

JIMMY SOARES

**DESENVOLVIMENTO DE MEIOS DE CULTURA A PARTIR DE  
FERTILIZANTES AGRÍCOLAS PARA CULTIVO DE MICROALGAS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Botânica, para obtenção do título  
de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

S676d  
2012

Soares, Jimmy, 1986-  
Desenvolvimento de meios de cultura a partir de fertilizantes  
agrícolas para cultivo de microalgas / Jimmy Soares.  
– Viçosa, MG, 2012.  
xii, 93f. : il. ; 29cm.

Inclui anexo.

Orientador: Márcio Arêdes Martins.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Microalga. 2. Microalga - Cultura e meios de cultura.  
3. Biocombustíveis. I. Universidade Federal de Viçosa.  
II. Título.

CDD 22. ed. 579.83

JIMMY SOARES

**DESENVOLVIMENTO DE MEIOS DE CULTURA A PARTIR DE  
FERTILIZANTES AGRÍCOLAS PARA CULTIVO DE MICROALGAS**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Botânica, para obtenção do título  
de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 13 de abril de 2012.

---

Antônio Galvão do Nascimento  
(Coorientador)

---

Wagner Luiz Araújo

---

Adriano Nunes Nesi

---

Marcio Arêdes Martins  
(Orientador)

**Dedico este trabalho à minha família e amigos.**

*"When they turn the pages of history  
When these days have passed long ago  
Will they read of us with sadness  
For the seeds that we let grow?" (Neil Peart)*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa;

Ao Departamento de Biologia Vegetal;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

À Petrobrás S.A.;

À Professora Rosane Maria de Aguiar Euclides (*in memoriam*);

Ao Professor Marcio Arêdes Martins;

Ao Professor Nerilson Terra Santos;

Ao Professor Antônio Galvão do Nascimento;

Ao Professor Wagner Luiz Araújo;

Ao Professor Adriano Nunes Nesi;

À professora Jane Sélia dos Reis Coimbra;

Ao professor Marcelo Ehlers Loureiro;

Ao professor Fábio Murilo Da Matta;

Aos funcionários Rogério Mauro Gomide e Ângelo Valentim;

Aos novos amigos de Viçosa pela companhia, ajuda e por todos os bons momentos.

## BIOGRAFIA

Jimmy Soares, filho de Ronaldo Aparecido Soares e Maria Aparecida de Araújo Silva Soares, nasceu em 28 de novembro de 1986, na cidade de Pará de Minas, Minas Gerais.

Concluiu o curso de técnico em Administração - área de Gestão pela Escola Técnica de Formação Gerencial/Universidade de Itaúna em 2004.

Em 2009 finalizou o curso de Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade de Itaúna.

Ingressou no programa de pós-graduação em Botânica em 2010 pela Universidade Federal de Viçosa, concluindo os requisitos para obtenção do título de *Magister Scientiae* em abril de 2012.

# SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT .....	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.2 Referências bibliográficas .....	4
2. CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA .....	6
2.1. Microalgas como fonte de triacilgliceróis .....	7
2.2. Gênero <i>Chlorella</i> .....	10
2.3. Gênero <i>Scenedesmus</i> .....	12
2.4. Nutrição mineral e cultivo de microalgas .....	13
2.5. Uso de fertilizantes agrícolas em cultivos de microalgas .....	15
2.6. Parâmetros utilizados em sistemas de cultivo de microalgas .....	17
2.6.1. Aeração e injeção de CO <sub>2</sub> em cultivos de microalgas .....	17
2.6.2. Intensidade luminosa em cultivos de microalgas .....	18
2.6.3. pH em cultivos de microalgas .....	19
2.6.4. Temperatura em cultivos de microalgas.....	20
2.7. Referências bibliográficas .....	21
3. CAPÍTULO II: DESENVOLVIMENTO DE MEIOS DE CULTURA A PARTIR DE FERTILIZANTES AGRÍCOLAS PARA CULTIVO DE MICROALGAS .....	26
3.1. Definição do meio de cultura controle.....	27
3.2. Experimento preliminar: Avaliação do uso de fertilizantes nos cultivos de microalgas.....	29
3.2.1. Objetivo & hipótese.....	29
3.2.2. Materiais & métodos .....	29

3.2.2.1. Obtenção de material biológico e cultivos monoespecíficos ....	29
3.2.2.2. Análise dos meios de cultura a base de fertilizantes solúveis ..	30
3.2.2.3. Produção de inóculos .....	31
3.2.2.4. Delineamento experimental .....	31
3.2.2.5. Condições de cultivo .....	32
3.2.2.6. Contagem de células.....	32
3.2.2.7. Análises estatísticas .....	33
3.2.3. Resultados.....	33
3.2.3.1. Custos dos meios de cultura a base de fertilizantes .....	33
3.2.3.2. Identificação taxonômica de <i>Scenedesmus</i> sp. BR003 .....	34
3.2.3.3. Efeitos de diferentes meios de cultura no cultivo de <i>Chlorella</i> sp. BR001 e <i>Scenedesmus</i> sp. BR003 .....	34
3.2.3.4. Efeitos de diferentes meios de cultura no pH de cultivo de <i>Chlorella</i> sp. BR001 e <i>Scenedesmus</i> sp. BR003 .....	36
3.2.4. Discussão .....	36
3.2.5. Conclusões e considerações para futuros experimentos .....	39
3.3. Desenvolvimento de meios de cultura a partir de fertilizantes granulares e líquidos .....	40
3.4. Experimento I: Efeito de diferentes meios de cultura a base de fertilizantes granulares e líquidos no cultivo de <i>Chlorella</i> sp. BR001 .....	44
3.4.1. Objetivo & hipótese.....	44
3.4.2. Materiais & métodos .....	44
3.4.2.1. Obtenção de material biológico .....	44
3.4.2.2. Produção de inóculos .....	44
3.4.2.3. Delineamento experimental .....	45
3.4.2.4. Condições de cultivo .....	45

3.4.2.6. Curvas de crescimento.....	47
3.4.2.7. Determinação de massa seca .....	47
3.4.2.8. Monitoramento do cultivo por densidade óptica.....	48
3.4.2.9. Análises estatísticas.....	48
3.4.3. Resultados.....	48
3.4.3.1. Efeitos de diferentes meios de cultura no crescimento de <i>Chlorella</i> sp. BR001 .....	48
3.4.3.2. Efeitos de diferentes meios de cultura sobre a massa seca de <i>Chlorella</i> sp. BR001 .....	50
3.4.3.3. Efeitos de diferentes meios de cultura no monitoramento indireto de cultivos de <i>Chlorella</i> sp. BR001 .....	51
3.4.4. Discussão .....	57
3.4.5. Conclusões e considerações para futuros experimentos .....	59
3.5. Experimento II: Efeito de diferentes meios de cultura a base de fertilizantes granulares e líquidos no cultivo de <i>Scenedesmus</i> sp. BR003.....	61
3.5.1. Objetivo & hipótese .....	61
3.5.2. Materiais & métodos .....	61
3.5.2.1. Obtenção de material biológico .....	61
3.5.2.2. Produção de inóculos .....	61
3.5.2.3. Delineamento experimental.....	61
3.5.2.4. Condições de cultivo .....	62
3.5.2.5. Curvas de crescimento.....	63
3.5.2.6. Determinação de massa seca .....	63
3.5.2.7. Extração e quantificação de pigmentos.....	63
3.5.2.8. Extração e quantificação de proteínas hidrossolúveis totais....	64
3.5.2.9. Extração e quantificação de carboidratos neutros totais.....	65

3.5.2.10. Extração e quantificação de lipídeos totais.....	65
3.5.2.11. Medições celulares.....	65
3.5.2.12. Análises estatísticas.....	66
3.5.3. Resultados.....	66
3.5.3.1. Efeitos de diferentes meios de cultura no crescimento de <i>Scenedesmus</i> sp. BR003.....	66
3.5.3.2. Efeitos de diferentes meios de cultura em massa seca de <i>Scenedesmus</i> sp. BR003.....	68
3.5.3.3. Efeitos de diferentes meios de cultura na plasticidade fenotípica de <i>Scenedesmus</i> sp. BR003.....	69
3.5.3.4. Efeitos de diferentes meios de cultura nos pigmentos de <i>Scenedesmus</i> sp. BR003.....	70
3.5.3.5. Efeitos de diferentes meios de cultura nos teores de proteínas hidrossolúveis totais de <i>Scenedesmus</i> sp. BR003.....	72
3.5.3.6. Efeitos de diferentes meios de cultura nos teores de carboidratos neutros totais de <i>Scenedesmus</i> sp. BR003.....	73
3.5.3.7. Efeitos de diferentes meios de cultura nos teores de lipídeos totais de <i>Scenedesmus</i> sp. BR003.....	74
3.5.4. Discussão.....	75
3.5.5. Conclusões e considerações para futuros experimentos.....	80
3.6. Referências bibliográficas.....	82
3.7. Conclusões gerais.....	88
3.8. Anexos.....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

*aff. Affinis*

**Al** Alumínio

**ANOVA** Análise de variância

**B** Boro

**BBM** Meio de cultura Bold

**C** Carbono

**Ca** Cálcio

**Céls** Células

**Cl** Cloro

**Co** Cobalto

**Cr** Cromo

**Cu** Cobre

*e.g. Exempli gratia*

*et al. Et alii*

**Fe** Ferro

**HP** Horsepower

**I** Iodo

**K** Potássio

**MBM** Meio de cultura Bristol modificado

**MC** Meio de cultura para *Chlorella ellipsoidea*

**MDM** Meio de cultura Detmer modificado

**Mg** Magnésio

**Mn** Manganês

**Mo** Molibdênio

**N** Nitrogênio

**Na** Sódio

**P** Fósforo

**r** Taxa instantânea de crescimento

**r<sub>log</sub>** Taxa instantânea de crescimento da fase log de crescimento

**S** Enxofre

**Si** Silício

**sp.** *Species*

**UFV** Universidade Federal de Viçosa

**V** Vanádio

**vvm** Volume de ar por volume de cultura por minuto

**Zn** Zinco

## RESUMO

SOARES, Jimmy M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2012. **Desenvolvimento de meios de cultura a partir de fertilizantes agrícolas para cultivo de microalgas.** Orientador: Marcio Arêdes Martins. Coorientadores: Nerilson Terra Santos e Antônio Galvão do Nascimento.

