

## **OBTENÇÃO DE BIOMASSA ALGAL SOB BAIXA LUMINOSIDADE EM MEIOS DE CULTURA ALTERNATIVO E COMERCIAL**

Débora Cristina Fenerick<sup>1</sup>; Lúcia Helena Sipaúba-Tavares<sup>2</sup>

### **RESUMO**

A diminuição de implementos para produzir biomassa algal, em virtude do elevado valor dos meios de cultura comerciais e o alto custo de energia elétrica no qual dificultam a viabilidade financeira para o cultivo desses microrganismos são ferramentas a serem adotadas a esse empreendimento. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o cultivo da microalga *Messastrum gracile* em meio comercial CHU<sub>12</sub> e meio alternativo de macrófita (*Eichhornia crassipes*), sob intensidade luminosa de 30 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. No meio de macrófita foi observado os maiores valores de crescimento com densidade celular máxima de 224 x10<sup>5</sup> cels mL<sup>-1</sup> e no meio comercial, com 150 x10<sup>5</sup> cels mL<sup>-1</sup>. A taxa específica de crescimento foi de k= 0,38 (macrófita) e k= 0,28 (CHU<sub>12</sub>), com tempo de duplicação mais rápido no meio alternativo com 2,66 dias, do que no meio comercial que foi de 3,62 dias. Os teores de clorofila-a foram melhores para *E. crassipes* com 0,74± 0,26 mgL<sup>-1</sup>, já no meio CHU<sub>12</sub> averiguou-se 0,40 ± 0,08 mgL<sup>-1</sup>. Os resultados do presente estudo ressaltaram que o cultivo a base de macrófitas é eficaz para o desenvolvimento da *M. gracile*, visto que a densidade celular, taxa específica de crescimento, tempo de duplicação e clorofila-a foram superiores ao meio de cultura comercial (CHU<sub>12</sub>). O meio alternativo proporciona uma elevada biomassa, com viabilidade econômica eficaz, sendo assim, as macrófitas são ferramentas a serem inseridas no mercado de produção de microalgas para obtenção de biomassa algal, em função de possuírem nutrientes essenciais como nitrogênio e fósforo.

**PALAVRAS-CHAVES:** Microalga; macrófita; CHU<sub>12</sub>, intensidade luminosa.

1. Mestranda em Aquicultura – Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP), Jaboticabal, São Paulo, deborafenerick@hotmail.com
2. Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> em Aquicultura – Centro de Aquicultura da Unesp (CAUNESP), Jaboticabal, São Paulo, lucia.sipauba@unesp.br.

## INTRODUÇÃO

O cultivo de microalgas promove diversos estudos mundialmente, com o objetivo de propor melhor manejo na produção e diminuição de custos, pois implantar um sistema para produzi-las continua elevado, devido a necessidade de luz e principalmente o meio de cultivo que exige compostos de alto valor (macro e micro nutrientes, vitaminas e minerais). Assim, pesquisas hodiernas são voltadas em minimizar os custos com esses componentes através de meios de cultura alternativos (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2017) e também redução do uso de energia, pois o consumo da iluminação artificial representa 94,5% dos custos totais de uma produção algal (FRANCISCI et al., 2018), sendo também, um dos principais fatores no cultivo desses microrganismos, afetando a fotossíntese, biomassa e na composição bioquímica (KHAN et al., 2018).

O método foto-autotrófico é o mais empregado para o crescimento das microalgas, utilizando-se de fontes de energia e carbono inorgânico. O princípio da intensidade luminosa desse regime provém naturalmente ou de algum sistema artificial e o carbono inorgânico do dióxido de carbono, por exemplo. Proporcionando dessa forma para as microalgas após o processo de fotossíntese produzir polissacarídeos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos através de suas biomoléculas. (BENAVENTE-VALDÉS et al., 2016).

Além da importância da luminosidade ao cultivo, os fatores físicos, químicos e biológicos da microalga devem estar constantemente controlados como (temperatura, pH, dias de cultivo, nutrientes e meios de cultura), pois esses aspectos influenciam na qualidade e produtividade das microalgas (FONTOURA et al., 2017).

Outro fator que impacta para obter uma produção algal de sucesso são os meios de cultura. O elevado custo dos meios comerciais dificultam muitas vezes a

viabilidade para cultivar esse microrganismo. Desse modo, meios alternativos estão sendo empregados aos cultivos, como forma de substituir os comerciais (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2017).

