afilado nas extremidades; cloroplasto parietal e sem pirenoídes. A espécie é cosmopolita e é encontrada principalmente no plâncton e perifíton de ambientes aquáticos eutróficos.

Classe Bacillariophyceae

Família Bacillariaceae

Nitzschia sp. (Fig. 2.1G)

Forma cilíndrica com os ápices arredondados. Dois plastídios dispostos simetricamente, sendo um em cada lado do plano medial transapical.

As espécies aqui estudadas demoraram bastante tempo para se adaptarem as condições de cultivo em laboratório, devido ao fato do meio de cultivo não representar as condições específicas do habitat natural das microalgas, que por sua vez possui características próprias e que em laboratório é difícil reproduzir fielmente as mesmas condições. É importante também salientar que cada espécie tem suas exigências nutricionais.

Todas as espécies aqui apresentadas conseguiram se desenvolver no meio de cultivo, porém, nem todas as espécies encontradas nas lagoas foram passíveis de adaptação às condições *in vitro* de cultivo.

As águas da região apresentam alta concentração de carbonato de cálcio, estando sujeitas a receber fragmentos de rochas existentes na superfície que sedimentam na água. Por outro lado, o pouco que entra em suspensão, logo é depositado pela precipitação do carbonato. Esta característica torna a água dos rios muito límpida, o que favorece a atividade biológica (BOGGIANI, 1999).

Não são relatados com frequência estudos envolvendo a coleta e identificação de microalgas na região do Mato Grosso do Sul, o que dificulta o conhecimento da biodiversidade local no âmbito de espécies promissoras de microalgas, que podem ser melhor estudadas para posteriores aplicações de interesse industrial. Mendes et al., (2012) relatam em seu trabalho a necessidade da criação de novas coleções de microalgas, visto que, regiões como norte e centro-oeste são as mais carentes neste aspecto.

2.4 Conclusão

Foram isolados sete táxons de microalgas, quatro em nível de gênero e três em nível de espécie. Concluindo dessa forma que no município de Bonito-MS, existem microalgas passíveis de cultivo em condições *in vitro*.

2.5 Referências

AKAR, T.; TUNALI, S. Biosorption characteristics of *Aspergillus flavus* biomass for removal of Pb(II) and Cu(II) ions from an aqueous solution. *Bioresource. Technology*. 2006.

ALGAE BASE. Disponível em: < <http://www.algaebase.org/>>; Acessado em 10 de Outubro de 2015.

ALGARIO ONLINE. Disponível em:
<<http://www1.ci.uc.pt/pessoal/nunogdias/algario/frameset.html>> Acessado em 15 de Setembro de 2015.

ALMEIDA, M. A. Política de desenvolvimento e estruturação do espaço regional da área da Bodoquena em Mato Grosso do Sul. 2005. 393f. Tese (Doutorado em Geografia). Universidade Estadual Paulista, Presidente Prudente. 2005.

BARCELLOS, F. C.; OLIVEIRA, J. C.; CARVALHO, P. G. M. Investimento ambiental em indústrias sujas e intensivas em recursos naturais e energia. *Revista Iberoamericana de Economia Ecológica*. 2009.

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

BOGGIANI, P. C. Por que bonito é bonito. In: SCREMIN-DIAS, Edna; POTT, Vali Joana. et al. *Nos jardins submersos da Bodoquena*. Campo Grande, MS: Ed. UFMS. 1999.

BOGGIANI, P. C.; SCREMIN-DIAS, E.; POTT, V. J.; HORA, R. C.; SOUZA, P. R. *Geologia da Bodoquena*. Pp.10-23. In: *Nos jardins submersos da Bodoquena: guia para identificação de plantas aquáticas de Bonito e região*. Editora da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 160p. 1999.

COMAS GONZÁLEZ, A. *Las Chlorococcales dulciacuícolas de Cuba*. Berlin, Stuttgart, Gebrüder Borntraeger Verlagsbuchhandlung. 1996.

CONSELHO MUNICIPAL DE TURISMO DE BONITO – COMTUR. Disponível em: <<http://www.turismo.bonito.ms.gov.br/>> Acesso em 11 de Dezembro de 2016.

CHEN, X.; HU, S.; SHEN, C.; DOU, C.; SHI, J.; CHEN, Y. Interaction of *Pseudomonas putida* CZ1 with clays and ability of the composite to immobilize copper and zinc from solution. *Bioresource Technology*. 2009.

CHODAT, R. Monographie d'algues en culture pure. Matériaux pour la Flore Cryptogamique Suisse. 1913.

CHODAT, R. *Scenedesmus*: étude de génétique, de systématique expérimentale et d'hydrobiologie. *Zeitschrift für Hydrologie*. 1926.

CULTURE COLLECTION OF AUTOTROPHIC ORGANISMS. Disponível em: <<http://ccala.butbn.cas.cz/en>>. Acessado em 10 de Setembro de 2015.

DAL MAGRO, C.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Remoção de cromo VI e DQO de meio de cultivo adicionado de efluente com elevada concentração de cromo a partir da microalga *Spirulina platensis*. In: Simpósio nacional de bioprocessos, 18., 2011, Caxias do Sul. Anais. Caxias do Sul: Editora da UCS. 2011.

FANÉS, I.; SÁNCHEZ, P.; COMAS, A. Contribution to the taxonomic study of the family Botryococcaceae (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) in southern Spain. *Cryptogamie Algologie*. 2009.

GADD, G. M. Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2009.

GODINHO, L. R.; GONZÁLES, A. A. C.; BICUDO, C. E. M. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga em São Paulo, SP. *Algas*, 30: Chlorophyceae (família Scenedesmaceae). Hoehnea. São Paulo. 2010.

HEGEWALD, E. *Scenedesmus communis* Hegewald, a new species and its relation to *Scenedesmus quadricauda* (Turp.) Bréb. Algological Studies. 1977.

HEGEWALD, E. New combinations in the genus *Desmodesmus* (Chlorophyceae, Scenedesmaceae). Algological Studies. 2000.

KOMARÉK, J.; MARVAN, P. Morphological Diff. in Natural Populations of the Genus *Botryococcus* (Chlorophyceae). Archiv fuer Protistenkunde. 1992.

LOURENÇO, S.O. Cultivo de microalgas marinhas – Princípios e aplicações. Rima, São Carlos, SP. 588p. 2006.

MENDES, M. C. Q.; GONZALEZ, A. A. C.; MENEZES, M.; NUNES, J. M. C.; PEREIRA, S.; NASCIMENTO I. A. Coleção de microalgas de ambientes dulciaquícolas naturais da Bahia, Brasil, como potencial fonte para produção de biocombustíveis: uma abordagem taxonômica. Acta Bot. Brasil. 2012.

MENEZES, M.; BICUDO, C. E. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil, chave para identificação e descrições. 2º Ed. Rima. São Carlos. 502p. 2006.

MENEZES, M.; BICUDO, C. E. Flagellate green algae from four water bodies in the state of Rio de Janeiro, Southeast Brazil. Hoehnea. 2008.

MEZZOMO, N.; SAGGIORATO, A. G.; SIEBERT, R.; TATSCH, P. O.; LAGO, M. C.; HEMKEMEIER, M.; COSTA, J. A. V.; BERTOLIN, T. E.; COLLA, L. M. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2010.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina sp.* and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. Journal of Biotechnology. 2007.

RAMOS, G. J. P.; BICUDO, C. E. M.; GOES NETO, A.; MOURA, C. W. N. *Monoraphidium* and *Ankistrodesmus* (Chlorophyceae, Chlorophyta) from Pantanal dos Marimbus, Chapada Diamantina, Bahia State, Brazil. Hoehnea. 2012.

ROUND, F. E.; CRAWFORD, R. M; MANN, D. G. The Diatoms, Biology & Morphology of the Genera. Cambridge, Cambridge University Press. 1990.

SABINO, J. Planalto da Bodoquena: Natureza em estado de graça. Revista, Os Caminhos da Terra. 2002.

SABINO, J.; ANDRADE L. P.; Monitoramento e conservação no rio Baía Bonita, região de Bonito, Mato Grosso do Sul, Brasil. In: Anais do Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação, 3., 2002. P 397-404. Rede Pró-Unidades de Conservação, Fundação Boticário de Proteção à Natureza e Associação Caatinga. Fortaleza, Ceará. 876p. 2002.

SARAVANAN, A.; BRINDHA, V.; MANIMEKALAI, R.; KRISHNAN, S. An evaluation of chromium and zinc biosorption by a sea weed (*Sargassum sp.*) under optimized conditions. Indian Journal of Science and Technology. 2009.

XU, R.; MI, Y. Simplifying the process of microalgal biodiesel production through in situ transesterification technology. Journal of the American Oil Chemists' Society. 2011.

3 CULTIVO HETEROTRÓFICO DE *Chlorella vulgaris* EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO

3.1 Introdução

Uma das espécies de microalgas mais estudadas é a *Chlorella vulgaris*, sendo cultivada desde 1960 no Japão, sendo que, em 1980, já existiam aproximadamente 26 fábricas de grande escala na Ásia, produzindo cerca de 1000 Kg de biomassa por mês (SPOLAORE et al., 2006).

A *Chlorella vulgaris* tem composição celular média de aproximadamente 20% de gordura, 45% de proteína, 20% de carboidrato e 10% de minerais e vitaminas (PHUKAN et al., 2011) e também pode acumular pigmentos como clorofila *a* e *b*, β -caroteno e xantofilas. A sua forma de reserva de carbono intracelular é o amido (KLOK, 2010).

Segundo Azma et al., (2011), a capacidade de crescer heterotroficamente está presente em vários gêneros de microalgas e tem relação principal com as seguintes características: (1) permeabilidade celular à fonte de carbono orgânica, (2) transporte ativo da fonte de carbono orgânico e (3) fatores enzimáticos presentes no interior da célula.

Além da capacidade de oxidar compostos orgânicos presentes no meio externo e produção em larga escala, de acordo com Bumbak et al., (2011) é desejável que as cepas apresentem características como, capacidade de oxidar uma fonte de carbono orgânico com baixo custo de produção, se possível, esterilizável. Adaptar-se rapidamente às condições de cultivo, ou seja, possuir fase lag curta, apresentar taxas de crescimento específico compatíveis com a produção em larga escala em curto espaço de tempo, pois, cepas com altas taxas de crescimento específico tendem a se sobrepor em relação a outros microrganismos que possam contaminar o sistema de cultivo. Também é necessário apresentar alta taxa de sobrevivência e conservar suas características após cultivos sucessivos, ou após períodos de armazenamento a baixas temperaturas. Outros fatores importantes é a possibilidade de serem cultivadas em biorreatores convencionais, já desenvolvidos para outros microrganismos, como as leveduras. Resistir aos estresses mecânicos (hidrodinâmico) e químicos impostos pelo sistema de

produção, resistir ao processo de colheita adotado durante a produção e não serem tóxicas, no caso do produto ser um composto para fins alimentares.

Segundo Isleten-Hosoglu et al., (2012), microalgas do gênero *Chlorella* são as que apresentam maior potencial para a produção heterotrófica em larga escala. Xu et al., (2006), também relatam a capacidade do gênero *Chlorella* de se adaptar às condições do cultivo, podendo crescer autotrófica, heterotrófica e mixotroficamente.