Pesquisas utilizando microalgas com alto teor de lipídeos como matéria-prima para biodiesel já ocorrem há algumas décadas, mas viabilidade econômica é um dos entraves do cultivo de microalgas, sendo necessária a redução dos custos de produção e aumento dos rendimentos em biomassa. Neste trabalho relata-se o desenvolvimento de 8 meios de cultura elaborados a partir de fertilizantes agrícolas objetivando a redução direta dos custos de cultivo de microalgas. Os meios de cultura apresentaram redução de custos entre 2 e 99 % em relação ao meio de cultura controle (BG11). Os meios de cultura A1, A2 e A3 foram elaborados com fertilizantes líquidos e sólidos solúveis, e foram avaliados no cultivo de *Chlorella* sp. BR001 e *Scenedesmus* sp. BR003. Observou-se que o meio de cultura A3 proporcionou produção de células igual ao meio de cultura BG11 para as duas cepas. Posteriormente, para reduzir ainda mais os custos de cultivos, foram desenvolvidos os meios de cultura B1, B2, B3 e B4 a partir de fertilizantes granulados e líquidos para o cultivo de *Chlorella* sp. BR001. Os meios de cultura proporcionaram produção de células e massa seca iguais em relação ao meio de cultura BG11. *Chlorella* sp. BR001 produziu pouca massa seca, portanto, não é indicada como fonte de lipídeos para a produção de biodiesel. *Scenedesmus* sp. BR003 foi então cultivado nos meios de cultura BG11, B1, B2, B3, B4 e B5. Os meios de cultura B1 e B4 proporcionaram maiores rendimentos para concentração celular em relação ao meio de cultura BG11. Os meios de cultura B1, B2, B3 e B5 proporcionaram maiores rendimentos em massa seca em relação ao meio de cultura BG11. O meio de cultura BG11 proporcionou maior rendimento para proteínas hidrossolúveis totais. Os meios de cultura BG11 e B2 proporcionaram maiores rendimentos para carboidratos neutros totais. O teor de lipídeos não diferiu entre tratamentos. Os meios de cultura B1 e B4 se sobressaíram quanto aos parâmetros estudados de *Scenedesmus* sp. BR003, demonstrando que a composição e a concentração dos fertilizantes são importantes para o cultivo desta microalga. Os fertilizantes agrícolas se mostraram uma alternativa potencial para redução dos custos de cultivos de microalgas para aplicações biotecnológicas.

## ABSTRACT

SOARES, Jimmy M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April, 2012. **Development of culture media from agricultural fertilizers for microalgae cultivation.** Advisor: Marcio Arêdes Martins. Coauthors: Nerilson Terra Santos and Antônio Galvão do Nascimento.

Microalgae research with high lipid content as raw material for biodiesel already occur a few decades, but economic viability is one problem of the microalgae cultivation, being necessary to reduce production costs and increased productivity of biomass. In this manuscript is reported the development of 8 media growth made from agricultural fertilizers for direct reduction of microalgae cultivation costs. The media growth showed a reduction of costs between 2-99 % compared to control medium growth (BG11). The A1, A2 and A3 media growth were prepared with liquid and soluble solids fertilizers, and were evaluated in the cultivation of *Chlorella* sp. BR001 and *Scenedesmus* sp. BR003. The A3 medium growth reached cells concentration equal to the BG11 medium growth for both microalgae. Subsequently, to further reduce the costs of media growth, has developed the media growth B1, B2, B3 and B4 from solids and liquids fertilizers for *Chlorella* sp. BR001 cultivation. The microalgae presented the same yield of cells and dry weight for all alternative media growth and BG11 medium growth. *Chlorella* sp. BR001 showed low dry weight production, leading to the conclusion that this strain is not indicated as a source of lipids for biodiesel. The microalgae *Scenedesmus* sp. BR003 was cultivated in media growth BG11, B1, B2, B3, B4 and B5. The B1 and B4 media growth provided high cell concentrations when compared with the BG11 medium growth. The media growth B1, B2, B3 and B5 provided high dry weight when compared with the BG11 medium growth. The BG11 medium growth has presented highest yield for total soluble protein. The BG11 e B2 media growth has presented largest yields for total neutral carbohydrates. The lipid content is not different among treatments. The B1 and B4 media growth was better for the studied parameters in *Scenedesmus* sp. BR003, demonstrating that the concentration and composition of the fertilizer is important in the microalgae cultivation. The results indicate that *Scenedesmus* sp. BR003 during stationary phase accumulate carbohydrates rather than lipids. Agricultural fertilizers have shown a potential alternative for reducing the cost of microalgae cultivation for biotechnological applications.

# 1. INTRODUÇÃO GERAL

---

Existem registros sobre o consumo de microalgas por humanos há mais de 2000 anos na Ásia (Spolaore *et al.*, 2006). A cianobactéria *Nostoc* era utilizada como alimento em períodos de escassez. Contudo, as técnicas para cultivo de microalgas foram desenvolvidas apenas no final do século XIX (Spolaore *et al.*, 2006).

O cultivo de algas teve início com Ferdinand Cohn em 1850, que manteve uma estirpe de *Haematococcus* viável em seu laboratório. Em 1871 Andrei Sergeevitch Famintzin cultivou algas utilizando soluções de sais inorgânicos utilizados para plantas vasculares. Ainda no século XIX, Martinus Beijerinck obteve cultivos axênicos de *Chlorella*, *Scenedesmus* e outras estirpes de microalgas (Andersen *et al.*, 2005). Melvin Calvin utilizou o gênero *Chlorella* em seus estudos sobre redução do carbono (Calvin, 1962).

O interesse por aplicações comerciais de microalgas surgiu em 1950, como fonte alternativa para alimentos, remédios, tratamento de efluentes e biocombustíveis. Os primeiros cultivos comerciais em larga escala ocorreram no Japão no início da década de 1960. Atualmente microalgas são utilizadas para nutrição humana, cosméticos, ração para animais e princípios ativos para fármacos. A produção global gira em torno de 5000 toneladas anuais e representa um mercado de US\$ 1,25 bilhões (Spolaore *et al.*, 2006).

As pesquisas envolvendo microalgas como fonte energética começaram a se intensificar apenas no início de 1990. Entre 2000-2009 foram publicados 350 artigos científicos, representando quase 50 % de toda publicação sobre o assunto nos últimos 30 anos (Konur, 2011).

Entre 1978 e 1996, foi criado o *Aquatic Species Program* (ASP) pelo *U.S. Department of Energy's Office of Fuels Development*, que objetivou a produção de biodiesel a partir de algas oleaginosas em tanques, utilizando CO<sub>2</sub> oriundo da queima de carvão por usinas termoelétricas. O projeto chegou a ter mais de 3.000 estirpes, avaliando diferentes formas de estresse para aumento de produção lipídica. Foram feitos também avanços importantes na biologia molecular de microalgas. Contudo, o programa não conseguiu desenvolver um processo que fosse viável frente ao preço do petrodiesel na época (Sheehan *et*

*al.*, 1998).

As microalgas podem ser utilizadas como matéria prima em diversos processos de conversão de biomassa em energia. Microalgas com alta produtividade de lipídeos são indicadas para a síntese de biodiesel. Microalgas ricas em amido, celulose e glicogênio podem ser utilizadas para a produção de bioetanol. A biomassa resultante da extração de lipídeos e carboidratos pode ser submetida à digestão anaeróbia para a produção de biogás e reciclagem de nutrientes (Singh & Olsen, 2011).

Pode-se utilizar a biomassa seca e pulverizada diretamente em motores do ciclo Diesel (Illman *et al.*, 2000), assim como aplicá-la em processos como pirólise e termo-liquefação produzindo bio-óleo (Brennan & Owende, 2010). O processo de gaseificação também é aplicável para microalgas, convertendo a biomassa em gasogênio, que pode ser utilizado em motores a gás (Brennan & Owende, 2010). A espécie de microalga selecionada e as condições de cultivo devem ser adequadas para o processo no qual a biomassa será empregada.

Ainda que as rotas de conversão de biomassa algal em biocombustíveis sejam variadas, apenas o biodiesel e o bioetanol possuem expressividade na matriz energética mundial. A produção destes biocombustíveis começou a ser expressiva a partir de 1970, contudo, representam menos de 1 % da produção global de energia (Williams & Laurens, 2010).

O Brasil é referência mundial quanto à produção de bioetanol. Criado em 1975 pelo governo militar brasileiro, o programa de produção de etanol a partir da cana de açúcar economizou US\$ 126,4 bilhões em importação de petróleo (Goldemberg, 2007). Após a estruturação da produção de bioetanol, a atenção se voltou para a produção de biodiesel, que em 2011 chegou a representar 5% de todo o diesel comercializado no país.

O Brasil teve uma produção de 2,4 bilhões de litros de biodiesel em 2010, tendo o óleo de soja como a principal matéria prima. A capacidade de produção instalada de 5,8 bilhões de litros anuais faz do Brasil uma potência mundial na produção e consumo de biodiesel (ANP, 2011).

O biodiesel é obtido pela transesterificação de triacilgliceróis, dando origem a ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos (Chisti, 2007). As vantagens ambientais do biodiesel em relação ao seu análogo fóssil são a redução da emissão de poluentes durante sua combustão, sendo observadas as

reduções de CO, hidrocarbonetos, material particulado e SO<sub>x</sub>, ao passo que há aumento na emissão de NO<sub>x</sub> (Sheehan *et al.*, 1998 ; MCT, 2009).