As plantas aquáticas desfrutam de características de alto interesse no âmbito comercial, pois acumulam biomassa, aceleram a ciclagem de nutrientes, atuam como substrato para perifiton, fonte de oxigênio, alimento e abrigo para as demais vidas aquáticas. A macrófita *Eichhornia crassipes*, é comumente utilizada como meio de cultura. (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2018, 2019), esta planta tem propriedades luxuriantes de absorver nutrientes, metais, sedimentos, e por isso é considerada eficaz para purificar a água.

A biomassa desta planta aquática além de ser uma opção para produção de meios de culturas para microalgas, também possuem outros destinos de interesse econômico, como: produção de briquetes (SILVA, 2017), biocarvão (MASTO et al., 2013), produção de biogás (HU et al., 2015), dentre outros.

A Chlorophyceae *Messastrum gracile*, é uma espécie abundante em proteína, lipídio e antioxidante, possuindo alto interesse comercial, sendo um microrganismo de fácil manejo, rápido crescimento e bem adaptada em meios alternativos como, fertilizantes inorgânicos e plantas aquáticas (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2015, 2017, 2018).

O intuito deste trabalho é utilizar o resíduo da aquicultura, a macrófita *Eichhornia crassipes* para diminuir os custos de produção com meio de cultura e avaliar o crescimento e desenvolvimento da microalga *Messastrum gracile* em baixa intensidade luminosa.

## METODOLOGIA

### Descrição do local:

O estudo foi desenvolvido no Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), Jaboticabal, SP, no Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton, onde é mantida a microalga *M. gracile*. Um dos setores do laboratório é destinado somente para o cultivo das microalgas, o cepário possui um sistema controlado de aeração, temperatura, onde é mantida entre  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  e sob iluminação com lâmpada de LED, na intensidade de  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  em fotoperíodo de 24h. A cepa desta espécie é proveniente da Universidade Federal de São Carlos, linhagem CCMA-UFSCar5 isolada da Represa do Broa (SP, Brasil).

### Procedimento Experimental:

Para o cultivo foto-autotrófico, a microalga foi cultivada em meio de cultura comercial CHU<sub>12</sub> que é preparado à base de vários reagentes químicos:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{K}_2\text{SiO}$ , biotina. Posteriormente foram diluídos em 1L de água destilada e autoclavados a  $120^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos, 10 ml do meio preparado foram adicionados em 1,4 L de água destilada autoclavada para o cultivo da microalga. E o meio alternativo foi baseado em estudo elaborado por Sipaúba-Tavares et al. (2017), onde pesou-se cinco quilos da macrófita *Eichhornia crassipes* que após secar e triturar foi fervida com água destilada durante 30 minutos. Com o extrato ainda quente foi retirado e filtrado por uma malha e autoclavado durante 20 minutos em  $120^{\circ}\text{C}$ , posteriormente 70 ml do meio foram adicionados em 1,4 L de água destilada.

O experimento foi realizado em sistema batch, em triplicatas durante 21 dias, totalizando 15 recipientes para cada meio de cultivo, e as variáveis fisiológicas e métodos analíticos foram analisados

semanalmente (1, 7, 14 e 21 dias). Os inóculos da microalga em meio alternativo foram iniciados em meio NPK (20:5:20) em frascos de 2L com a densidade celular de  $2,15 \times 10^5 \text{cels.ml}^{-1}$ . Após as culturas alcançarem a fase exponencial a microalga foi transferida para recipientes de 2L contendo o meio de macrófita.

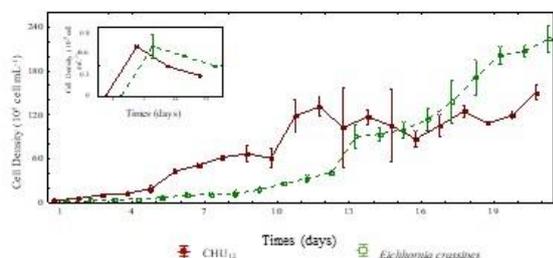
Para a avaliação do crescimento da microalga *M. gracile* nos dois meios de cultura, foram removidos 1ml diariamente ao longo de 21 dias consecutivos e foram contadas em hemocitômetro de Neubauer, os dados obtidos na contagem foram expressos em número de células ( $\text{ml}^{-1} \times 10^5$ ). A taxa de crescimento (k) e o tempo de duplicação (tempo de divisão celular ou tempo de geração) foram calculados através da fórmula proposta por (GUILLARD 1973).