A utilização do metabolismo heterotrófico é questionada no sentido de ser necessária a adição de uma fonte de carbono orgânica para o crescimento da microalga, o que pode acarretar custos adicionais (FENG et al., 2011; LIANG, 2013). A glicose, o acetato e o glicerol são as fontes de carbono mais utilizadas (BONINI, 2012).

O objetivo deste estudo foi conhecer o metabolismo heterotrófico da *Chlorella vulgaris* e o tipo de fonte de carbono que contribui mais com o seu crescimento.

3.2 Material e métodos

A microalga utilizada foi a *Chlorella vulgaris*. Os testes foram realizados utilizando-se dois meios de cultura para o cultivo da microalga, meio Basal Bold (BISCHOFF; BOLD, 1963) (Tabela 1, anexo). E meio NPK (Tabela 2, anexo) de baixo custo, preparado a partir do fertilizante químico N:P:K (20:5:20) de acordo com Sipaúba-Tavares e Rocha (2003). Ambos esterilizados em autoclave (121°C, 15 min).

Os pré-inóculos foram preparados em frascos erlenmeyer de 250 mL, com os dois meios de culturas citados anteriormente. Após esterilização foram mantidos em estufa BOD (MA 415 Marconi) equipada com agitador rotatório orbital a 200 rpm e fotoperíodo de 24 horas com 8 klux, durante 7 dias a 25°C. Os pré-inóculos são necessários para garantir a viabilidade das células e adaptação ao modo de cultivo. O pH dos cultivos manteve-se em torno de 6-7, por não sofrerem grande variação, não houve necessidade de ajuste.

As microplacas foram preparadas com os dois meios (250 µL) testados, sendo adicionado nos poços 50 µL do pré-inóculo no meio Basal Bold e o mesmo valor para o meio NPK. Foram avaliados os seguintes tratamentos com três repetições cada:

- Meio BB (sem fonte de carbono);

Tratamento 01 = Meio BB + glicose (10 g.L⁻¹);

Tratamento 02 = Meio BB + frutose (10 g.L⁻¹);

Tratamento 03 = Meio BB + sacarose (10 g.L⁻¹);

Tratamento 04 = Meio BB + glicerol (10 g.L⁻¹);

Tratamento 05 = Meio BB + acetato de sódio (10 g.L⁻¹).

- Meio NPK (sem fonte de carbono);

Tratamento 06 = Meio NPK + glicose (10 g.L⁻¹);

Tratamento 07 = Meio NPK + frutose (10 g.L⁻¹);

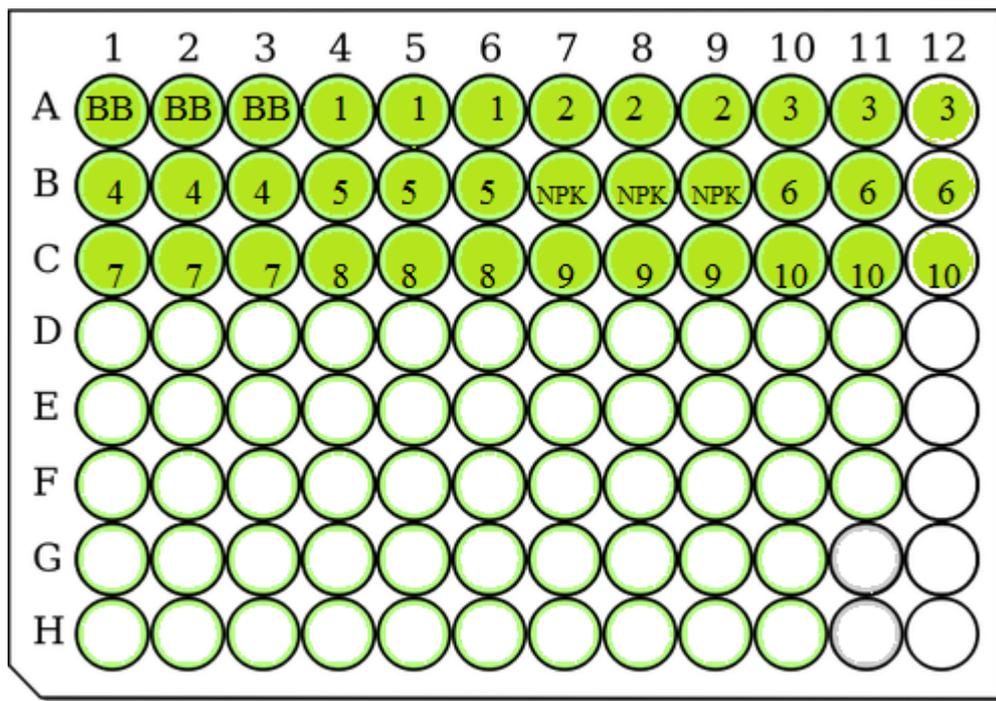
Tratamento 08 = Meio NPK + sacarose (10 g.L⁻¹);

Tratamento 09 = Meio NPK + glicerol (10 g.L⁻¹);

Tratamento 10 = Meio NPK + acetato de sódio (10 g.L⁻¹).

Os tratamentos foram organizados de acordo com a Figura 3.

Figura 3 – Disposição dos tratamentos na microplaca



Onde: (BB) = meio BB sem fonte de carbono; (1) = Meio BB + glicose; (2) = Meio BB + frutose; (3) = Meio BB + sacarose; (4) = Meio BB + glicerol; (5) = Meio BB + acetato de sódio; (NPK) = fertilizante NPK sem fonte de carbono; (6) = Meio NPK + glicose; (7) = Meio NPK + frutose; (8) = Meio NPK + sacarose; (9) = Meio NPK + glicerol; (10) = Meio NPK + acetato de sódio.

A microplaca foi mantida dentro da leitora durante todo o experimento, evitando contato com luz externa, para manter as condições heterotróficas. As leituras de absorvância foram feitas em leitora de microplacas Biochrom modelo Anthos Zenyth 200rt (Figura 3.1, anexo). A leitura foi realizada no comprimento de onda de 670 nm, a cada 30 segundos, durante 65 horas a 25°C.

A fase exponencial de crescimento foi identificada pela região linear sobre \ln da absorvância (ABS_{670}) em função do tempo de cultivo. A partir dos dados de absorvância calculou-se a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) e o tempo de duplicação (TD).

Os valores de absorvância medidos foram convertidos em valores de concentração celular, por meio de uma relação linear (unidades de densidade óptica por concentração de células), obtendo assim um fator de conversão.

3.3 Resultados e discussão

Comparando as velocidades específicas máximas de crescimento (μ_{\max}), entre as fontes de carbono estudadas (Tabela 2.1), pôde-se observar que os cultivos de microalgas suplementados com glicose apresentaram maiores valores de μ_{\max} , sendo observado no meio Basal Bold 0,030 h⁻¹, e no meio NPK 0,016 h⁻¹. As microalgas crescidas em meio NPK apresentaram este mesmo valor 0,016 h⁻¹ quando suplementado com sacarose. Outro estudo com microalgas cultivadas em diferentes fontes de carbono também apresentou maiores velocidades máximas de crescimento em cultivos heterotróficos suplementados com glicose, 0,042 h⁻¹ para *Chlorella vulgaris* e 0,09 h⁻¹ para *Aphanothece microscópica Nagelii* (BONINI, 2012). Gao et al., (2010) também obtiveram em cultivos de *Chlorella protothecoides* suplementados com glicose resultados de velocidade máxima específica de crescimento de 0,033 h⁻¹.

Para a concentração celular o maior valor também foi observado nos cultivos com glicose, cerca de 403,5 x 10⁴ cél.mL⁻¹.

Tabela 2.1. Parâmetros cinéticos dos cultivos com *Chlorella vulgaris* em diferentes fontes de carbono em meio Basal Bold e meio NPK.

Tratamento	μ_{\max} (h ⁻¹)	R ²	TD (h)	ABS max.	Conc. cel. (x 10 ⁴ cél.mL ⁻¹)
BB	0,020	0,968	34,145	0,31	164,61
BB+Glicose	0,030	0,990	23,260	0,76	403,56
BB+Frutose	0,015	0,941	45,304	0,71	377,01
BB+Sacarose	0,0202	0,9831	34,314	0,65	345,15
BB+Glicerol	0,0117	0,9825	59,243	0,51	270,81
BB+Acetato	0,013	0,986	53,319	0,53	281,43
NPK	0,012	0,9138	57,762	0,24	127,44
NPK+Glicose	0,0164	0,9461	42,265	0,52	276,12
NPK+Frutose	0,0118	0,9828	58,741	0,5	265,5
NPK+Sacarose	0,0166	0,9835	41,756	0,5	265,5
NPK+Glicerol	0,0103	0,9774	67,296	0,42	223,02
NPK+Acetato	0,0154	0,9897	45,010	0,52	276,12

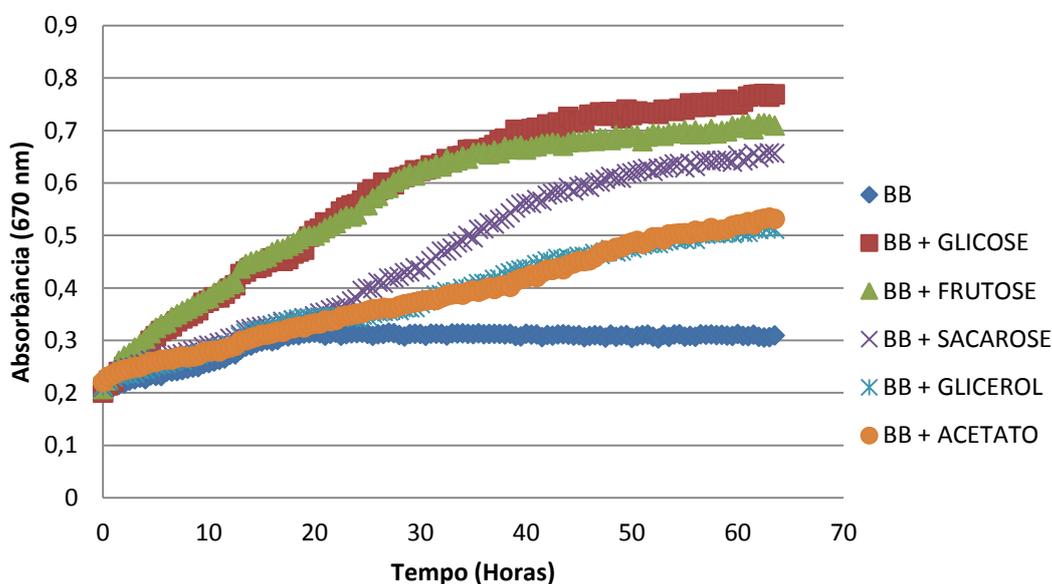
Onde: μ_{\max} : velocidade específica máxima de crescimento; R²: regressão linear; TD: tempo de duplicação; ABS max: absorbância máxima alcançada; Conc. cel.: Concentração celular (Fator de conversão = 531).