A matéria-prima para síntese de biodiesel compreende um dos maiores desafios do setor, sua viabilidade está atrelada às variações do preço do petróleo e, sobretudo do óleo no mercado. Chisti (2007) afirma que as microalgas são a única fonte capaz de suprir a demanda de óleo para a produção de biodiesel. Segundo Gouveia & Oliveira (2009) a produção de matéria-prima para biodiesel a partir de microalgas pode ser de 10 a 20 vezes maior do que a produção de plantas oleaginosas. Contudo, tal hipótese ainda carece de mais estudos para ser creditada.

Teoricamente é possível produzir 30.000 litros de óleo por hectare anualmente, levando em conta o rápido crescimento da microalga. Contudo as produções obtidas em campo são 10-20 vezes menores do que o potencial teórico e, ainda, com custo elevado (Hu *et al.*, 2008).

A nutrição mineral de microalgas é importante para o cultivo em larga escala para produção de óleo para biodiesel. A composição do meio nutricional influencia na produção de biomassa e lipídeos por microalgas (Gong & Chen, 1997; Illman *et al.*, 2000; Hsieh & Wu, 2009). Segundo Grima *et al.* (2003), o meio de cultura e CO<sub>2</sub> correspondem à 76 % dos custos diretos do cultivo de *Phaeodactylum tricornutum*. Por outro lado, Li *et al.* (2011) relatam que nutrientes e CO<sub>2</sub> representam 18 % dos custos diretos do cultivo de *Haematococcus pluvialis*.

Os dados e resultados acima demonstraram a necessidade urgente de pesquisas utilizando fontes alternativas de nutrientes, tendo por objetivo reduzir os custos de meios de cultura para microalgas como fonte de lipídeos voltados à produção em larga escala de biodiesel.

## 1.2. REREFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andersen R.A., 2005. Algal culturing techniques, 1<sup>st</sup> ed. **Elsevier Academic Press**.

Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), 2011. Biodiesel - introdução. Available at [www.anp.gov.br/?id=472](http://www.anp.gov.br/?id=472) (verified 23 Dec. 2011). **Ministério de Minas e Energia**, Brazil, DF.

Brennan L., Owende P., 2010. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renew Sust Energ Rev.** 14, 557-577. doi:10.1016/j.rser.2009.10.009.

Calvin M., 1962. The path of carbon in photosynthesis. **Science.** 135, 879-889. doi:10.1126/science.135.3507.879.

Chisti Y., 2007. Biodiesel from microalgae. **Biotechnol Adv.** 25, 294-306. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.02.001.

Goldember J., 2007. Ethanol for a sustainable energy future. **Science.** 315, 808-810. doi:10.1126/science.1137013.

Gong X., Chen F., 1997. Optimization of culture medium for growth of *Haematococcus pluvialis*. **J Appl Phycol.** 9, 437-444. doi:10.1023/A:1007944922264.

Gouveia L., Oliveira A.C., 2009 Microalgae as a raw material for biofuels production. **J Ind Microbiol Biotechnol.** 36, 269–274. doi:10.1007/s10295-008-0495-6.

Grima E.M., Belarbi E.H., Fernández A., Medina A.R., Chisti Y., 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotech Adv.** 20,491-515. doi:10.1016/S0734-9750(02)00050-2.

Hu Q., Sommerfeld M., Jarvis E., Ghirardi M., Posewitz M., Seibert M., Darzins A., 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **Plant J.** 54, 621-639. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03492.x.

Hsieh C.H., Wu W.T., 2009. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. **Bioresour Technol.** 100, 3921-3926. doi:10.1016/j.biortech.2009.03.019.

Illman A.M., Scragg A.H., Shales S.W., 2000. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme Microb Technol.** 27, 631-635. doi:10.1016/S0141-0229(00)00266-0.

Konur O., 2011. The scientometric evaluation of the research on the algae and bio-energy. **Appl Energ.** 88,3532-3540. doi:10.1016/j.apenergy.2010.12.059.

Li J., Zhu D., Niu J., Shen S., Wang G., 2011. An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. **Biotechnol Adv.** 29, 568-574. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.04.001.

Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), 2009. Testes e ensaios para validação do uso da mistura biodiesel B5 em motores e veículos, 1<sup>st</sup> ed. **Ministério da Ciência e Tecnologia**, Brasília.

Sheehan J., Dunahay T., Benemann J., Roessler P. A look back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program-biodiesel from algae. **National Renewable Energy Laboratory**, Golden, CO; 1998. Report NREL/TP-580-24190.

Singh A., Olsen, S.I., 2011. A critical review of biochemical conversion, sustainability and life cycle assessment of algal biofuels. **Appl Energ.** 88, 3548-3555. doi:10.1016/j.apenergy.2010.12.012.

Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A., 2006 Commercial applications of microalgae. **J Biosci Bioeng.** 101, 89-96. doi: 10.1263/jbb.101.87.

Williams P.J.L.B., Laurens L.M.L., 2010. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. **Energy Environ Sci.** 3, 554-590. doi:10.1039/b924978h.

# **CAPÍTULO I: REVISÃO DE LITERATURA**

## **2.1. MICROALGAS COMO FONTE DE TRIACILGLICERÓIS**

Microalgas são micro-organismos unicelulares, ocorrendo na forma de células individuais ou coloniais. O termo abrange organismos eucariotos talófitos e procariotos, de origens evolutivas diferentes, mas capazes de realizar fotossíntese oxigênica e possuírem clorofila *a* como pigmento principal (Williams & Laurens, 2010; Sigh & Olsen, 2011).

As sínteses de ácidos graxos e triacilgliceróis em microalgas são pouco estudadas. Análises *in silico* e a identificação de enzimas indicam que as etapas chave da regulação da síntese *de novo* de ácidos graxos, o seu transporte para o retículo endoplasmático, assim como a síntese de glicerolípídeos são bastante similares às que ocorrem em plantas terrestres (Hu *et al.*, 2008; Khozin-Goldberg & Cohen, 2011).

As sínteses de ácidos graxos e triacilgliceróis compreendem a carboxilação de acetil-CoA formando malonil-CoA, o alongamento das cadeias acil e a formação de triacilgliceróis (Courchesne *et al.*, 2009). A síntese de ácidos graxos ocorre principalmente no cloroplasto (Hu *et al.*, 2008), ao passo que a síntese de triacilgliceróis ocorre na mitocôndria ou no retículo endoplasmático em eucariotos, e no citoplasma em procariotos (Courchesne *et al.*, 2009)

Com o objetivo de aumentar a síntese de lipídeos, já foram realizados trabalhos para aumentar a expressão de acetil-CoA carboxilase, ácido graxo sintase, e enzimas envolvidas na produção de precursores de acetil-CoA, assim como a inibição da  $\beta$ -oxidação (Khozin-Goldberg & Cohen, 2011). Além disso, para adequar o perfil graxo da microalga para a síntese de biodiesel pode-se aumentar a expressão de tioesterases e silenciar desaturases, reduzindo, respectivamente, o tamanho das cadeias dos ácidos graxos, e a quantidade de insaturações para produzir triacilgliceróis monoinsaturados ou saturados (Khozin-Goldberg & Cohen, 2011).

As vantagens das microalgas em relação às plantas terrestres como matéria prima para biocombustíveis se devem por não necessitarem de solos férteis, agrotóxicos e grandes volumes de água. As microalgas possuem alta taxa de crescimento, grande capacidade de assimilação de CO<sub>2</sub>, e podem utilizar resíduos de agroindústrias e águas residuárias como substrato (Gouveia &

Oliveira, 2009; Williams & Laurens, 2010; Park *et al.*, 2011). Além disso, as condições de cultivo de microalgas podem ser facilmente manipuladas para a produção de conteúdos celulares de interesse (Illman *et al.*, 2000; Ho *et al.*, 2010).

O consumo de água para cultivo de microalgas é menor em relação às plantas terrestres. São consumidos cerca de 10.000 litros de água para se produzir 1 litro de biocombustível a partir de plantas terrestres. Estima-se que para uma microalga com 50 % de lipídeos, sejam consumidos 1,5 litros de água para 1 litro de biocombustível. Mas na prática o consumo é maior, devido aos sistemas de resfriamento dos fotobiorreatores e as perdas por evaporação em tanques (Wijffels & Barbosa, 2010).

O cultivo de microalgas também reduz os problemas relacionados à fertilização de plantas terrestres, como as perdas por lixiviação e contaminação de corpos hídricos por fertilizantes (Huo *et al.*, 2011). Contudo, também ocorrem perdas consideráveis (3-5 %) de nitrogênio (N) por volatilização, contribuindo para problemas ambientais. Como os cultivos de microalgas acontecem em sistemas de cultivos controlados (*e.g.* tanques e fotobiorreatores), tais problemas podem ser dirimidos (Huo *et al.*, 2011).

Os táxons mais estudados e promissores para a produção de lipídeos são os *phyla* Chlorophyta e Bacillariophyta (Sheehan *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2008). O filo Chlorophyta apresenta o maior número de microalgas com potencial para a produção de lipídeos, sendo também de distribuição cosmopolita, e de fácil isolamento e cultivo *in vitro*. O filo *Chlorophyta* apresenta em média 26 % de lipídeos em massa seca, podendo triplicar este valor em cultivos sob condições de estresse (Hu *et al.*, 2008). A produção lipídica é espécie-específica, o que amplia a possibilidade de isolamento de novas espécies potenciais para aplicações biotecnológicas (Hu *et al.*, 2008).