As variáveis da qualidade do meio de cultura foram amostradas semanalmente em triplicata. A Temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade e pH da água foram avaliados com sonda multiparâmetros YSI 556 MPS. A clorofila-a foi extraída com álcool 90% e quantificada a 663 e 750nm (NUSCH, 1980).

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

A densidade celular da microalga *Messastrum gracile* apresentou diferença dentre os dois meios de cultivo (Figura 1), Segundo Perez-Garcia et al. (2010) cada esquema de cultivo tem sua condição específica e depende do objetivo final do cultivo que está relacionado com produção de biomassa. Os melhores resultados de crescimento foram encontrados no meio de cultura *E. crassipes* com densidade celular máxima de  $224 \times 10^5 \text{cels mL}^{-1}$ , obtida no 21° dia. Já no meio CHU<sub>12</sub>, o crescimento foi menor, com densidade celular máxima de  $150 \times 10^5 \text{cels ml}^{-1}$  no 21° dia. Conseqüentemente o meio alternativo

apresentou a melhor taxa de crescimento e melhor tempo de duplicação (Tabela 1).



**Figura 1:** Gráfico de crescimento da microalga *Messastrum gracile* nos meios de cultura CHU<sub>12</sub> e *Eichhornia crassipes*.

A intensidade luminosa é um fator de impacto limitante no crescimento algal estimulando diretamente na produção de biomassa. Cada microalga possui uma preferência pela intensidade de luz, a *Messastrum gracile* apresenta uma preferência de  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , abaixo desta intensidade o crescimento tende a ser menor (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2015; 2017).

**Tabela:** Clorofila ( $\text{mg L}^{-1}$ ), TD: Tempo de duplicação; TC: Taxa de crescimento; DCM: Densidade celular máxima; DCmd: Densidade celular média; COND: Condutividade e pH: potencial Hidrogeniônico da microalga *Messastrum gracile* em cultivo nos meios de cultura CHU<sub>12</sub> e *Eichhornia crassipes*.

PARÂMETROS	CHU <sub>12</sub>	EC
Clorofila-a ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$0,40 \pm 0,08$	$0,74 \pm 0,26$
TD (dias)	3,62	2,66
TC (K)	0,28	0,38
DCM ( $\times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$ )	$150,55 \pm 3,78$	$223,40 \pm 6,98$
DCmd ( $\times 10^5 \text{ cel L}^{-1}$ )	$76 \pm 46,5$	$72 \pm 75$
COND	$759,59 \pm 46,45$	$619,87 \pm 69,06$
pH	$8,97 \pm 0,04$	$8,79 \pm 0,38$

Fonte: Imagem do autor

A clorofila-a é um pigmento encontrado nos organismos fotossintéticos oxigenados, como as plantas, algas e cianobactéria. Sendo de grande importância na fotossíntese, pois absorve e transfere energia luminosa (CHEN, 2015). Dentre os dois meios de cultivo, a *E. crassipes*

apresentou altos teores do pigmento, sendo  $0,74 \text{ mg L}^{-1}$ .

Segundo Jacob et al (2012), a oxigenação do meio de cultura é um dos principais fatores no cultivo das microalgas, pois movimentam as células evitando a decantação da mesma. O pH apresentou resultados semelhantes e alcalinos para os dois meios de cultura. Variações foram observadas na condutividade elétrica quando os meios foram comparados. O meio CHU<sub>12</sub> apresentou maior valor, sendo de  $759,59 \mu\text{Scm}^{-1}$ , já no meio de *Eichhornia crassipes*, a condutividade elétrica foi de  $619,87 \mu\text{Scm}^{-1}$ .

## CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos, o estudo demonstrou que a utilização do meio alternativo da macrófita (*E. crassipes*) para o cultivo da microalga *Messastrum gracile* obteve melhores resultados do que o meio comercial CHU<sub>12</sub>, onde apresentou as maiores densidades celulares e os melhores parâmetros para esta *Chlorophyceae*.

## AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP pelo suporte financeiro (2019/21053-1).

## REFERÊNCIAS

BENAVENTE-VALDÉS, J.R., AGUILAR, C., CONTRERAS-ESQUIVEL, J.C., MÉNDEZ-ZAVALA, A., MONTAÑEZ, J.: Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae Species. - **Biotechnology Reports**, vol.10, p. 117-125, 2016.