Os maiores valores de μ_{\max} encontrados nos cultivos com glicose, são justificados pelo fato de que em condições heterotróficas, a glicose é metabolizada principalmente pela via das pentose-fosfato, ao invés da glicólise (PEREZ-GARCIA et

al., 2011). O maior fluxo metabólico da via das pentose-fosfato pode explicar a maior velocidade de crescimento das microalgas quando cultivadas heterotroficamente na presença de glicose. Yang et al., (2000) verificaram que o cultivo heterotrófico de *Chlorella pyrenoidosa* gerou mais ATP a partir do fornecimento de glicose do que cultivos autotróficos e mixotróficos com energia fornecida pela luz.

Pôde-se observar através da curva de crescimento (Figura 3.2) que as microalgas cultivadas em meio BB contendo frutose e glicose como fonte de carbono apresentaram uma taxa de crescimento inicial semelhante. No entanto, após 35 horas de cultivo as microalgas cultivadas em meio contendo glicose apresentaram maior taxa de crescimento. Geralmente as taxas de respiração e crescimento celular tendem a ser melhores em meios contendo a glicose, do que em relação a outras fontes de carbono. Isto ocorre porque a glicose libera mais energia por mol do que outras fontes, por exemplo, o acetato libera $0,8 \text{ kJ mol}^{-1}$, enquanto que a glicose libera $2,8 \text{ kJ mol}^{-1}$ (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

Figura 3.2 – Cultivo de *Chlorella vulgaris* em meio BB com diferentes fontes de carbono.



Seguido da glicose e frutose, os cultivos de microalgas com sacarose apresentaram a segunda maior velocidade máxima específica de crescimento, com $0,020 \text{ h}^{-1}$ em meio BB e $0,0166 \text{ h}^{-1}$ em meio NPK. Este resultado é semelhante ao encontrado

por Gao et al., (2010), estes autores observaram μ_{\max} em torno de $0,019 \text{ h}^{-1}$ em seus ensaios com sacarose, porém a espécie utilizada foi a *Chlorella protothecoides*.

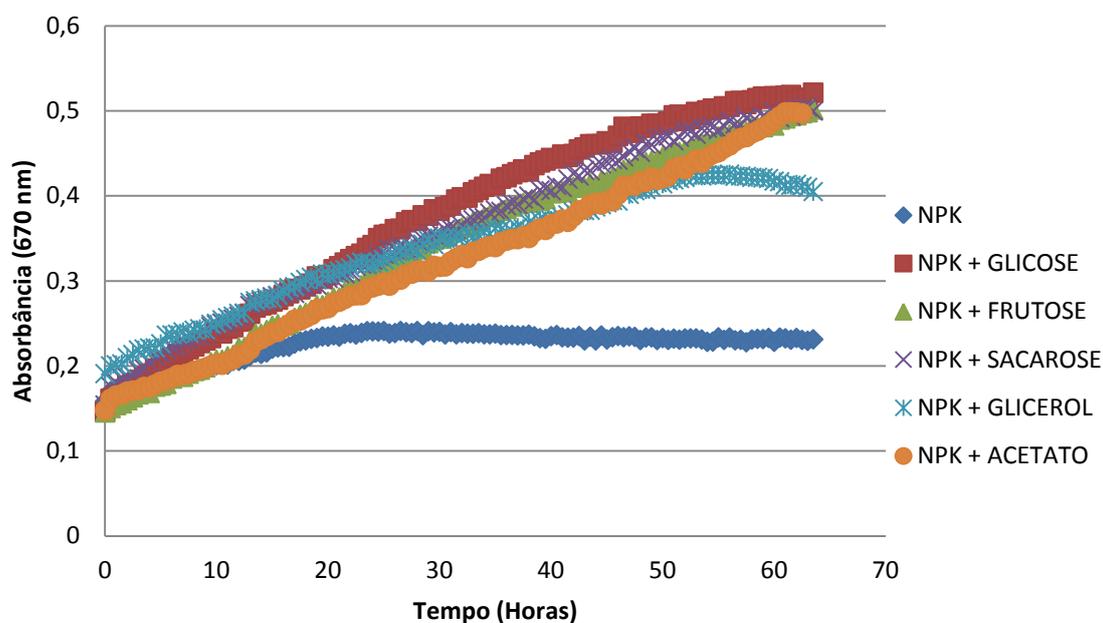
As microalgas cultivadas em meios suplementados com frutose apresentaram valor de velocidade máxima específica de crescimento de $0,015 \text{ h}^{-1}$ para o meio BB e $0,011 \text{ h}^{-1}$ para o meio NPK. Cerón et al., (2005), ao avaliar o crescimento heterotrófico de *Phaeodactylum tricoratum* em diferentes substratos encontraram valor próximo ao obtido neste experimento, cerca de $0,012 \text{ h}^{-1}$. Utilizando a mesma fonte de carbono Gao et al., (2010) encontraram valores de $0,017 \text{ h}^{-1}$ para *Chlorella protothecoides*.

Os cultivos de microalgas suplementados com glicerol e acetato apresentaram valores de μ_{\max} de $0,011 \text{ h}^{-1}$ e $0,013 \text{ h}^{-1}$, respectivamente para o meio BB e $0,010 \text{ h}^{-1}$ e $0,015 \text{ h}^{-1}$ para o meio NPK. Bonini (2012) também encontrou em seus resultados valores baixos para *Chlorella vulgaris*, $0,09 \text{ h}^{-1}$ cultivadas em glicerol e $0,007 \text{ h}^{-1}$ em acetato. Já Chen (2011), obteve um valor maior em seus cultivos de *Chlorella protothecoides* em glicerol $0,029 \text{ h}^{-1}$. Lee (2001) encontrou um valor próximo ao encontrado neste estudo, $0,014 \text{ h}^{-1}$ para *Haematococcus pluvialis* cultivada em acetato.

A utilização de sacarose como fonte de carbono é uma alternativa para diminuição do custo de produção de biomassa, uma vez que a glicose, a principal fonte utilizada possui alto valor comercial. Porém, é necessário que as microalgas possuam a enzima invertase para a realização da hidrólise da sacarose para posterior assimilação (PEREZ-GARCIA et al., 2011). O glicerol é assimilado e convertido a piruvato pela via glicolítica, o qual segue para o ciclo do ácido tricarboxílico. Logo, a assimilação de glicerol esta condicionada a uma disponibilidade de oxigênio maior, devido a etapa de fosforilação oxidativa, do que em cultivos com glicose, o que pode explicar em partes as menores velocidades de crescimento. Além disso, a via das pentose-fosfato parece ser inibida quando o glicerol é a única fonte de carbono, o que sugere período de adaptação e velocidades menores pela via glicolítica (BONINI, 2012). Já o acetato, carregado pela coenzima A, é geralmente oxidado metabolicamente pelos ciclos do glioxalato e do ácido tricarboxílico, sendo que os principais intermediários de ambas as vias são os mesmos metabólitos. O metabolismo via ciclo do glioxalato exige a síntese de determinadas enzimas, como a isocitrato liase e malato sintase, o que pode explicar a fase de adaptação verificada neste cultivo (PEREZ-GARCIA et al., 2011). Estas afirmações explicam o fato das microalgas apresentarem um tempo mais longo durante

a fase de adaptação (Figura 3.2), nos tratamentos com sacarose, glicerol e acetato, do que em relação aos demais tratamentos. Porém, nos cultivos com meio NPK (Figura 3.3) não foi possível observar estas fases de adaptação.

Figura 3.3 – Cultivo de *Chlorella vulgaris* em meio NPK com diferentes fontes de carbono.



Microalgas cultivadas em meio BB e NPK, sem adição de fonte de carbono apresentaram um aumento no valor de absorbância, explicado pelo fato de que os flashes emitidos pelo equipamento nos momentos da leitura, provavelmente desencadearam a fotossíntese. No entanto, por algum outro fator limitante, não foi observado crescimento contínuo e as microalgas mantiveram seu crescimento em fase estacionária. Em um experimento realizado por Emerson e Arnold (1932), os autores verificaram que flashes de luz de aproximadamente 0,1 s, são suficientes para que as etapas enzimáticas do processo de fotossíntese fossem completadas antes da chegada do flash seguinte.

Levando em consideração que os flashes de luz são suficientes para desencadear a reação de fotossíntese através da emissão da luz do equipamento, observou-se que as microalgas não apresentaram taxas de crescimento superiores. Podemos supor então, que ocorreu limitação de CO₂, necessário nas reações de fotossíntese. A limitação de

CO₂ pode ter ocorrido devido ao equipamento possuir um pequeno espaço em seu interior e este é mantido fechado durante todo o experimento, dificultando assim a circulação de gases presentes no ambiente. De acordo com Ishida et al., (2000) a adição de CO₂ no meio de cultivo pode aumentar em até sete vezes a multiplicação celular enquanto que a redução da disponibilidade de carbono pode limitar o crescimento microalgal.

Se compararmos o cultivo heterotrófico, com glicose como fonte de carbono, com cultivos autotróficos encontrados na literatura, podemos observar que o valor aqui encontrado, $403,5 \times 10^4$ cél.mL⁻¹, foi maior do que nos cultivos de *Chlorella sp.*, realizados por Silva (2011), que obteve um valor de 198×10^4 cél.mL⁻¹ em meio Basal Bold, e maior também que em *Thalassiosira weissflogii* encontrado por Portugal (2010), que foi de 52×10^4 cél.mL⁻¹. Já Ribeiro (2015), encontrou valores maiores, 743×10^4 cél.mL⁻¹ com *Chlorella sorokiniana*, em meio Basal Bold. O cultivo heterotrófico possui a desvantagem de um custo mais elevado, porém, quando comparado ao cultivo autotrófico, induz as microalgas a sintetizarem maiores quantidades de lipídeos e carboidratos (MIAO; WU, 2006; XU et al., 2006).

Dentre os meios de cultivos aqui testados, as microalgas apresentaram nos tratamentos do meio Basal Bold os maiores valores de velocidade específica máxima de crescimento, estes resultados concordam com os encontrados por Ribeiro (2015), que ao estudar diferentes meios de cultivo, também obteve os melhores resultados nos cultivos em que utilizou o meio Basal Bold. Segundo Perez Garcia et al., (2011), a adição de moléculas orgânicas nos meios de cultivo, pode ser utilizada como estratégia para aumentar as taxas de crescimento e obter altas concentrações celulares de microalgas, devido à sua incorporação no período escuro.

3.4 Conclusão

Concluiu-se que as microalgas apresentaram maior taxa de crescimento em meio Basal Bold, suplementado com glicose. Em meio NPK, a maior taxa de crescimento também ocorreu em meio suplementado com glicose.

Concluiu-se que, entre os dois meios utilizados para o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*, o meio Basal Bold é mais eficiente, pois induziu maior valor de velocidade específica máxima de crescimento ($0,030 \text{ h}^{-1}$).

3.5 Referências

AZMA, M.; MOHAMED, M. S.; MOHAMED, R.; RAHIM, R. A.; ARIFF., A. B. Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, Filadelfia. 2011.

BONINI, M. A. Cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscópica Nageli* e *Chlorella vulgaris* em Diferentes Fontes de Carbono e Vinhaça. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente). Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias. Araras, 2012.

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

BUMBAK, F.; COOK, S.; ZACHLEDER, V.; HAUSER, S.; KOVAR, K. Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Heidelberg. 2011.