O gênero *Chlorella* é amplamente estudado, tendo sido um dos primeiros a ser comercialmente explorado. Atualmente cultiva-se *Chlorella* para nutrição humana e animal, e uso em cosméticos. É o segundo gênero mais cultivado dentre as microalgas, com uma produção anual de 2000 toneladas de massa seca. A cianobactéria *Arthrospira* é a microalga mais cultivada, com uma produção anual de 3000 toneladas de massa seca (Spolaore *et al.*, 2005). *Scenedesmus*, outro gênero de Chlorophyta, é apontado com potencial para aplicações biotecnológicas, pois além de possuir alta taxa de crescimento e teor

de lipídeos, é capaz de crescer em altas concentrações de CO<sub>2</sub> (Gouveia & Oliveira, 2009; Mandal & Mallick, 2009; Yoo *et al.*, 2010; Griffiths *et al.*, 2011). Com base nos relatos da literatura optou-se por cultivar os gêneros *Chlorella* e *Scenedesmus* com o propósito de desenvolver meios de cultura alternativos.

## 2.2. GÊNERO *Chlorella*

---

*Chlorella* (do grego *chloros*, verde; *ella*, diminuto), possui células individuais, de formato esférico, globular ou elipsoide. As células não apresentam motilidade, e possuem diâmetro entre 2-10 µm, sendo cercadas por uma parede celular delgada composta principalmente de celulose, e possuem um cloroplasto parietal que pode apresentar pirenóide. Células de *Chlorella* não apresentam flagelos, estigma ou vacúolos contrácteis, mas apresentam um núcleo central. Ocorrem em água doce e marinha, sendo cosmopolita (Phukan *et al.*, 2011).

O gênero *Chlorella* apresenta resposta diferenciada para diferentes condições de cultivo. Converti *et al.* (2009) relataram que diferentes concentrações de NaNO<sub>3</sub> (0,075 à 0,300 g L<sup>-1</sup>) não afetaram a taxa de crescimento de *C. vulgaris*, mas triplicaram o teor de lipídeos nos cultivos com menos N. Contudo, a deficiência de N pode afetar negativamente a taxa de crescimento sem alterar a produção final de lipídeos totais (Liang *et al.*, 2009).

Mesmo as espécies dentro do gênero *Chlorella* apresentam respostas diferenciadas em relação à concentração de N do meio de cultura. Illman *et al.* (2000) observou que dentre 5 espécies (*C. vulgaris*, *C. emersonii*, *C. protothecoides*, *C. sorokiniana* e *C. minutissima*), apenas *C. sorokiniana* não apresentou maior teor de lipídeos em meio com baixo teor de N em relação ao controle. Por outro lado, *C. minutissima* foi a única espécie que não apresentou menor taxa de crescimento no meio com baixo teor de N em relação ao controle.

A síntese de lipídeos também pode ser estimulada por cultivos em meios de cultura ricos em ferro (Fe). Liu *et al.* (2008), triplicaram o teor de lipídeos produzidos pela espécie em cultivo contendo  $1,2 \times 10^{-5}$  M de Fe em relação à concentração de  $1,2 \times 10^{-6}$  M.

O perfil graxo do gênero também é indicado para a síntese de biodiesel. Os lipídeos de *C. protothecoides* resultam num biodiesel com características similares ao petrodiesel, mas possui viscosidade e ponto de entupimento a frio superiores ao determinado pela *American Society for Testing and Materials* (ASTM) (Miao & Wu, 2006). Griffiths *et al.* (2011) observaram que *C. vulgaris* possui perfil graxo adequado para a síntese de biodiesel, exceto pelo ponto de entupimento a frio. Contudo, estas características indesejáveis ao biodiesel

também podem ser encontradas no biodiesel sintetizado a partir do óleo de plantas terrestres (Knothe *et al.*, 2005).

### **2.3. GÊNERO *Scenedesmus***

---

*Scenedesmus* (do grego *skene*, tenda; *desmos*, vínculo), caracteriza-se por apresentar colônia cenobial com 4, 8 ou 16 células arranjadas linearmente, podendo ocorrer formas com uma ou duas células. As células são cilíndricas com as extremidades arredondadas ou pontiagudas e possuem um único cloroplasto com pirenóide. Possui reprodução assexuada, sendo capaz de formar suas próprias colônias, e não há ocorrência de zoósporos flagelados. Células parentais se dividem dando origem a células não flageladas que se alinham lateralmente, sendo ligadas pela parede celular. Novas divisões ocorrem pela quebra do cenóbio. O gênero é comum em água doce e ocasionalmente em águas salobras (Graham & Wilcox, 1999).

Segundo Yoo *et al.* (2010) *Scenedesmus* sp. KCTC AG20831 pode apresentar maiores rendimentos em biomassa do que *Chlorella vulgaris* KCTC AG10032 e *Botryococcus braunii* UTEX 572. Ainda que *Scenedesmus* sp. KCTC AG20831 apresente menor teor lipídico nas células em relação à *Botryococcus braunii* UTEX 572, a produtividade de lipídeos é maior em função do grande rendimento em biomassa.

Mandal & Mallick (2009) relataram que *Scenedesmus obliquus* cultivado em deficiência de N e fósforo (P) pode aumentar o teor de lipídeos por volta de 60 %. Contudo os cultivos em condições de deficiência de nutrientes afetam negativamente a produção de biomassa.

O estudo do perfil graxo de *S. obliquus* também reforça o potencial do gênero como fonte de lipídeos para biodiesel. Gouveia & Oliveira (2009) avaliaram o perfil graxo de 6 microalgas, e concluíram que *S. obliquus* possui perfil graxo mais adequado para a produção de biodiesel, destacando-se o ácido linolênico (18:2) e poliinsaturados. Resultados similares também foram reportados por Griffiths *et al.* (2011).

## 2.4. NUTRIÇÃO MINERAL DE MICROALGAS

---

Além de uma cepa com alto rendimento em lipídeos para biodiesel, é necessário um meio de cultura adequado a microalga. Os meios de cultura devem atender a todos os requerimentos nutricionais da microalga, contudo a extrema heterogeneidade das microalgas dificulta a realização de generalizações sobre sua nutrição (O'Kelley, 1968). Diversos meios de cultura são reportados na literatura, sendo propostos para grupos inteiros de microalgas até meios de cultura espécie-específicos. Em geral, os meios de cultura são compostos de sais inorgânicos, extratos do solo, água do mar, vitaminas e fontes de carbono.

A concentração ótima de cada nutriente deve possibilitar uma taxa máxima de crescimento, reprodução e fotossíntese da microalga. Contudo, uma única concentração ótima pode não ser ideal para as três taxas. A concentração ótima parte do princípio de que uma concentração menor seja limitante ao crescimento da população, ao passo que concentrações elevadas de nutrientes podem inibir o crescimento ou serem tóxicas para a microalga (Ketchum, 1954).

Os elementos dos meios de cultura são classificados em macronutrientes e micronutrientes, em função das quantidades que são assimilados pelas microalgas. Os macronutrientes são carbono (C), N, P, potássio (K), enxofre (S), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e Fe. Os micronutrientes são o manganês (Mn), cobre (Cu), zinco (Zn), molibdênio (Mo), cloro (Cl), sódio (Na), cobalto (Co), boro (B), iodo (I) e vanádio (V). O silício (Si) é considerado um macronutriente para o filo Bacillariophyta (Ketchum, 1954, O'Kelley, 1968, Grobbellaar, 2004). O Fe é considerado um micronutriente por alguns autores (Quigg *et al.*, 2003). Segue uma breve revisão sobre os elementos N, P, K e Ca, que foram importantes para a parte experimental do presente trabalho (Capítulo II).

O N representa 1-10 % da biomassa algácea, comumente fornecido em meios de cultura nas formas de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  ou  $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$  (Grobbellar, 2004). O consumo de  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NH}_4^+$  influi diretamente no potencial hidrogeniônico (pH). Assim, a assimilação de  $\text{NH}_4^+$  pode reduzir o pH, enquanto a assimilação de  $\text{NO}_3^+$  o aumenta (Ketchum, 1954). Os sintomas observados de deficiência de N são a descoloração das células pela redução dos teores de clorofilas e aumento de carotenóides, redução da taxa fotossintética, assim como acúmulo de

polissacarídeos e lipídeos (Kaplan *et al.* 1986; Grobbellar, 2004). A deficiência de N leva a célula a uma degradação preferencial de um ou mais tipos de macromoléculas contendo N, resultando numa considerável redução de tamanho da célula (Kaplan *et al.* 1986). Algumas microalgas são sensíveis à altas concentrações de  $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ , tendo o crescimento inibido por concentrações da ordem de 1 mM (Kaplan *et al.* 1986).

Microalgas geralmente apresentam um teor de P de 1 % por massa seca (Grobbellar, 2004). O P é utilizado em vários processos celulares, especialmente em processos de transferência de energia e na síntese de ácidos nucléicos (Kaplan *et al.* 1986). Alguns sintomas apresentados por depleção de P são similares aos de deficiência de N. São observadas reduções no teor de clorofila *a*, de adenosina trifosfato (ATP), e aumento dos teores de carboidratos (Kaplan *et al.* 1986; Grobbellar, 2004).

Provavelmente uma das maiores diferenças entre o metabolismo de algas e plantas se deve ao acúmulo de polifosfato (Ketchum, 1954). O P pode se acumular em concentrações superiores à quantidade necessária por microalgas. Este acúmulo pode sustentar até 4 gerações de células. O P é armazenado em grânulos de polifosfato. Suspeita-se que esta vantagem evolutiva surgiu por causa de baixas concentrações de P inorgânico em ambientes naturais (Reynolds, 2006).

Quando cultivadas em meio deficiente em K, as microalgas apresentam menor taxa de crescimento e fotossíntese, e alta taxa respiratória (Ketchum, 1954). Algumas algas apresentam alto teor de carboidratos quando cultivadas em deficiência deste elemento (O'Kelley, 1968). O K está envolvido em várias rotas catalíticas, como ativador ou co-fator de enzimas na respiração e metabolismo de carboidratos. Também é relacionado à permeabilidade de membrana (Yarish & Edwards, 1980).