CHEN, M. L. I. A cyanobacterium that contains chlorophyll f-a red-absorbing photopigment. **FEBS Lett** v.586 p.3249-3254, 2015.

FONTOURA, J.T.: Crescimento de microalgas em efluente de curtume: remoção de nutrientes, viabilidade de produção de biodiesel e

utilização da biomassa residual. Tese a grau de doutorado em Engenharia na área de couro e biotecnologia pela **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2017.

FRANCISCI, D.; SU, Y.; IITAL, A.; ANGELIDAKI, I.: Evaluation of microalgae production coupled with wastewater treatment. **Environmental Technology**, vol. 39, n.5, p. 581-592, 2018.

GUILLARD, R.R.L. 1973. Division rates. In: STEIN, J. R. (Ed.). Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements, **London: Cambridge University Press**, p. 289-311.

Hu, Z.; Ma, X.; Li, l. Optimal Conditions for the Catalytic and Non-catalytic Pyrolysis of Water Hyacinth. **Energy Conversion and Management** 2015, 94, 337–344.

JACOB, A., BUCHARSKY, E. C., GUENTERSCHELL, K. The Application of Transparent Glass Sponge for Improvement of Light Distribution in Photobioreactors. **Journal of Bioprocessing e Biotechniques**, v.02 n. 01 p. 1-8, 2012.

KHAN, M. I., SHIN, J. H., & KIM, J. D.: The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. **Microbial Cell Factories**, vol. 17(1), 36, 2018.

Masto, R. E.; Kumar, S.; Rout, T. K.; Sarkar, P.; George, J.; Ram, L. C. Biochar from Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and its Impact on Soil **Biological Activity**. *Catena* 2013,111, 64–71.

NUSCH, E.A. **Of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination**. *Archiv für Hydrobiologie*, v. 14, n. 1, p. 14-36, 1980.

PÉREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F.M.E.; DE-BASHAN, L.E.; BASHAN Y. 2011. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. **Water Research**, v.45, n. 1, p.11-36.

SILVA, D.M.: Redução da incrustação em fornos industriais através da produção de

briquetes com resíduos de biomassa de macrófitas aéreas associadas a resíduo de gesso. Dissertação a grau de Mestre em Desenvolvimento de processos ambientais da **Universidade Católica de Pernambuco**, 2017.

SIPAUBA-TAVARES, L. H. et al . Comparison of photoautotrophic and mixotrophic cultivation of microalgae *Messastrum gracile* (Chlorophyceae) in alternative culture media. **Braz. J. Biol.**, São Carlos, 2019.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; BARRA, L. C. C. ; FIORESI, T. B.: *Ankistrodesmus gracilis*(Reisch) Korsikov (Chlorophyta) laboratory cultured in CHU12 and macrophyte with NPK media. **Boletim do Instituto de Pesca**, [S.l.], v. 35, n. 1, p. 111 - 118, nov. 2018. ISSN 1678-2305.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H., FERNANDES, J.B.K., MELO-SANTOS, G.L., SCARDOELI-TRUZZI, B.: Microalgae *Ankistrodesmus gracilis* as feed ingrediente for ornamental fish *Xiphophorus maculatus*. - **Int Aquat Res** vol. 11, p. 125–134, 2019.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H., SEGALI, A.M.D.L., BERCHIELLI-MORAIS, F.A., SCARDOELI-TRUZZI, B.: Development of low-cost culture media for *Ankistrodesmus gracilis* based on inorganic fertilizer and macrophyte. **Acta Limnologica Brasiliensia**, vol. 29, e5, 2017.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; FLORÊNCIO, T.; SCARDOELI-TRUZZI, B.: Aquaculture biological waste as culture medium to cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korshikov. **Brazilian Journal of Biology**, vol.78, n. 3, p. 579 - 587, 2018.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; LUSSER-SEGALI, A.M.D.; SCARDOELLI-TRUZZI B.: **Aquatic Plants: Alternative Medium for Microalgae Growth**. - *Ann Aquac Res* vol. 2(1): p. 1009, 2015.

SIPAUBA-TAVARES, Lúcia Helena et al . Development of low-cost culture media for *Ankistrodesmus gracilis* based on inorganic fertilizer and macrophyte. **Acta Limnol. Bras.**, Rio Claro , v. 29, e5, 2017.