CERÓN, G. M. C.; CAMACHO F. C.; MIRÓN, A. S.; SEVILLA, J. M. F.; CHISTI, Y.; GRIMA, M. Mixotrophic production of marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* on various carbon sources. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2005.

CHEN, Y. H.; WALKER, T. H. Biomass and lipid production of heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides* by using biodiesel-derived crude glycerol. *Biotechnol Lett.* Science+Business Media B.V. 2011.

EMERSON, R. ARNOLD W. *The Photochemical Reaction in Photosynthesis*. California Institute of Technology. *The Journal of General Physiology*. 1932.

FENG, Y.; LI, C.; ZHANG, D. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. *Bioresource Technology*. 2011.

GAO, C.; Zhai, Y.; Ding, Y.; Wu, Q. Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides*. School of Life Science, Tsinghua University, Beijing, Applied Energy. PR China. 2010.

ISHIDA, Y.; HIRAGUSHI, N.; KITAGUCHI, H.; MITSUTANI, A.; NAGAI, S.; YOSHIMURA, M. A highly CO₂- tolerant diatom, *Thalassiosira weissflogii* H1, enriched from coastal sea, and its fatty acid composition. Fisheries Science. 2000.

ISLETEN-HOSOGLU, M.; GULTPE, I.; ELIBOL, M. Optimization of carbon and nitrogen sources for biomass and lipid production by *Chlorella saccharophila* under heterotrophic conditions and development of Nile red fluorescence based method for quantification of its neutral lipid content. Biochemical Engineering Journal, Philadelphia. 2012.

KLOK, J. A. Optimization of lipid production in microalgae, Wageningen University. Wageningen, NL. 224 p. 2010.

LEE, K.Y. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. Journal of Applied Phycology, Singapore. 2001.

LIANG, Y. Production liquid transportation fuels from heterotrophic microalgae. Applied Energy. 2013.

MIAO, X.; WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. Bioresource Technology, Essex. 2006.

PEREZ GARCIA, O.; DE- BASHAN, Y.; PUENTE, M. E. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. Water Research. 2011.

PHUKAN, M. M. et al. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. Special Issue of Energy from algae: Current status and future trends. 2011.

PORTUGAL, C. I. Avaliação do crescimento de microalgas importantes para a aquicultura cultivadas em diferentes concentrações de nutrientes. 2010. 46 f.

Dissertação (Mestrado em Aquicultura), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

RIBEIRO, M. D. Estudo sobre cultivos e aplicações biotecnológicas de microalgas. 2015. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Universidade Federal da Grande Dourados. Dourados, 2015.

SILVA, M. C. C. P. Tratamento terciário de efluente secundário, usando a microalga *Chlorella* sp. Imobilizada em matriz de alginato de cálcio. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental), Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, PB, 2011.

SIPAÚBA-TAVARES L. H., ROCHA O. Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos. 2º Ed. São Carlos: Rima, 2003.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial application of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006.

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

YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochemical Engineering Journal*. 2000.

4 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS SAIS DE MEIO BASAL BOLD NO CRESCIMENTO DA MICROALGA *Chlorella sorokiniana*

4.1 Introdução

O estudo do cultivo de microalgas é importante para incrementar o conhecimento da biologia das diferentes espécies, favorecendo posterior produção em ambientes controlados. O desenvolvimento de formulações, meios de cultura adequados, permitirão a obtenção de um crescimento ótimo de cada espécie. Neste sentido, o objetivo de toda cultura de microalga é a maximização da conversão dos produtos fotoassimilados para a produção de material orgânico em larga escala (SIPAÚBA-TAVARES, 2009).

Uma das microalgas com grande potencial biotecnológico é a *Chlorella Sorokiniana*. O gênero *Chlorella* possui a capacidade de se adaptar a diversas condições ambientais e nutricionais (WEHR; BAINHA, 2003). A sua forma de reserva de carbono intracelular é o amido. No entanto, algumas espécies de microalgas podem acumular lípidos, sob condições ambientais adversas. Este fenômeno está relacionado com o *stress* nutritivo, geralmente caracterizado pela falta de nitrogênio ou fósforo (KLOK, 2010).

Estudos relacionados aos cultivos de microalgas em grande escala têm dado ênfase ao metabolismo autotrófico. No entanto, estes microrganismos apresentam grande versatilidade metabólica, a qual reflete as diversas condições dos habitat onde podem ser encontrados. Em muitas ocasiões, os habitat naturais das microalgas apresentam condições inadequadas para fotossíntese, principalmente em relação à luminosidade. Dessa maneira, durante a evolução das microalgas, diferentes formas de metabolismo foram selecionadas a fim de sustentar a sua manutenção e até mesmo o seu crescimento (BRUTEMARK; GRANÉLI, 2011; JEONG et al., 2010).

Esta diversidade metabólica das microalgas deve ser considerada durante o desenvolvimento dos sistemas de cultivo. Por isto, além dos cultivos autotróficos, nos últimos anos tem despontado estudos que destacam sistemas de cultivo heterotrófico e mixotrófico para produção destes microrganismos. A escolha do melhor sistema para produção dependerá do objetivo do cultivo, bem como das características da microalga.

Cada sistema apresenta vantagens, desvantagens e desafios tecnológicos próprios (ANGELO, 2014).

Neste sentido este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar o crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana* em meio Basal Bold em diferentes formas de cultivo.

4.2 Material e métodos

A microalga utilizada nos experimentos foi a *Chlorella sorokiniana* CTT 7727 obtida por meio da Fundação André Tosselo (Campinas, SP). Os pré-inóculos foram preparados e após esterilização foram mantidos em estufa BOD (MA 415 Marconi) equipada com agitador rotatório orbital a 200 rpm, fotoperíodo de 24 horas com 8 klux, durante 7 dias a 26°C. Foram realizados cultivos de *Chlorella sorokiniana* em diversos tratamentos, dispostos conforme a Tabela 3. Em todos os tratamentos utilizou-se erlenmeyers de 250 mL com meio Basal Bold (BISCHOFF; BOLD, 1963). Os meios foram esterilizados em autoclave (121°C, 15 min). As concentrações iniciais de microalgas dos cultivos foram de 17×10^4 cél.mL⁻¹, utilizando-se a Câmara de Neubauer para contagem. Todos os erlenmeyers foram tampados com algodão para facilitar as trocas gasosas. Foram realizados cultivos heterotróficos e autotróficos (Figura 4, anexo). Os erlenmeyers dos tratamentos heterotróficos foram envoltos em papel kraft para evitar qualquer contato com a luz, estes erlenmeyers foram mantidos em estufa BOD à temperatura de 26°C com agitação de 200 rpm. Os cultivos autotróficos foram mantidos nas mesmas condições, porém utilizando fotoperíodo de 24 horas com 8 klux.

Tabela 3. Tratamentos para o crescimento de *Chlorella sorokiniana*.

Tratamentos	Luz	Fonte de carbono	Pulso de sais de meio BB	Concentração de meio BB
1	x	CO ₂	-	1x
2*	x	CO ₂	-	1x
3	-	CO ₂	-	1x
4	-	CO ₂	2x	1x
5	-	CO ₂	-	3x
6	x	CO ₂	2x	1x
7	x	CO ₂	-	3x
8	-	Glicose(5 g.L ⁻¹)	-	1x
9	x	Glicose(5 g.L ⁻¹) CO ₂	-	1x

Onde: (*) Sem agitação no meio; (x) Presença; (-) Ausência.

Somente o tratamento 2 não foi submetido a agitação. Os pulsos de sais de meio Basal Bold utilizados nos tratamentos 4 e 6 estavam na concentração de 2x. Os pulsos utilizados foram elaborados a partir do meio de cultivo Basal Bold, porém com o dobro da concentração. Em cada pulso aplicado utilizou-se 10 mL do mesmo, sendo este realizado nas fases de declínio celular dos cultivos. As amostras foram retiradas periodicamente em câmara de fluxo laminar para realização da contagem e verificação da concentração celular. Para os cultivos heterotróficos as amostras foram retiradas no escuro. A contagem direta foi realizada em microscópio ótico usando Câmara de Neubauer, de acordo com o protocolo de Vega e Voltolina (2007).

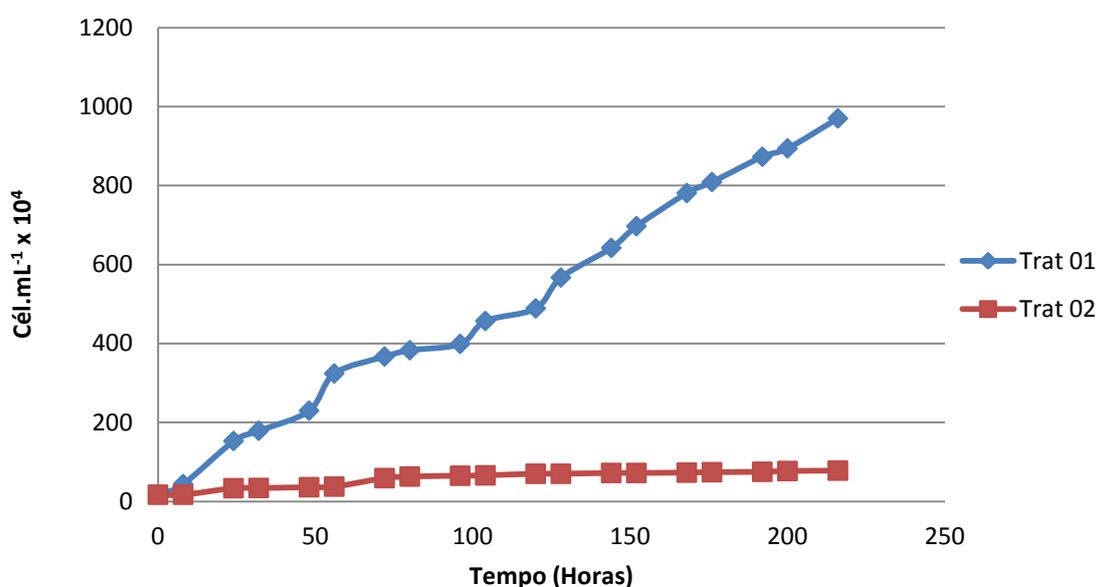
Para determinar o consumo dos substratos dos tratamentos 8 e 9 retiraram-se amostras periodicamente. As amostras retiradas foram centrifugadas em centrífuga de bancada em 15000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para determinar o substrato residual, por meio de UPLC Agilent 1290, equipado com coluna Rezex ROA – Organic Acid H⁺ (8%) (Phenomenex). A fase móvel utilizada foi ácido trifluoroacético (TFA) a 0,005 M, a uma vazão de 0,6 mL min⁻¹, com temperatura de 55°C e o volume injetado foi de 20 µL. Estes compostos foram detectados por um refratômetro diferencial Agilent 1260 (RID), acoplado a um módulo de aquisição de dados (adaptado de FONSECA et al., 2013).

A partir dos resultados com o tratamento 7, realizou-se mais uma avaliação, onde foram testadas em condições autotróficas, a capacidade de crescimento da *Chlorella sorokiniana* em condições de concentração de 6x, 8x e 10x de meio Basal.