O'Kelley (1968), afirma que todas as algas possuem demanda por Ca, mas que algumas vezes é difícil de ser identificada. Um exemplo é o gênero *Chlorella* que possui pequena demanda por Ca, neste caso sendo considerado um micronutriente. Segundo este mesmo autor, o Ca é elemento importante para a síntese *de novo* de substâncias pécticas em paredes celulares, sendo importante para a formação de colônias, assim como a liberação de zoósporos, por ativar enzimas de lise de parede celular.

## 2.5. USO DE FERTILIZANTES AGRÍCOLAS EM CULTIVOS DE MICROALGAS

---

O uso de fertilizantes agrícolas é uma alternativa potencial para substituir total ou parcialmente o uso de sais inorgânicos de pureza analítica, comumente utilizados em escala laboratorial para formulação de meios de cultura. Tal alternativa tem por objetivo reduzir os custos de cultivo de microalgas para fins diversos, podendo, inclusive, obter rendimentos iguais em biomassa em relação ao meio de cultura padrão (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999; Raof *et al.*, 2006).

Raof *et al.* (2006) avaliaram o uso de super fosfato simples, muriato de potássio e bicarbonato de sódio comercial no cultivo de *Spirulina platensis*. Um dos meios alternativos avaliados (RM<sub>6</sub>) possibilitou a mesma produção de massa seca, proteína e clorofila em relação ao meio de cultura controle (Zarrouk). O custo para elaboração do meio de cultura foi reduzido de US\$ 0,0795 L<sup>-1</sup> (meio de cultura controle) para US\$ 0,0160 L<sup>-1</sup> (meio de cultura alternativo).

Ak (2011) cultivou *S. platensis* em meio contendo fertilizante agrícola líquido. Foi verificada uma relação inversa entre o rendimento de massa seca e a concentração de fertilizantes, sugerindo que a alta concentração de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pode ter danificado as células de *S. platensis*. Rendimentos significativos de massa seca somente foram obtidos quando o fertilizante líquido foi utilizado juntamente com NaNO<sub>3</sub> e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

*Isochrysis aff. galbana* (Clone T-ISO) foi cultivada em meio f/2 e em meio de cultura alternativo contendo NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, Fe-EDTA, Fe-não quelado, MnSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub> e enxofre. Não foram observadas diferenças na produção final de células entre os meios de cultura, apesar de que a assimilação dos nutrientes ao longo do tempo foi diferenciada entre os meios de cultura. A análise elementar do NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> demonstrou pequenas quantidades de alumínio (Al), cromo (Cr), Fe, Mn e Zn. Contudo as concentrações de micronutrientes encontradas no fertilizante eram inferiores às da composição do meio de cultura f/2 (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999). A mesma espécie não apresentou diferenças significativas nos teores de carboidratos, proteínas, lipídeos e clorofila a entre os dois meios de cultura (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002).

Os fertilizantes podem ser complementados com a adição de extratos de solo, micronutrientes ou vitaminas, de forma a provir um meio de cultura mais

completo para as microalgas (Fabregas *et al.*, 1987). Em cultivo de *Tetraselmis suecica* utilizando N-P-K 7-12-7 e extrato de solo foi possível obter uma produção de 1 kg de proteína por US\$ 0,36, mas os rendimentos em proteína, concentração celular e clorofila *a* foram maiores no meio controle (Fabregas *et al.*, 1987).

Guzmán-Murillo *et al.* (2007) cultivaram *Phaeodactylum tricornutum* em 15 meios de cultura diferentes, contendo nutrientes ricos em N e P. Foi observado que as concentrações celulares foram mais influenciadas pela fonte de N do que pela concentração de N no meio de cultura. Alguns dos meios de cultura a base de fertilizantes proporcionaram maiores concentrações de carboidratos totais e proteínas totais hidrossolúveis em relação ao meio de cultura controle (f/2). Por outro lado, os meios de cultura não apresentaram diferença significativa para a produção de exopolissacarídeos.

Os resultados de literatura demonstram que os sais inorgânicos de pureza analítica podem ser substituídos por fertilizantes agrícolas no cultivo de microalgas, mantendo rendimentos similares e reduzindo os custos de cultivo. Contudo não foram encontrados trabalhos que empregam fertilizantes agrícolas em meios de cultura para cultivo de microalgas para a produção de lipídeos, reforçando ainda mais a necessidade de pesquisas nessa área.

## **2.6. PARÂMETROS UTILIZADOS EM SISTEMAS DE CULTIVOS DE MICROALGAS**

---

Para conseguir bons rendimentos em biomassa, além de uma cepa potencial e um meio de cultura correto, é necessário um sistema de cultivo de microalgas bem estruturado. Em laboratórios o sistema de cultivo autotrófico de microalgas é composto basicamente por uma fonte de luz, um dispositivo para homogeneização da cultura, injeção de CO<sub>2</sub> e controle de temperatura, em fotobiorreatores mais modernos existem sistemas para o monitoramento e controle de pH, nutrientes e gases. Os diferentes parâmetros de cultivo e respostas de crescimento de microalgas reportados em literatura dificultam na escolha de parâmetros do delineamento experimental. A determinação de todos os parâmetros através de experimentos se torna impraticável, tão logo, alguns parâmetros utilizados no presente trabalho foram determinados com base na literatura.

### **2.6.1. AERAÇÃO E INJEÇÃO DE CO<sub>2</sub> EM CULTIVOS DE MICROALGAS**

A assimilação de carbono em microalgas acontece pelo Ciclo de Calvin ou Ciclo C<sub>3</sub>, fixando o carbono inorgânico pela ribulose 1,5- bifosfato carboxilase oxigenase (RubisCO). A atividade oxigenase da RubisCO reduz sua eficiência na fixação de CO<sub>2</sub> (Giordano *et al.*, 2005).

Muitas microalgas desenvolveram mecanismos concentradores de carbono para suprir as deficiências da enzima RubisCO e reduzir a competição entre CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>. Os mecanismos concentradores de carbono aumentam a concentração intracelular de CO<sub>2</sub> no sítio da carboxilação (Rost *et al.*, 2006). Microalgas do filo Chlorophyta podem assimilar CO<sub>2</sub> e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> como fontes de carbono inorgânico (Giordano *et al.*, 2005). A concentração de carbono inorgânico compreende o transporte ativo de carbono inorgânico contra um gradiente de concentração por anidrases carbônicas, aumentando a concentração de CO<sub>2</sub> no sítio de carboxilação da RubisCO (Giordano *et al.*, 2005).

Ainda que microalgas possam assimilar  $\text{HCO}_3^-$ , os cultivos de microalgas *in vitro* comumente são supridos por ar enriquecido com  $\text{CO}_2$  (Illman *et al.*, 2000; Ho *et al.*, 2010; Yoo *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2011). A taxa de aeração para microalgas é expressa em volume de ar por volume de cultura por minuto (vvm). A aeração tem por objetivo evitar a formação de gradientes gasosos e de nutrientes, assim como evitar a sedimentação da microalga. Ryu *et al.* (2009) reporta que a aeração ideal para cultivo de *Chlorella* sp. AG10002 é 0,2 vvm. Não foram encontrados outros estudos em literatura que investigam diferentes taxas de aeração. Yoo *et al.* (2010) utilizaram uma taxa de aeração de 0,3 vvm para cultivos de *Chlorella vulgaris* KCTC AG10031, *Scenedesmus* sp. KCTC AG20831 e *Botryococcus braunii* UTEX 572. Zhao *et al.* (2011) cultivaram *Chlorella* sp. (2011) com uma taxa de aeração de 0,2 vvm.

O ar pode ser enriquecido com  $\text{CO}_2$  para proporcionar maiores rendimentos em biomassa, sendo expresso em percentual do volume total da mistura injetada no cultivo. Microalgas são capazes de fixar uma maior quantidade de  $\text{CO}_2$  do que a presente no ar (Jiang *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2011). Ryu *et al.* (2009) estudaram diferentes concentrações de  $\text{CO}_2$  (0,5-5 %) em cultivo de *Chlorella* sp. AG10002. Maiores rendimentos em biomassa foram obtidos quando foram utilizadas maiores concentrações de  $\text{CO}_2$ . Ho *et al.* (2010), investigaram o crescimento de *S. obliquus* em diferentes concentrações de  $\text{CO}_2$  obtendo a maior concentração de biomassa ( $3,51 \text{ g L}^{-1}$ ) quando aplicaram 10 % de  $\text{CO}_2$  no cultivo. de Morais & Costa *et al.* (2007) reportaram que *S. obliquus* é capaz de crescer em concentrações de até 18 % de  $\text{CO}_2$ . Tomado por base os dados apresentados, para a etapa experimental (Capítulo II) determinou-se a vazão de ar em 0,2 vvm, sendo enriquecido com 5 % de  $\text{CO}_2$ .

## 2.6.2. INTENSIDADE LUMINOSA EM CULTIVOS DE MICROALGAS

Cultivos de microalgas em regime de autotrofia são diretamente dependentes da luz. A penetração de luz em um sistema de cultivo é inversamente proporcional à concentração celular. Além disto, o auto-sombreamento das células pode ocasionar baixa produtividade lipídica em função de uma baixa produção de biomassa (de Morais & Costa, 2007; Liang *et al.*, 2009).

O cultivo *in vitro* de microalgas ocorre em intensidades luminosas que

variam entre 50-2500  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , mas geralmente a intensidade luminosa fica na faixa dos 100  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Nalewajko et al., 1997; Illman et al., 2000; Sakamoto & Bryant, 2002; Liu et al., 2008; Gouveia & Oliveira, 2009; Mandal & Mallick, 2009; Khalil et al., 2010; Moazami-Goudarzi & Colman, 2012).