4.3 Resultados e discussão

Inicialmente objetivou-se estudar a importância da agitação do meio de cultivo no crescimento das microalgas. A Figura 4.1 apresenta os perfis de concentrações celulares da microalga *Chlorella sorokiniana* cultivada em meio Basal Bold (BB) nos tratamentos 1 e 2 em condições autotróficas.

Figura 4.1 – Cultivo de *Chlorella sorokiniana* sob tratamentos 01, 02.



Onde: Trat 01 (1xBB, luz, CO₂); Trat 02 (1x BB, luz, CO₂, estático).

Verificou-se crescimento mais acentuado no cultivo realizado sob agitação do que no cultivo estático, em ambos os cultivos as microalgas tinham disponibilidade de luz e CO₂ para realização da fotossíntese. Em cultivos autotróficos, as células das microalgas utilizam energia solar e CO₂ como fonte de carbono para realização da fotossíntese (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004), desta forma, as microalgas convertem a energia luminosa em biomassa (ERIKSEN, 2008).

Durante a realização do experimento em meio sob agitação, as microalgas apresentaram uma velocidade máxima específica de crescimento de $0,014 \text{ h}^{-1}$, enquanto que em meio estático um valor bem menor $0,0056 \text{ h}^{-1}$.

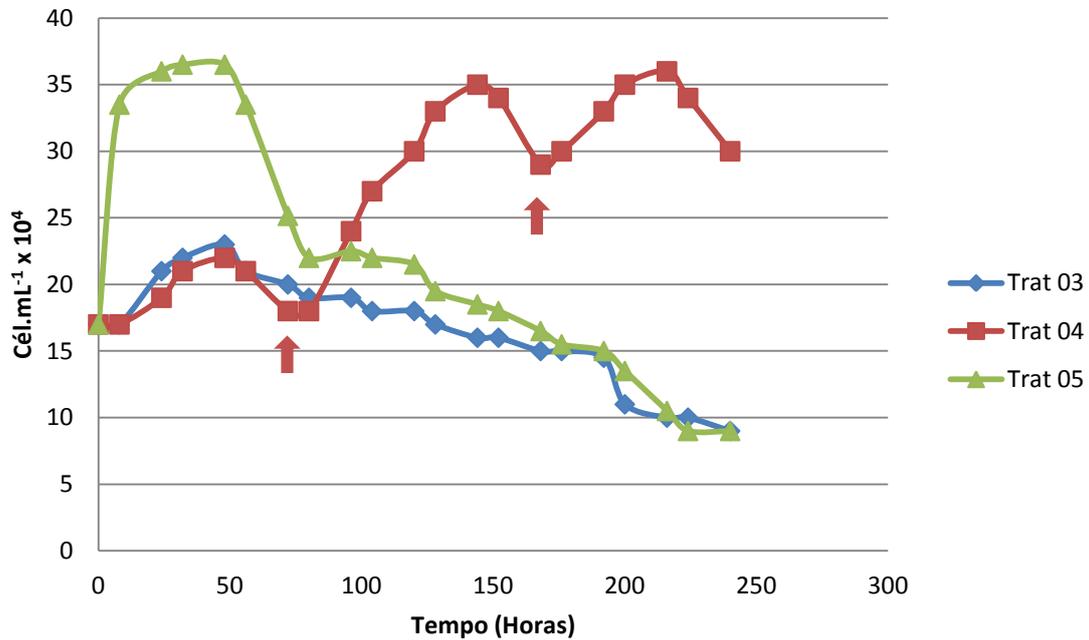
A partir dos resultados fica evidente a importância da agitação dos meios de cultivo, assim como relatado por Wu e Shi (2007) que tiveram problemas com a aeração de seu sistema de cultivo e, como consequência, a produtividade final foi bem menor do que o esperado.

Os maiores valores de crescimento encontrados para cultivos sob agitação são justificados pelos benefícios que esta agitação proporciona para o cultivo. Estes benefícios são relatados por Soares (2000), onde a agitação do meio permite a distribuição homogênea das células e dos nutrientes dentro da cultura; melhoramento da distribuição da luz e das células, permitindo que estas estejam fotossinteticamente ativas; evita que as células sedimentem no fundo do recipiente de cultura, produzindo uma estimulação do metabolismo celular; diminui a tensão de oxigênio na cultura.

A partir dos resultados do primeiro teste realizaram-se todos os próximos cultivos com agitação.

Na Figura 4.2 são apresentados os perfis de concentrações celulares da microalga *Chlorella sorokiniana* cultivada nos tratamentos 3, 4 e 5 em condições heterotróficas sem fontes de carbono, onde objetivou-se estudar a contribuição das reservas energéticas do inóculo inicial de microalgas na manutenção de sua sobrevivência nas novas condições de cultivo e a influência dos pulsos de sais de meio no cultivo.

Figura 4.2 - Cultivo de *Chlorella sorokiniana* sob tratamentos 03, 04 e 05.



Onde: Trat 03 (1xBB, escuro, CO₂); Trat 04 (1xBB, escuro, CO₂, Pulso); Trat 05 (3xBB, escuro, CO₂); Setas: aplicação de pulsos de meio BB.

Em todos os tratamentos foram encontrados valores baixos de velocidades de crescimento, no tratamento 3, 0,0031 h⁻¹, no tratamento 4, 0,006 h⁻¹, e no tratamento 05, 0,0087 h⁻¹, sendo o maior dentre os três analisados. Em relação a curva de crescimento destaca-se o tratamento 5, onde as microalgas apresentaram uma curva de crescimento acentuada logo no começo do cultivo, atingindo pico máxima cerca de 50 horas. O tratamento 5 estava com uma concentração de meio Basal Bold 3x, por isso obteve uma curva acentuada logo no início do cultivo por possuir maior disponibilidade de sais minerais para o seu crescimento. As microalgas, ao utilizarem suas reservas energéticas para se desenvolverem, e com uma população um pouco maior que os demais tratamentos, consumiram os sais minerais, e então entraram em fase de declínio celular. Segundo Doran (2005), a densidade de microalgas aumenta exponencialmente até que ocorra o esgotamento de alguns fatores limitantes. Um desses fatores poderá ser a concentração de nutrientes que diminuem ao longo do tempo.

Os três tratamentos possuem fase de declínio celular semelhante, em torno de 48 horas, no tratamento 4 quando as microalgas entraram em fase de declínio celular foram aplicados pulsos de meio Basal Bold, e após a aplicação de pulsos, as microalgas voltaram a se desenvolver devido à disponibilidade de mais nutrientes no meio, e ainda pelo fato das microalgas possuírem reservas energéticas, já que não havia fonte de carbono disponível. Após a aplicação do primeiro pulso as microalgas mantiveram-se em fase de crescimento celular por cerca de 64 horas, entrando em fase de declínio celular após este período. Bidigare et al., (2005), relata que uma vez consumidos todos os recursos (nutrientes), as culturas acabam por morrer, a não ser que sejam fornecidos novamente ao meio de cultivo.

Quando o segundo pulso foi aplicado no cultivo as microalgas retomaram o crescimento, porém por um período de cerca de 40 horas, um tempo menor que o primeiro pulso pelo fato de o cultivo ter atingido uma concentração de microalgas um pouco maior que no primeiro pulso e consumindo assim os sais mais rapidamente, ou pelas suas reservas energéticas já estarem comprometidas.

As microalgas do tratamento 3 como estavam com uma concentração de meio Basal Bold 1x, ao consumir os sais necessários para manter o crescimento das células as microalgas entraram em fase de declínio celular e por não receberam pulsos de sais e sem fonte luminosa, sem fontes de carbono externa continuaram em fase de declínio celular.

Na literatura encontramos como definição que as microalgas autotróficas são capazes de oxidar compostos orgânicos para obter energia. O que difere estas microalgas das heterotróficas é a origem destes compostos orgânicos; nas autotróficas o carbono orgânico tem origem do processo interno de fotossíntese, enquanto que nas heterotróficas, o carbono orgânico é captado do meio externo (ANGELO, 2014). A microalga *Chlorella sorokiniana* possui a capacidade de crescer tanto em condições autotróficas quanto heterotróficas. Portanto pode obter o carbono tanto do meio interno quanto externo.

Como citado na metodologia as microalgas cultivadas inicialmente no pré-inóculo estavam em condições autotróficas e depois foram passadas para os tratamentos em condições heterotróficas sem fonte de carbono, possuindo apenas suas reservas

energéticas acumuladas no cultivo autotrófico. Andrade et al., (2008) e Chisti (2007) caracterizam as microalgas como micro-organismos fotossintéticos, que combinam água e dióxido de carbono atmosférico com luz solar para produzirem várias formas de energia para produzirem biomassa (polissacarídeos, aminoácidos, proteínas, carotenoides, lipídios e hidrocarbonetos). Sendo assim as microalgas acumulam em suas células lipídios e outras moléculas durante a fotossíntese, quando retiramos as microalgas do cultivo autotrófico e passamos as mesmas para condições heterotróficas sem fontes de carbono, as microalgas utilizam-se destas reservas em suas células para sobreviver as novas condições de cultivo.

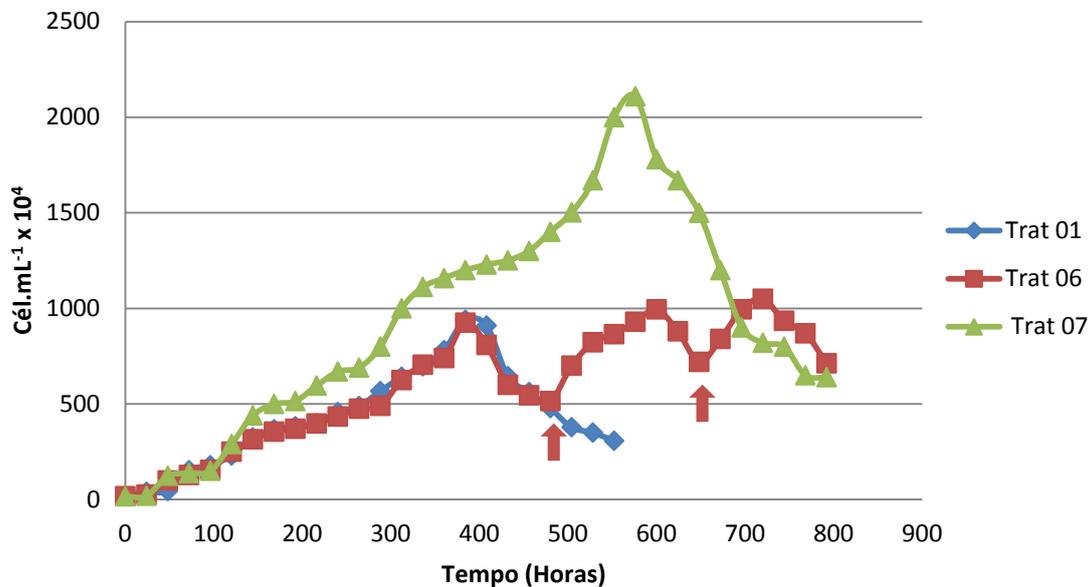
Li et al., (2008) monitorando o crescimento celular de *Chlorella sorokiniana* em diferentes formas de cultivo observou crescimento contínuo quando as condições de crescimento no meio já estavam desfavoráveis, concluindo que as microalgas consumiram nitrogênio e moléculas de clorofila para suportar o crescimento das células.