Estudos envolvendo diferentes intensidades luminosas nos cultivos de *Scenedesmus obliquus* CNW-N e *Nannochloropsis* sp. demonstraram que maiores intensidades luminosas resultaram em maiores rendimentos de biomassa (Ho et al., 2010; Pal et al., 2011). Ho et al. (2010) relataram inibi\u00e7\u00e3o do crescimento de *Scenedesmus obliquus* CNW-N apenas em intensidades luminosas superiores \u00e0 540  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Fisher et al. (1998) observaram mudan\u00e7as ultra-estruturais em *Nannochloropsis* sp. quando cultivada em diferentes intensidades luminosas, como o aumento do volume dos cloroplastos e n\u00famero de grana por cloroplasto em condi\u00e7\u00f5es de menor intensidade luminosa. Tamb\u00e9m ocorrem mudan\u00e7as no n\u00facleo e corpos de reserva. N\u00e3o foram observadas mudan\u00e7as em mitoc\u00f4ndrias e vac\u00f3olos.

Por outro lado, Sakamoto & Bryant (2002) n\u00e3o observaram diferen\u00e7as no crescimento da cianobact\u00e9ria *Synechococcus* sp. PCC 7002 quando cultivada em 250 e 2500  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A partir dos resultados apresentados optou-se por utilizar nos experimentos do presente trabalho (Cap\u00edtulo II) uma intensidade luminosa pr\u00f3xima de 100  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### **2.6.3. pH EM CULTIVOS DE MICROALGAS**

O pH do meio de cultura \u00e9 outro fator importante, podendo afetar o crescimento de microalgas. A faixa de pH \u00f3tima \u00e9 esp\u00e9cie-espec\u00edfica, podendo se situar entre 4 e 11. O ac\u00famulo de conte\u00fados celulares (e.g. prote\u00ednas, carboidratos e pigmentos) tamb\u00e9m variam entre esp\u00e9cies em fun\u00e7\u00e3o do pH (Khalil et al., 2010).

Em meio aquoso as concentra\u00e7\u00f5es de  $\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{CO}_3^{2-}$  s\u00e3o estritamente correlacionadas com o pH. Quando o pH do meio aquoso aumenta, a concentra\u00e7\u00e3o de  $\text{CO}_3^{2-}$  se eleva, enquanto a concentra\u00e7\u00e3o de  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{CO}_2$  decrescem (Reynolds, 2006). Em pH 8,2, cerca de 1 % do  $\text{CO}_2$  total \u00e9 encontrado na forma de  $\text{CO}_2$ , 90 % na forma de  $\text{HCO}_3^-$  e o restante na forma de

$\text{CO}_3^{2-}$  (Nielsen, 1975 *apud* Chen & Durbin, 1994).

Microalgas que assimilam carbono inorgânico preferencialmente na forma de  $\text{HCO}_3^-$  podem ter o crescimento inibido em pHs maiores que 10. Nesta condição a maior parte do carbono orgânico está na forma de  $\text{CO}_3^{2-}$  (Falkowski & Raven, 1997 *apud* Khalil et al., 2010). Por outro lado, microalgas capazes de crescer em lagos ácidos, podem apresentar alta tolerância a elevadas concentrações de metais pesados e consumir  $\text{CO}_2$ , ao invés de  $\text{HCO}_3^-$ . Isso deve-se ao fato que a proporção de metais pesados disponíveis em meio ácido é maior do que em condições alcalinas (Nalewajko *et al.*, 1997).

Khalil *et al.* (2010) observou maiores rendimentos em massa seca de *Chlorella ellipsoidea* em pHs acima de 9, enquanto, Nalewajko *et al.* (1997) obteve maiores taxas de crescimento para três estirpes de *Scenedesmus* em pHs menos ácidos (5,5-6,5) do que em condições mais ácidas (4,5-5). Como as cepas de *Chlorella* e *Scenedesmus* utilizadas no presente trabalho não foram isoladas de ambientes extremos, optou-se por manter os pHs dos cultivos entre 6-8.

#### **2.6.4. TEMPERATURA EM CULTIVOS DE MICROALGAS**

A temperatura é outro fator que interfere no crescimento de microalgas. Converti *et al.* (2009) observaram que *C. vulgaris* não teve sua taxa de crescimento afetada quando cultivada entre 25-30 °C, a temperatura de 35 °C afetou negativamente seu crescimento, enquanto a temperatura de 38 °C foi letal. A temperatura de 25 °C proporcionou um acúmulo 3 vezes maior de lipídeos do que 30 °C.

Estudando representantes do filo Bacillariophyta, Montagnes & Franklin (2001) observaram que existe uma relação inversa entre o volume das células e a temperatura, assim como uma relação direta entre a taxa de crescimento e temperatura. Contudo, diferentes temperaturas (10-30 °C) apresentaram pouco efeito em *Fragilaria capucina* (Chaffin *et al.*, 2011). Para o presente trabalho a temperatura de 25 °C foi escolhida para os cultivos em salas com temperatura controlada (Itens 3.2 e 3.5), porque as cepas de *Chlorella* e *Scenedesmus* foram isoladas no município de Viçosa, que apresenta temperatura média de 18 °C no mês mais frio e 22 °C no mês mais quente (Magalhães, 2007).

## 2.7. REREFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Ak I., 2011. Effect of an organic fertilizer on growth of blue-green alga *Spirulina platensis*. **Aquacult Int.** doi:10.1007/s10499-011-9473-5.

Chaffin J.D., Mishra S., Kuhaneck R.M., Heckathorn S.A., Bridgeman T.B., 2011. Environmental controls on growth and lipid content for the freshwater diatom, *Fragilaria capucina*: A candidate for biofuel production. **J Appl Phycol.** doi:10.1007/s10811-011-9732-x.

Chen C.Y., Durbin E.G., 1994. Effects of pH on the growth and carbon uptake of marine phytoplankton. **Mar Ecol Prog Ser.** 109, 83-94. doi:10.3354/meps109083.

Converti A., Casazza A.A., Ortiz E.Y., Perego P. Borghi M.D., 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chem Eng Process.** 48, 1146-1151. doi:10.1016/j.cep.2009.03.006.

Courchesne N.M.D., Parisien A., Wang B., Lan C.Q., 2009. Enhancement of lipid production using biochemical, genetic and transcription factor engineering approaches. **J Biotechnol.** 141, 31-41. doi:10.1016/j.jbiotec.2009.02.018.

de Moraes M.G., Costa J.A.V., 2007. Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors. **Biotechnol Lett.** 29, 1349-1352. doi:10.1007/s10529-007-9394-6.

Fabregas J., Toribio L., Abalde J., Cabezas N., Herrero C., 1987. Approach to biomass production of the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kylin) butch using common garden fertilizer and soil extract as cheap nutrient supply in batch cultures. **Aquacult Eng.** 6, 141-150. doi:10.1016/0144-8609(87)90011-2.

Fisher T., Berner T., Iluz D., Dubinsky Z., 1998. The kinetics of the photoacclimation response of *Nannochloropsis* sp. (Eustigmatophyceae): a study of changes in ultrastructure and PSU density. **J. Phycol.** 34, 818-824. doi:10.1046/j.1529-8817.1998.340818.x.

Giordano M., Beardall J., Raven J.A., 2005. CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in algae: Mechanisms, environmental modulation, and evolution. **Annu Rev Plant Biol.** 56, 99-131. doi:10.1146/annurev.arplant.56.032604.144052.

Gouveia L., Oliveira A.C., 2009 Microalgae as a raw material for biofuels production. **J Ind Microbiol Biotechnol.** 36, 269-274. doi:10.1007/s10295-008-0495-6.

Graham L.E., Wilcox L.W., 1999. Algae, 1<sup>st</sup> ed. **Benjamin Cummings**.

Griffiths M.L., van Hille R.P., Harrison S.T.L., 2011. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. **J Appl Phycol**. doi:10.1007/s10811-011-9723-y.

Grobbelaar J.U., 2004. Algal nutrition: mineral nutrition, in: Richmond A. (Ed.), Microalgal culture: Biotechnology and applied phycology. **Blackwell Science**, pp. 97-115.

Guzmán-Murillo M.A., López-Bolaños C.C., Ledesma-Verdejo T., Roldan-Libenson G., Cadena-Roa M.A., Ascencio F., 2007. Effects of fertilizer-based culture media on the production of exocellular polysaccharides and cellular superoxide dismutase by *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin). **J Appl Phycol**. 19, 33-41. doi:10.1007/s10811-006-9108-9.

Ho S.H., Chen W.M., Chang J.S., 2010. *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO<sub>2</sub> mitigation and biodiesel production. **Bioresour Technol**. 101, 8725-8730. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.112.

Huo Y.X., Wernick D.G., Liao J.C., 2011. Toward nitrogen neutral biofuel production. **Curr Opin Biotechnol**. 23, 1-8. doi:10.1016/j.copbio.2011.10.005.

Illman A.M., Scragg A.H., Shales S.W., 2000. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme Microb Technol**. 27, 631-635. doi:10.1016/S0141-0229(00)00266-0.

Jiang L., Luo S., Fan X., Yang Z., Guo R., 2011. Biomass and lipid production of marine microalgae using municipal wastewater and high concentration of CO<sub>2</sub>. **Appl Energ**. 88, 3336-3341. doi:10.1016/j.apenergy.2011.03.043.

Kaplan D., Richmond A.E., Dubinsky Z., Aaronson A., 1986. Algal nutrition. In: Richmond, A. (Ed.), Handbook of microalgal mass culture. **CRC Press**, pp. 147-198.

Ketchum B.H., 1954. Mineral nutrition of phytoplankton. **Annu Rev Plant Phys**. 5, 55-74. doi:10.1146/annurev.pp.05.060154.000415.

Khalil Z.I., Asker M.M.S., El-Sayed S., Kobbia I.A., 2010. Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*. **World J Microbiol Biotechnol**. 26, 1225-1231. doi:10.1007/s11274-009-0292-z.

Khozin-Goldberg I., Cohen Z., 2011. Unraveling algal lipid metabolism: Recent advances in gene identification. **Biochimie**. 93, 91-100. doi:10.1016/j.biochi.2010.07.020.

Knothe G., van Gerpen J., Krahl J., 2005. The biodiesel handbook, 1<sup>st</sup> ed. **AOCS Press**.