O glicogênio é o principal carboidrato de reserva, podendo, assim como a glicose exógena, ser convertido em glicose-6-fosfato e metabolizado via respiratória. A transferência das culturas para cultivo no escuro está ligada a ativação da via metabólica oxidativa. A glicose-6-fosfato também fica disponível para armazenamento, crescimento, divisões celulares, síntese celular e respiração (FERREIRA, 2013).

Portanto as microalgas oxidam suas reservas energéticas na ausência de luz na tentativa de sobreviver e se multiplicar, porém como no meio de cultivo não estavam presentes fonte de carbono para assimilação as microalgas acabam morrendo por falta de energia ou por saturação do meio de cultivo.

Na Figura 4.3 são apresentados os perfis de concentrações celulares da microalga *Chlorella sorokiniana* cultivada nos tratamentos 1, 6 e 7 em condições autotróficas. Onde objetivou-se estudar e a influência dos pulsos de sais de meio no cultivo.

Figura 4.3 - Cultivo de *Chlorella sorokiniana* sob tratamentos 01, 06 e 07



Onde: Trat 01 (1xBB, luz, CO₂); Trat 06 (1xBB, luz, CO₂, Pulso); Trat 07 (3xBB, luz, CO₂); Setas: aplicação de pulsos de meio BB.

As microalgas do tratamento 1 apresentaram valor de velocidade de crescimento de 0,014 h⁻¹, no tratamento 6, 0,014 h⁻¹ e 0,017 h⁻¹ no tratamento 7. No tratamento 1 as microalgas mantiveram-se em fase de crescimento celular até atingirem seu pico máximo em cerca de 400 horas e após esse período entraram em fase de declínio celular por esgotamento dos nutrientes do meio de cultivo. Da mesma forma aconteceu com o tratamento 6, porém o tratamento 6 após atingir fase de declínio celular recebeu um pulso de 10 mL meio Basal Bold. Após a aplicação do pulso de meio as microalgas retomaram o crescimento por cerca de 120 horas entrando em fase de declínio celular novamente após consumir os nutrientes do meio. Um segundo pulso foi aplicado no cultivo e com novos nutrientes no meio as microalgas retomaram o crescimento, porém com uma população de microalgas maior que no momento do primeiro pulso consumiram os nutrientes com maior rapidez mantendo-se em fase de crescimento por cerca de 72 horas e entrando em fase de declínio celular depois disso.

Dentre os tratamentos analisados o tratamento 7 apresentou o maior valor de μ_{\max} $0,017 \text{ h}^{-1}$ e uma concentração celular (Figura 4.3) de $2100 \times 10^4 \text{ cél.mL}^{-1}$, atingindo seu pico máximo de crescimento cerca de 576 horas. As microalgas do tratamento 7 foram cultivadas em meio Basal Bold com uma concentração inicial de 3x, portanto as microalgas tinham uma quantidade maior de nutrientes disponíveis para o seu crescimento além da disponibilidade de luz para realização da fotossíntese. Ao esgotar os nutrientes presentes no meio as microalgas mesmo com a disponibilidade de luz para realizar a fotossíntese não conseguem se desenvolver e entram em fase de declínio celular.

Ao utilizarmos no começo do cultivo uma concentração de meio Basal Bold inicial de 3x permitimos que as microalgas alcancem uma alta concentração celular com bastante facilidade sem que seja necessário fazer manutenções no meio de cultivo por um período de 576 horas. É através da fotossíntese que as microalgas fixam o carbono necessário para a produção de biomassa, logo a relação entre a síntese de material orgânico como reflexo da produção fotossintética pode ser expressa principalmente pelo incremento da população algal (GRESSLER, 2011).

Ao compararmos os resultados (BB 3x) aqui obtidos, podemos encontrar na literatura (Tabela 3.1) vários resultados em termos de μ_{\max} e concentração celular, onde as microalgas foram cultivadas em meios de cultivo na concentração 1x.

Tabela 3.1. Resultados encontrados na literatura para cultivos de microalgas.

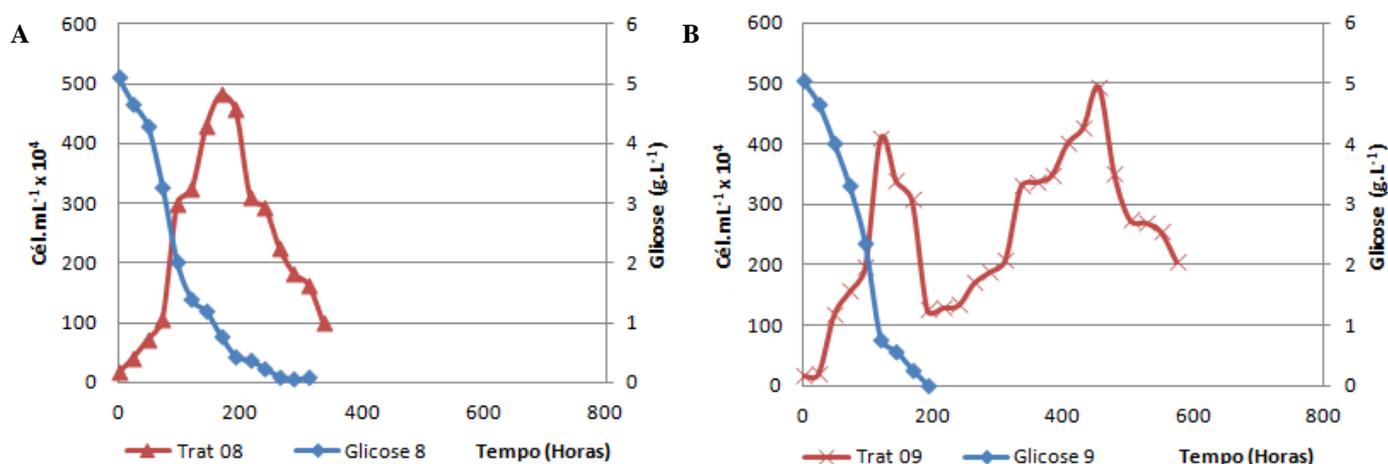
Microalgas	Conc. Cel. (cél.mL ⁻¹)	μ_{\max} (D ⁻¹)	Meio de cultivo	Condições de cultivo	Autor(es)
<i>Chlorella</i> sp	1,98x10 ⁶	0,268	Basal	F250ml/Foto24h/ 27 °C e aeração	Silva, 2011
<i>Dunaliella salina</i>	6x10 ⁶	0,212	F2 medium	Fotobiorreator tubular/25 °C	Garcia, 2005
<i>Haematococcus pluvialis</i>		0,100	Basal	F1L/Foto24h/ 25 °C e aeração	Dalay, 2006
<i>Haematococcus pluvialis</i>		0,150	NPK	F1L/Foto24h/ 25 °C e aeração	Dalay, 2006
<i>Haematococcus pluvialis</i>		0,116	BG11	F1L/Foto24h/ 25 °C e aeração	Dalay, 2006
<i>Ankistrodesmus gracilis</i>	30,2x10 ⁶	0,40	CHU ₁₂	F1,5L/Foto24h/ 22 °C e aeração	Tavares,2009
<i>Ankistrodesmus gracilis</i>	33,3x10 ⁶	0,36	M+NPK	F1,5L/Foto24h/ 22 °C e aeração	Tavares,2009
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	52x10 ⁴	0,72	Guillard	F4L/Foto24h/ 20 °C e agitação	Portugal,2010
<i>Chaetoceros muelleri</i>	8,98x10 ⁶	0,60	Guillard	F4L/Foto24h/ 20 °C e agitação	Portugal,2010
<i>Isochrysis</i> sp	12,93x10 ⁶	0,45	Guillard	F4L/Foto24h/ 20 °C e agitação	Portugal,2010
<i>Scenedesmus acuminatus</i>	8x10 ⁶	0,42	NPK	F500mL/Foto24h/ 25 °C e agitação	Krettle et al, 2016
<i>Chlorella sorokiniana</i>	10x10 ⁶	0,33	Basal	F250mL/Foto24h/ 25 °C e agitação	Neste estudo
<i>Chlorella sorokiniana</i>	21x10 ⁶	0,40	Basal	F250mL/Foto24h/ 25 °C e agitação	Neste estudo
<i>Chlorella sorokiniana</i>	3,18x10 ⁶	0,111	Dragone	F6L/Foto24h/ 25 °C e aeração	Ribeiro, 2015
<i>Chlorella sorokiniana</i>	7,43x10 ⁶	0,234	Basal	F6L/Foto24h/ 25 °C e aeração	Ribeiro, 2015
<i>Chlorella sorokiniana</i>	2,65 x10 ⁶	0,064	NPK	F6L/Foto24h/ 25 °C e aeração	Ribeiro, 2015

Onde: Conc. Cel.: Concentração celular; μ_{\max} : velocidade específica máxima de crescimento; Condições de cultivo: F(frasco); Foto(fotoperíodo).

As concentrações de BB utilizadas atualmente na concentração 1x não exploram a capacidade máxima que pode-se obter em termos de concentração celular das microalgas, neste trabalho observamos que na concentração de meio 3x obteve-se uma concentração celular superior a todos os tratamentos com concentração de meio 1x aqui estudados, sendo o mesmo resultado superior aos trabalhos encontrados na literatura, como os de Silva (2011), Garcia (2005), Portugal (2010), Krettle et al., (2016) e Ribeiro (2015), porém não sendo superior ao trabalho de Sipaúba-Tavares (2009), que obteve em seus resultados uma concentração celular de $30,2 \times 10^6$ e $33,3 \times 10^6$ cél.mL⁻¹ para *Ankistrodesmus gracilis* em meio NPK, porém apresentaram valores de μ_{\max} semelhantes. A partir dos resultados obtidos podemos otimizar a produção ao utilizarmos o meio Basal Bold na concentração de 3x, obtendo assim melhores resultados.

Na Figura 4.4 são apresentados os perfis de concentrações celulares da microalga *Chlorella sorokiniana* cultivada nos tratamentos 8 e 9 suplementados com glicose (5 g.L⁻¹). Onde objetivou-se estudar o crescimento das microalgas na presença de glicose nos meios de cultivo.

Figura 4.4 - Cultivo de *Chlorella sorokiniana* sob tratamentos 08 e 09.



Onde: 4.4A - Trat 08 (1xBB, escuro, glicose); 4.4B - Trat 09 (1xBB, luz, CO₂, glicose).

No tratamento 8 as microalgas estavam em condições heterotróficas e mantiveram-se em fase de crescimento enquanto havia glicose disponível no meio de cultivo atingindo seu pico de crescimento cerca de 200 horas, e um valor de μ_{\max} de

0,025 h⁻¹. Lee (2001) reporta em seu trabalho valores de 0,038 h⁻¹ para *Chlorella pyrenoidosa* e 0,040 h⁻¹ para *Scenedesmus acutus* ambas cultivadas em glicose.

Passado 200 horas de cultivo a glicose presente no meio já se apresentava em baixas concentrações e as microalgas entraram em fase de declínio celular. Segundo Angelo (2014), em condições heterotróficas as microalgas obtêm a energia e o carbono de fonte orgânica externa, em geral pela oxidação de açúcares. Portanto sendo a glicose a única fonte de carbono disponível no meio para o crescimento das microalgas estas acabam por morrer quando a glicose é consumida.