- Li X., Xu H., Wu Q., 2007. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. **Biotechnol Bioeng.** 98, 764-771. doi:10.1002/bit.21489.
- Liang Y., Sarkany N., Chi Y., 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnol Lett.** 31, 1043–1049. doi:10.1007/s10529-009-9975-7.
- Liu Z.Y., Wang G.C., Zhou. B.C., 2008. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresour Technol.** 99, 4717-4722. doi:10.1016/j.biortech.2007.09.073.
- Liu J., Huang, J., Sun, Z., Zhong, Y., Jiang, Y., Chen, F., 2011. Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: assessment of algal oils for biodiesel production. **Bioresour Technol.** 102, 106-110. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.017.
- Magalhães A.B.S.D., 2007. Ocorrência de cianobactérias em mananciais de abastecimento de água para consumo humano no município de Viçosa-MG. Dissertação de mestrado. Viçosa. **Universidade Federal de Viçosa.** Brasil. 126p.
- Mandal S., Mallick N., 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. **Appl Microbiol Biotechnol.** 84, 281-291. doi:10.1007/s00253-009-1935-6.
- Miao X., Wu Q., 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresour Technol.** 97, 841-846. doi:10.1016/j.biortech.2005.04.008.
- Moazami-Goudarzi M., Colman B., 2012. Changes in carbon uptake mechanisms in two green marine algae by reduced seawater pH. **J Exp Mar Biol.** 413, 94-99. doi:10.1016/j.jembe.2011.11.017.
- Montagnes D.J.S., Franklin D.J., 2001. Effect of temperature on diatom volume, growth rate, and carbon and nitrogen content: Reconsidering some paradigms. **Limnol Oceanogr.** 46, 2008-2018.
- Nalewajko C., Colman B., Olaveson M., 1997. Effects of pH on growth, photosynthesis, respiration, and copper tolerance of three *Scenedesmus* strains. **Environ Exper Bot.** 37, 153-160. doi:doi:10.1016/S0098-8472(96)01029-5.
- O'Kelley J.C., 1968. Mineral nutrition of algae. **Annu Rev Plant Phys.** 19, 89-112. doi:10.1146/annurev.pp.19.060168.000513.
- Pal D., Khozin-Goldberg I., Cohen Z., Boussiba S., 2011. The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. **Appl Microbiol Biotechnol.** 90, 1429-1441. doi:10.1007/s00253-011-3170-1.
- Park J.B.K., Craggs R.J., Shilton A.N., 2011. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. **Bioresour Technol.** doi:10.1016/j.biortech.2010.06.158.

Phukan M.M., Chutia R.S., Konwar B.K., Kataki R., 2011. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. **Appl Energ.** 88, 3307-3312. doi:10.1016/j.apenergy.2010.11.026.

Quigg A., Finkel Z.V., Irwin A.J., Rosenthal Y., Ho T.Y., Reinfelder J.R., Schofield O., Morel F.M.M., Falkowski P.G., 2003. The evolutionary inheritance of elemental stoichiometry in marine phytoplankton. **Nature.** 425, 291-294. doi:10.1038/nature01953.

Raof B., Kaushik B.D., Prasanna R., 2006. Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. **Biomass Bioenerg.** 30, 537-542. doi:10.1016/j.biombioe.2005.09.006.

Reynolds C., 2006. Ecology of phytoplankton. **Cambridge University Press.**

Rost B., Riebesell U., Sültemeyer D., 2006. Carbon acquisition of marine phytoplankton: Effect of photoperiod length. **Limnol Oceanogr.** 51, 12-20. doi:10.4319/lo.2006.51.1.0012.

Ryu H.J., Oh K.K., Kim Y.S., 2009. Optimization of the influential factors for the improvement of CO<sub>2</sub> utilization efficiency and CO<sub>2</sub> mass transfer rate. **J Ind Eng Chem.** 15, 471-475. doi:10.1016/j.jiec.2008.12.012.

Sakamoto T., Bryant D.A., 2002. Synergistic effect of high-light and low temperature on cell growth of the  $\Delta 12$  fatty acid desaturase mutant in *Synechococcus* sp. PCC 7002. **Photosynth Res.** 72, 231-242. doi:10.1023/A:1019820813257.

Singh A., Olsen, S.I., 2011. A critical review of biochemical conversion, sustainability and life cycle assessment of algal biofuels. **Appl Energ.** 88, 3548-3555. doi:10.1016/j.apenergy.2010.12.012.

Sobczuk T.M., Camacho F.G., Grima E.M., Chisti Y., 2006. Effects of agitation on the microalgae *Phaeodactylum tricornutum* and *Porphyridium cruentum*. **Bioprocess Biosyst Eng.** 28, 243-250. doi:10.1007/s00449-005-0030-3.

Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E., Isambert A., 2006 Commercial applications of microalgae. **J Biosci Bioeng.** 101, 89-96. doi: 10.1263/jbb.101.87.

Valenzuela-Espinoza E., Millán-Núñez R. Cebrero-Núñez F., 1999. Biomass production and nutrient uptake by *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. **Aquacult Eng.** 20, 135-147. doi:10.1016/S0144-8609(99)00011-4.

Valenzuela-Espinoza E., Millán-Núñez R., Cebrero-Núñez F., 2002. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll *a* content in *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-

Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. **Aquacult Eng.** 25, 207-216. doi:10.1016/S0144-8609(01)00084-X.

Wijffels R.H., Barbosa M.J., 2010. An outlook on microalgal biofuel. **Science.** 329, 796-799. doi:10.1126/science.118900.

Williams P.J.L.B., Laurens L.M.L., 2010. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. **Energy Environ Sci.** 3, 554-590. doi:10.1039/b924978h.

Yarish C., Edwards P., Casey S., 1980. The effects of salinity, and calcium and potassium variations on the growth of two estuarine red algae. **J Exp Mar Biol Ecol.** 47, 235-249. doi:10.1016/0022-0981(80)90041-6.

Yoo C., Jun., S.Y., Lee, J.Y., Ahn, C.Y., Oh, H.M., 2010. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. **Bioresour Technol.** 101, S71-S74. doi:10.1016/j.biortech.2009.03.030.

Zhao B., Zhang Y., Xiong K., Zhang Z., Hao H., Liu T., 2011. Effect of cultivation mode on microalgal growth and CO<sub>2</sub> fixation. **Chem Eng Res Des.** 89, 1758-1762. doi:10.1016/j.cherd.2011.02.018.

**3. CAPÍTULO II: DESENVOLVIMENTO DE MEIOS DE  
CULTURA A PARTIR DE FERTILIZANTES AGRÍCOLAS  
PARA CULTIVO DE MICROALGAS**

### **3.1. DETERMINAÇÃO DO MEIO DE CULTURA CONTROLE**

Os meios de cultura BG11 e Bold (BBM) (Andersen *et al.*, 2005), meio para *Chlorella ellipsoidea* (MC), Bristol modificado (MBM) e Detmer modificado (MDM) (Watanabe, 1960) e o meio com baixo teor de N (Illman *et al.*, 2000) foram analisados quanto à composição e o custo para produção de 1 L de meio de cultura (Anexo, Tabelas A1 e A4). Os valores dos sais inorgânicos de pureza analítica foram obtidos junto à empresa Sigma-Aldrich. Todos os valores dos sais inorgânicos de pureza analítica foram recalculados para um valor de compra de 100 g. Entre os meios de cultura que apresentaram menor custo, BBM, MBM e BG11, este último foi escolhido também pelo fato de apresentar um maior teor de N. O meio de cultura BG11 é reportado pela literatura em cultivos de microalgas para a produção de lipídeos (Yoo *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2011), sendo outro fator favorável à sua escolha como meio de controle.

Os meios de cultura que apresentaram menor custo por litro foram o BBM e MBM, seguidos do BG11. O meio de cultura mais caro foi o meio com baixo teor de N (Tabela 1). Os meios de cultura BBM, MBM, MDM e MC tiveram suas composições alteradas (Anexo, Tabela A1).

**Tabela 1** – Custo da produção de 1 litro de meio de cultura com nutrientes de pureza analítica.

<b>Meio de cultura</b>	<b>Custo (R\$)</b>
BG11	0,4109
BBM	0,2478
MBM	0,2642
MDM	0,7130
MC	1,4011
Baixo teor de N	1,9469

Observou-se que os meios de cultura reportados na literatura apresentam considerável amplitude de custos. Os custos dos meios de cultura MDM, MC e baixo teor de N inviabilizam seu uso na produção de lipídeos para biodiesel, que é um produto de baixo valor agregado. Além disso, esses meios de cultura não representam, necessariamente, melhores rendimentos em biomassa e lipídeos.

Illman *et al.* (2000) encontraram diferentes respostas no cultivo de cinco espécies do gênero *Chlorella* entre os meios de cultura MC e baixo teor de N.

O meio de cultura BG11 possui um custo intermediário dentre os meios de cultura pesquisados (R\$ 0,4109 L<sup>-1</sup>), e possui elevada quantidade de N. O N possui importante papel na divisão celular, produção de biomassa e acúmulo de lipídeos (Illman *et al.*, 2000; Hsiesh & Wu, 2009). Scragg *et al.* (2002) obtiveram maior produtividade de massa seca para *Chlorella vulgaris* e *Chlorella emersonii* em MC do que em meio com baixo teor de N. O uso de meios ricos em N também se justifica pela possibilidade de cultivo em duas etapas (Ho *et al.* 2010). Esta técnica de cultivo consiste em cultivar a cepa em meio rico em N para ganho de biomassa e depois transferi-la a um meio deficiente em N para acúmulo de lipídeos.

O meio de cultura BG11 foi utilizado como meio de cultura controle em todos os experimentos de desenvolvimento de meio de cultura a base de fertilizantes do presente trabalho.