No tratamento 9 as microalgas estão em condições mixotróficas, e possuem fonte de carbono orgânica (glicose) e inorgânica (CO₂) disponíveis para seu crescimento. O tratamento 9 apresentou valor de μ_{\max} de 0,027 h⁻¹. Lee (2001) reportou em seu trabalho valores parecidos para *Spirulina Platensis* de 0,026 h⁻¹ e encontrou 0,048 h⁻¹ para *Scenedesmus Acutus*.

Ao observarmos os resultados podemos ver que as microalgas apresentam fase de crescimento contínuo até que a glicose presente no meio apresenta baixas concentrações em torno de 120 horas de cultivo, período em que as microalgas começam a entrar em fase de morte celular. Nesta primeira etapa podemos observar que as microalgas consomem preferencialmente a glicose presente no meio, visto que implica em uma economia na energia gasta para a síntese de todo o aparato fotossintético e para a fixação do carbono (LEE, 2004). Após este período na segunda etapa as microalgas entram em fase de adaptação celular, pois como a glicose não esta mais presente no meio é necessário um ajuste de metabolismo para que seja realizada exclusivamente a fotossíntese. Já que as enzimas que catalisam o consumo de substratos alternativos são dificilmente sintetizados na presença de glicose (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

Depois da fase de adaptação para a realização da fotossíntese as microalgas se mantêm em fase de crescimento celular até atingirem seu pico máximo de crescimento em torno 450 horas de cultivo entrando em fase de declínio celular depois disso.

No metabolismo mixotrófico ocorre simultaneamente as rotas metabólicas autotróficas (fotossíntese) e as heterotróficas (oxidação de compostos orgânicos externos via respiração) (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004; AHMAD et al.,

2011; AMARO et al., 2011). A taxa de crescimento da cultura mixotrófica é, portanto, aproximadamente a soma da taxa de crescimento de células cultivadas em condições autotróficas e heterotróficas (DERNER, 2006; LEE, 2004).

Os resultados encontrados neste trabalho diferem destes autores, pois no tratamento 9 durante a primeira fase de cultivo onde ainda havia glicose e luz disponível a concentração celular máxima atingida foi menor do que no cultivo somente heterotrófico (tratamento 8). A concentração celular máxima foi atingida no tratamento 9 apenas no período em que somente a fotossíntese era realizada. Em condições heterotróficas, a glicose é metabolizada principalmente pela via das pentose-fosfato, ao invés da glicólise (PEREZ-GARCIA et al., 2011). O maior fluxo metabólico da via das pentose-fosfato pode explicar a maior velocidade de crescimento das microalgas quando cultivadas heterotroficamente na presença de glicose. Yang et al., (2000) verificaram que o cultivo heterotrófico de *Chlorella pyrenoidosa* gerou mais ATP a partir do fornecimento de glicose do que cultivos autotróficos e mixotróficos com energia fornecida pela luz.

Derner (2006) utilizando as microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis* em cultivos mixotróficos com glicose e acetato obteve como resultados uma produção de biomassa menor nos cultivos mixotróficos do que nos cultivos autotróficos. Sugerindo que as cepas não assimilam carbono orgânico de maneira energeticamente viável de forma heterotrófica e/ou mixotrófica. Brennam e Owende (2010) compararam o cultivo autotrófico em fotobiorreatores fechados com o cultivo mixotrófico, as taxas de crescimento foram maiores que o cultivo autotrófico. No entanto, foram menores que o cultivo heterotrófico. Assim como o trabalho de Bonini e Bastos (2012) estudaram o cultivo mixotrófico e heterotrófico de *Chlorella vulgaris*, tendo como fonte de carbono a glicose. Estes autores observaram que a velocidade específica de crescimento foi maior no cultivo heterotrófico.

Como citado anteriormente por diversos autores no cultivo mixotrófico ocorreria simultaneamente ambas as rotas, fotossintética e de oxidação de compostos orgânicos via respiração. Para que uma cepa seja capaz de crescer em condições mixotróficas, suas enzimas da rota heterotrófica não podem ser inibidas pela presença de luz. Alguns autores consideram que as rotas metabólicas fotoautotróficas e heterotróficas seriam independentes no cultivo mixotrófico. No entanto, percebe-se que a produtividade dos

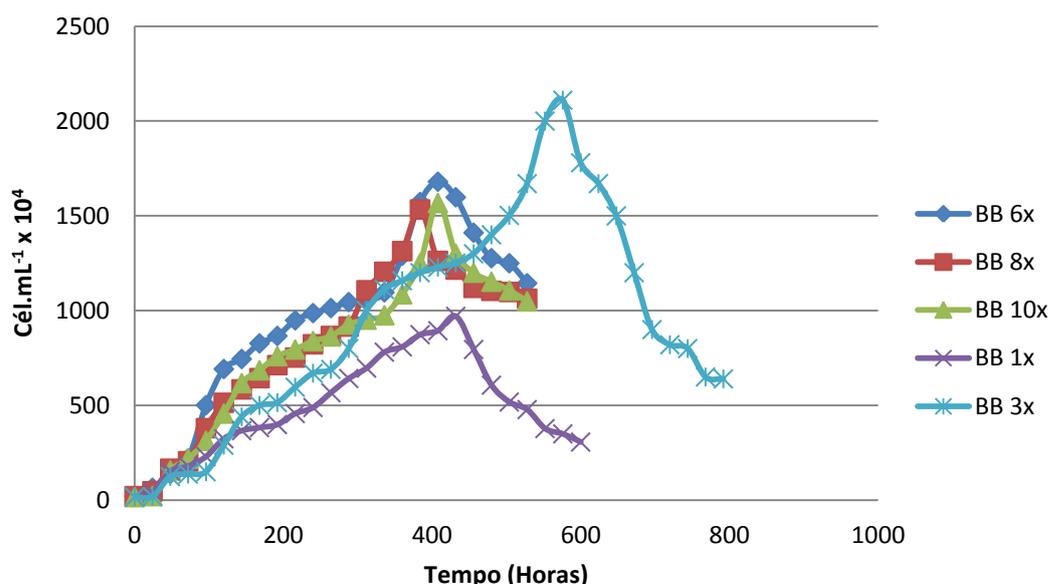
sistemas mixotróficos não é a simples soma destas outras duas formas de cultivo. Além disso, há indícios de que há uma ligação entre o sistema de transporte de elétrons dos metabolismos autotróficos e heterotróficos das microalgas, tornando-os interdependentes (CHOJNACKA; MARQUEZ-ROCHA, 2004). As microalgas são as únicas capazes de realizar respiração aeróbia e fotossíntese nos mesmos compartimentos. Assim, não parece existir uma cadeia de transporte de elétrons exclusiva para respiração, sendo que diversos produtos são utilizados nas vias fotossintéticas e respiratórias (BONINI, 2012).

Adolf et al., (2006), estudando o metabolismo autotrófico e heterotrófico durante o cultivo mixotrófico de *Karlodinium micrum* observaram que há indícios de influência de uma forma de metabolismo sobre a outra. Sendo este mesmo resultado encontrado neste trabalho para o cultivo mixotrófico, que também pode ter sofrido algum reflexo em sua concentração celular na primeira fase de cultivo devido a esta influência que um metabolismo tem sobre o outro.

Segundo Chojnacka e Marquez-Rocha (2004), várias tentativas têm sido feitas para explicar o mecanismo de crescimento mixotrófico das microalgas, particularmente com relação à contribuição das fases autotróficas e heterotróficas, existindo a necessidade de um melhor entendimento das diferenças metabólicas e dos requerimentos de energia e carbono pelas microalgas. Portanto mais estudos precisam ser feitos a nível fisiológico para o melhor entendimento das influências metabólicas sobre o crescimento celular das microalgas.

Ao comparar os cultivos autotróficos (Figura 4.5), nas concentrações de meio 1x e 3x, com as concentrações 6x, 8x e 10x, pode-se observar que as concentrações 6x, 8x e 10x permitiram um crescimento das microalgas maior que a concentração comumente utilizada (1x), porém atingindo uma concentração celular menor que a apresentada nos cultivos com concentração de meio 3x.

Figura 4.5 - Cultivo de *Chlorella sorokiniana* em diferentes concentrações de meio Basal Bold



Onde: 1x,3x,6x,8x,10x (concentrações do meio BB utilizadas).

As microalgas cultivadas nos meios com concentração 6x, 8x e 10x, apresentaram um valor de velocidade específica máxima de crescimento de $0,028 \text{ h}^{-1}$, $0,026 \text{ h}^{-1}$ e $0,026 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Atingiram seu pico máximo de crescimento em torno de 400 horas, entrando em fase de declínio após este período. As altas concentrações de sais utilizadas nesses cultivos podem ter sido prejudiciais para o crescimento das microalgas nestas condições.

A concentração total de carbono inorgânico e demais componentes do meio de cultivo (nutrientes) altera a pressão osmótica do meio, influenciando a fisiologia celular e refletindo nas taxas de crescimento e na composição da biomassa (COSTA, 2008).

Segundo Green e Perry (2008), a solubilidade do dióxido de carbono no meio líquido diminui com o aumento da temperatura e da concentração salina. No trabalho de

Rosa et al., (2014), foi utilizado o meio de cultivo Zarrouk, composto por uma concentração elevada de sais inorgânicos e a forma de cultivo utilizada foi semicontínuo, sendo relatado que a adição de meio de cultivo novo a cada corte trouxe como consequência o aumento da pressão osmótica do meio, o que, segundo Sudhir et al., (2005), prejudica o aparato fotossintético de microalgas. O aumento da pressão osmótica no meio diminui a solubilidade do CO₂ a qual é governada pelo equilíbrio termodinâmico da dissociação do ácido carbônico (KIM et al., 2013).

Mesmo com o crescimento não favorecido as microalgas ainda sim conseguem se desenvolver nestas condições de cultivo, devido a sua versatilidade metabólica que desenvolveram durante sua evolução a fim de sustentar a sua manutenção e até mesmo o seu crescimento (BRUTEMARK, GRANÉLI, 2011; JEONG et al., 2010). Podemos observar essa versatilidade também no trabalho de Ansilago et al., (2016), onde foram testados o crescimento de *Pseudokirchneriella subcapitata* na presença de três contaminantes diferentes, sulfato de zinco, cloreto de alumínio e sulfato ferroso. Estes contaminantes quando testados isoladamente apresentaram efeito toxico para as microalgas, porém a associação entre os três resultou em um efeito antagônico, em que os contaminantes, aplicados juntos, interferem um no outro ou interferem com outro contaminante que coexiste no meio, tornando-se benéficos às microalgas.

As concentrações de meio Basal Bold testadas 6x, 8x e 10x possivelmente estavam em uma concentração acima da capacidade de assimilação da microalga que pode ter prejudicado o seu crescimento no meio, não ultrapassando a concentração celular atingida pelos cultivos nas concentrações de meio 3x.

4.4 Conclusão

Concluiu-se que a agitação no meio de cultivo das microalgas é de grande importância para se obter grandes concentrações celulares.

Pode-se concluir que os pulsos de meio Basal Bold em condições autotróficas permitem que as microalgas retomem seu crescimento normalmente toda vez que aplicado, já nas condições heterotróficas testadas as microalgas retomam o crescimento, mas não se multiplicam em grandes concentrações celulares.

Dentre todos os tratamentos analisados o tratamento 7 apresentou maior concentração celular ao iniciar o cultivo com uma concentração maior de meio Basal Bold, não necessitando de pulso de sais para se desenvolverem por um longo período, o que diminuiu a necessidade de manutenções a serem realizadas no meio neste tipo de cultivo. A concentração de meio Basal Bold (3x) comparada com as concentrações acima dela não favoreceram o crescimento máximo das microalgas.

A microalga *Chlorella sorokiniana* nas condições aqui estudadas em cultivo mixotrófico não apresentaram um bom rendimento na concentração celular.

4.5 Conclusão geral

De maneira geral pode-se observar a capacidade de se obter e estudar espécies de microalgas presentes na região de Bonito, permitindo diminuir os custos para realização de estudos nesta área. Das várias condições testadas, os cultivos utilizando meio Basal Bold (3x) em condições autotróficas apresentaram maiores valores de concentração celular. Devido a vários fatores que influenciam no crescimento das microalgas, estas apresentam diferentes comportamentos de acordo com a forma em que são cultivadas. A escolha de qual o melhor sistema para produção dependerá do objetivo do cultivo, o produto que se deseja, da espécie utilizada bem como das características da microalga.

4.6 Referências

- ADOLF, J. E.; STOECKER, D. K.; LAWRENCE, W. H. J. The balance of autotrophy and heterotrophy during mixotrophic growth of *Karlodinium micrum* (Dinophyceae). *Journal of Plankton Research*, Oxford. 2006.
- AHMAD, A. L.; YASIN, N.H.M; DEREK, C. J. C.; LIM, J. K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2011.
- AMARO, H. M., GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*. 2011.
- ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. *Ciência e Agrotecnologia*. 2008.
- ANGELO E. A. Cultivo não fotoautotrófico de microalgas: uma visão geral. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*. 2014.
- ANSILAGO, M.; OTTONELLI, F.; CARVALHO, E. M. Cultivo da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* em escala de bancada utilizando meio contaminado com metais pesados. *Eng. Sanit. Ambient*. 2016.
- BONINI, M. A. Cultivo heterotrófico de *Aphanothece microscópica Nageli* e *Chlorella vulgaris* em Diferentes Fontes de Carbono e Vinhaça. 2012. 96 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente). Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias. 2012.
- BONINI, M. D. A.; BASTOS, R. G. Produção de biomassa de *Aphanothece microscópica* e *Chlorella vulgaris* por cultivo heterotrófico a partir de glicose. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*. 2012.
- BIDIGARE, R. R.; HEUKELEM, L. V. E.; TREES, C.C. Analysis of Algal Pigments by HighPerformance Liquid Chromatography. Andersen, R.A. (Ed.). *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press. Burlington, USA. 2005.
- BISCHOFF H. W., BOLD H. C.; *Phycological studies. Some soil algae from enchanted rock and related algal species*, University of Texas Publications. 1963.

BRENNAM, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae – A review of Technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2010.

BRUTEMARK, A.; GRANÉLI, E. Role of mixotrophy and light for growth and survival of the toxic haptophyte *Prymnesium parvum*. *Harmful Algae*, Amsterdam. 2011.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 2007.

CHOJNACKA, K.; MARQUEZ-ROCHA, F. J. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology*. 2004.

COSTA, J. A. V.; ANDRADE, M. R.; CAMERINI, F. V. Perda química de carbono e cinética do crescimento celular em cultivos de *Spirulina*. *Quim. Nova*. 2008.

DALAY, M. C.; IMAMOGLU, E.; DEMIREL, Z. Agricultural Fertilizers as Economical Alternative for Cultivation of *Haematococcus pluvialis*. Ege University, Faculty of Engineering, Department of Bioengineering, Izmir, Turkey. 2006.

DORAN, P. M. *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press Limited, London, Reino Unido. 2005.

DERNER, R. B. Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. 2006. 140 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Florianópolis, 2006.

ERIKSEN, N. T. The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters*. 2008.

FONSECA, G. G.; DE CARVALHO, N. M. B.; GOMBERT, A. K. Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013.

FERREIRA, S. P.; SOARES, L. S.; COSTA, J. A. V. Revisão: microalgas: uma fonte alternativa na obtenção de ácidos gordos essenciais. *Rev. de Ciências Agrárias*. 2013.

GARCÍA-GONZÁLEZ, M. et al. Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- β - carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*. 2005.

GREEN, D. W.; PERRY, R. H. *Perry's Chemical Engineers' Handbook*, USA: McGraw-Hill, 3735 p., 2008.

GRESSLER, P. D. Avaliação da eficiência de *Desmodesmus subspicatus* (r.chodat) e.hegewald & a.schmidt (chlorophyceae) cultivada em fotobiorreator tubular com efluente da ete-unisc, visando biorremediação e obtenção de energia. 2011. 122 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC. Santa Cruz do Sul, 2011.

JEONG, H. J.; YOO, Y. D.; KIM, J. S.; SEONG, K. A.; KIM, T. H. Growth, feeding and ecological roles of the mixotrophic and heterotrophic dinoflagellates in marine planktonic food webs. *Ocean Science Journal*, Ansan. 2010.

KIM, G.; CHOI, W.; LEE, C-H.; LEE, K. Enhancement of dissolved inorganic carbon and carbon fixation by green alga *Scenedesmus* sp. in the presence of alkanolamine CO₂ absorbents. *Biochem. Eng. J.* 2013.

KLOK, J. A. Optimization of lipid production in microalgae, Wageningen University. Wageningen, NL. 224 p. 2010.

KRETTLE, R. H.; FERNANDES, V. O.; DIAS J. C. Crescimento de *Scenedesmus acuminatus* (lagerheim) chodat em meio de cultura à base de npk e extrato de macrófitas aquáticas. Disponível em: <
http://portais4.ufes.br/posgrad/teses/tese_9369_CRESCIMENTO%20DE%20Scenedesmus%20acuminatus.pdf>. Acesso em 27 de Outubro de 2016.

LEE, Y. K. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology*. Singapore, 2001.

LEE, Y. K. Algal nutrition: heterotrophic carbon nutrition. In: Richmond, A. *Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science. 2004.

LI Y. Q.; HORSMAN M.; WANG B.; WU N.; LAN C. Q. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008.

PEREZ GARCIA, O.; DE- BASHAN, Y.; PUENTE, M. E. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*. 2011.

PORTUGAL, C. I. Avaliação do crescimento de microalgas importantes para a aquicultura cultivadas em diferentes concentrações de nutrientes. 2010. 46 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura), UFSC, Florianópolis, 2010.

RIBEIRO, M. D. Estudo sobre cultivos e aplicações biotecnológicas de microalgas. 2015. 58 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental). Universidade Federal da Grande Dourados. Dourados, 2015.

ROSA, G. M.; MORAES, L.; CARDIAS, B. B.; SOUZA, M. R. A. Z.; COSTA, J. A. V. Cultivo e produção de biomassa da cianobactéria *Spirulina* com monoetanolamina e reciclo de nutrientes. Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 20. Florianópolis, SC. 2014.

SILVA, M. C. C. P. Tratamento terciário de efluente secundário, usando a microalga *Chlorella* sp. Imobilizada em matriz de alginato de cálcio. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental), UEPB, Campina Grande-PB, 2011.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; IBARRA, L. C. C.; FIORESI, T. B. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) em laboratório utilizando meio CHU12 e de macrófita com NPK. *Boletim do Instituto de Pesca*, São Paulo. 2009.

SOARES, B. J. R. Avaliação da possibilidade de tratamento de um efluente piscícola marinho por microalgas. 2000. 151 f. Dissertação (Mestrado em Hidrobiologia). Universidade do Porto, Faculdade de Ciências. Porto, 2000.

SUDHIR, P-R.; POGORYELOV, D.; KOVÁCS, L.; GARAB, G.; MURTHY, S. D. S. The effects of salt stress on photosynthetic electron transport and thylakoid membrane proteins in the cyanobacterium *Spirulina platensis*. *J. Biochem. Mol. Biol*. 2005.

VEGA, B. O. A.; VOLTOLINA, D. Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico. In: VEGA, B. O. A.; VOLTOLINA, D. Metodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgale. México, Centro de Investigaciones biológicas Del Noroeste (CIBNOR). 2007.

WEHR J. R.; BAINHA. Freshwater Algae da América do Norte: Ecologia e classificação, Aquático Série Ecologia, Academic Press, San Diego. 2003.

WU, Z.; SHI, X. Optimization for high-density cultivation of heterotrophic *Chlorella* based on a hybrid neural network model. Letters in Applied Microbiology, Cardiff, v. 2007.

YANG, C.; HUA, Q.; SHIMIZU, K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. Biochemical Engineering Journal. 2000.

6 Anexos

Tabela 1. Composição e preparação de 1 litro do meio Basal Bold.

1. Preparar as soluções estoque:

Solução	Nome	Fórmula	Por litro
1	Nitrato de sódio	NaNO ₃	25 g L ⁻¹
2	Sulfato de magnésio heptahidratado	MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5 g L ⁻¹
3	Cloreto de sódio	NaCl	2,5 g L ⁻¹
4	Fosfato de potássio dibásico	K ₂ HPO ₄	7,5 g L ⁻¹
5	Fosfato monopotássico	KH ₂ PO ₄	17,5 g L ⁻¹
6	Cloreto de cálcio dihidratado	CaCl ₂ .2H ₂ O	2,5 g L ⁻¹
7	Sulfato de zinco heptahidratado	ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,82 g L ⁻¹
	Cloreto de manganês (II) tetrahidratado	MnCl ₂ .4H ₂ O	1,44 g L ⁻¹
	Trióxido de molibdênio	MoO ₃	0,71 g L ⁻¹
	Sulfato de cobre pentahidratado	CuSO ₄ .5H ₂ O	1,57 g L ⁻¹
	Nitrato de cobalto (II) hexahidratado	Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0,49 g L ⁻¹
8	Ácido bórico	H ₃ BO ₃	11,42 g L ⁻¹
9	Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O	50 g L ⁻¹
	Hidróxido de potássio	KOH	31 g L ⁻¹
10	Sulfato de ferro (III) heptahidratado	FeSO ₄ .7H ₂ O	4,98 g L ⁻¹
	Ácido sulfúrico	H ₂ SO ₄	1 mL g L ⁻¹

2. Após o preparo das 10 soluções estoque para realizar 1 litro do meio Basal Bold:

Soluções estoque

Para 1 litro

Solução estoque 1 – 6

10 mL de cada solução

Solução estoque 7- 10

1 mL de cada solução

Tabela 2. Composição e preparação de 1 litro do meio NPK.

Nome	Por litro
Fertilizante N:P:K (20:5:20)	1 g

1. Pesar 1 g do fertilizante NPK e diluir em 1 litro de água destilada.

Figura 3.1 - Microplacas com *C. vulgaris* e leitora Biochrom.



Fonte: o autor.

Figura 4 – Cultivos heterotróficos e autotróficos de *Chlorella sorokiniana*.



Fonte: o autor.