## **3.2. EXPERIMENTO PRELIMINAR: AVALIAÇÃO DO USO DE FERTILIZANTES NOS CULTIVOS DE MICROALGAS**

---

### **3.2.1. OBJETIVO & HIPÓTESE**

Os fertilizantes agrícolas líquidos e solúveis apresentam a vantagem de serem solúveis em água, reduzindo problemas como o aumento da turbidez do meio de cultura por partículas em suspensão e a sedimentação de nutrientes. Um experimento foi delineado para avaliar a produção de microalgas nos meios de cultura desenvolvidos a partir de fertilizantes. Os meios de cultura foram denominados A1, A2 e A3. Para o experimento foram utilizadas as cepas *Chlorella* sp. BR001 e *Scenedesmus* sp. BR003. O objetivo principal foi elaborar um meio de cultura de baixo custo com desempenho pelo menos equivalente a um meio de cultura de emprego mais amplo, como o BG11.

Testou-se a seguinte hipótese: *Chlorella* sp. BR001 e *Scenedesmus* sp. BR003 apresentam diferenças estatísticas quanto à produção de células quando cultivadas em meio de cultura controle e meios de cultura a base de fertilizantes.

### **3.2.2. MATERIAIS & MÉTODOS**

#### **3.2.2.1. Obtenção de materiais biológicos e cultivo monoespecífico**

A cepa de *Chlorella* sp. BR001 foi obtida junto à Coleção de Cianobactérias e Microalgas – Projeto Petrobrás, do Laboratório de Ficologia do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Para isolamento da estirpe de *Scenedesmus*, procedeu-se com a coleta de fitoplâncton em diferentes lagoas artificiais da UFV utilizando-se rede de fitoplâncton com abertura de malha de 20 µm e copo coletor. Os materiais coletados foram acondicionados em frascos de vidro de boca larga de 250 mL e hermeticamente fechados. Foram utilizados cerca de 60 % do volume total do recipiente, sendo registrado o local e data da coleta.

O material coletado foi analisado no Laboratório de Ficologia da UFV por microscopia de luz (CX40 RF 100, Olympus Corporation) utilizando-se objetivas de 20 e 40 vezes de magnificação. As amostras foram submetidas ao

enriquecimento (Kugrens *et al.*, 2000) e cultivadas em meio de cultura BG 11 com pH  $7,4 \pm 0,1$  (Andersen *et al.*, 2005).

As culturas em enriquecimento foram acondicionadas em placas de Petri autoclavadas e cultivadas em sala de cultivo do Laboratório de Ficologia da UFV, sob condições fotoautotróficas de crescimento: temperatura de  $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 16:8 (luz:escuro), irradiância média de  $60 \mu\text{mols f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  na altura da bancada, proveniente de duas lâmpadas fluorescentes de 40 W.

As características morfológicas foram utilizadas para identificação do material com base na literatura. Após obtenção de crescimentos diferenciados de culturas algais, aplicou-se a técnica de micropipetagem para obtenção da linhagem monoespecífica (Krugens *et al.*, 2000). A microalga foi depositada na Coleção de Cianobactérias e Microalgas – Projeto Petrobrás, do Laboratório de Ficologia da UFV com o nome de *Scenedesmus* sp. BR003.

### **3.2.2.2. Análise dos meios de cultura a base de fertilizantes solúveis**

Foram pesquisados fertilizantes solúveis comerciais no município de Viçosa, MG, e regiões próximas. Foram selecionados 2 fertilizantes líquidos com macro e micronutrientes, denominados fertilizante 1 (Biofert Universal, Biokits Indústria e Comércio Ltda.), fertilizante 2 (Nutriverde, Nutriplast Indústria e Comércio Ltda.). O terceiro meio de cultura foi elaborado com 3 fertilizantes na forma de sólidos solúveis (Linha Ferti, Fertilizantes Heringer), monofosfato de amônio fertirrigação (3.1), sulfato de potássio fertirrigação (3.2) e nitrato de cálcio fertirrigação (3.3), contendo macronutrientes. As composições dos fertilizantes são apresentadas em Anexo, Tabela A2. Foram desenvolvidos 3 meios de cultura a base de fertilizantes, A1, A2 e A3 (Tabela 2). Os meios de cultura foram supridos com sais inorgânicos de pureza analítica para ficarem similares ao meio de cultura BG11.

**Tabela 2** – Composição dos meios de cultura a base de fertilizantes solúveis.

Composto	Meio de cultura (g L <sup>-1</sup> )		
	A1	A2	A3
Fertilizante 1	1 <sup>a</sup>		
Fertilizante 2		0,2 <sup>a</sup>	
Fertilizante 3.1			2,0625
Fertilizante 3.2			0,0517
Fertilizante 3.3			0,0367
<b>Suplementação com sais inorgânicos de pureza analítica</b>			
Citrato férrico de amônio	0,00396	0,00600	0,00600
Ácido cítrico	0,00396	0,00600	0,00600
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,03600	0,02880	
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	0,00104	0,00104	0,00104
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,02000	0,02000	0,02000
NaNO <sub>3</sub>	1,08000	1,50000	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O		0,06450	0,07500
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		0,00286	0,00286
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O		0,00181	0,00181
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O		0,00022	0,00022
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O		0,00008	0,00008
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O		0,00039	0,00039
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O		0,00005	0,00005

<sup>a</sup>Quantidade adicionada em mL da solução de fertilizante.

### 3.2.2.3. Produção de inóculos

A produção de inóculos e os cultivos foram realizados em sala de cultivo do Laboratório de Ficologia do Departamento de Biologia Vegetal da UFV. As cepas *Chlorella* sp. BR001 e *Scenedesmus* sp. BR003 foram inoculadas em Erlenmeyers de 50 mL utilizando meio de cultura BG11 com pH 6,5 ± 0,1, em condições fotoautotróficas de crescimento descritas no item 3.2.2.1. Quando os inóculos alcançavam concentrações entre 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> células por mililitro (céls mL<sup>-1</sup>), estes eram transferidos para Erlenmeyers de volume maior, e o volume completado com meio de cultura fresco até a obtenção de 300 mL de inóculos.

Todas as vidrarias e o meio de cultura utilizados na produção de inóculos foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 minutos (Kawachi & Noël, 2005).

### 3.2.2.4. Delineamento experimental

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado onde se avaliou o cultivo de *Chlorella* sp. BR001 e *Scenedesmus* sp. BR003 em 4 meios de cultura diferentes. Os meios de cultura foram BG11 (controle), A1, A2 e A3 com 3 repetições. As microalgas foram cultivadas ao mesmo tempo, mas

foram analisadas em separado por não possuírem a mesma concentração celular no momento da inoculação. O delineamento resultou em 12 unidades experimentais por cada cepa.

### **3.2.2.5. Condições de cultivo**

Os cultivos monoespecíficos das cepas foram realizados em condições fotoautotróficas de crescimento: temperatura de  $30 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 16:8 h (luz:escuro), irradiância média na altura da bancada de  $92 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$  proveniente de 8 lâmpadas fluorescentes de 40 W. Os cultivos foram realizados em Erlenmeyers de 50 mL contendo 30 mL de meio de cultura e 10 mL de inóculo ( $25 \% v v^{-1}$  de inóculo). As unidades experimentais foram mantidas em agitador orbital a 95 rotações por minuto (rpm).

As vidrarias e os meios de cultura foram esterilizados conforme item 3.2.2.3. Os fertilizantes comerciais utilizados como fonte primária de N foram adicionados após a esterilização. Isto se deve a possibilidade da fonte de N dos fertilizantes comerciais ser amônia, que volatiliza durante esterilização em autoclave (Harrison & Berges, 2005).

As concentrações celulares dos inóculos foram de  $5,41 \times 10^7$  céls mL<sup>-1</sup> para *Chlorella* sp. BR001 e  $8,75 \times 10^6$  céls mL<sup>-1</sup> para *Scenedesmus* sp. BR003. Após a inoculação, a concentração celular reduziu em média para  $1,39 \times 10^7$  céls mL<sup>-1</sup> para *Chlorella* sp. BR001 e  $2,37 \times 10^6$  céls mL<sup>-1</sup> para *Scenedesmus* sp. BR003. Os pHs dos meios de cultura foram ajustados a  $6,5 \pm 0,1$  com NaOH ou HCl antes das inoculações.

Após 7 dias de cultivo os meios de cultura foram avaliados para cada espécie quanto a concentração celular final. Os pHs dos tratamentos foram aferidos no início e final do cultivo.

### **3.2.2.6. Contagem de células**

Foram coletados 100  $\mu\text{L}$  dos cultivos e fixados em 900  $\mu\text{L}$  de formalina neutra tamponada  $10 \% (v v^{-1})$ , tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 6,8. Foram feitas três coletas para cada unidade experimental. As contagens foram realizadas em câmara de Neubauer utilizando-se microscópio de luz (modelo CX40 RF 100, Olympus Corporation) configurado com a objetiva de 20 vezes de

magnificação.

### 3.2.2.7. Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. A ANOVA e o teste de Tukey foram executados no *software* SAS (versão 9.2, SAS Institute). Para a confecção dos gráficos foi utilizado o *software* SigmaPlot (versão 11.0, Systat Software).

## 3.2.3. RESULTADOS

### 3.2.3.1. Custos dos meios de cultura a base de fertilizantes

Os custos dos meios de cultura A1 e A2 foram próximos ao do meio de cultura controle (BG11). Considerando o meio BG11 como padrão de comparação, os meios de cultura A1 e A2 apresentaram menor economia quando comparados ao meio de cultura A3. A Tabela 3 contém os custos finais dos meios de cultura a base de fertilizantes juntamente com a suplementação com sais inorgânicos de pureza analítica do meio de cultura controle.

**Tabela 3** – Custo da produção de 1 litro de meio de cultura alternativo.

Meio de cultura	Custo (R\$)	Suplementação com BG11 (R\$)	Custo final (R\$)	Economia em relação ao BG11 (%)
A1	0,0558	0,2790	0,3349	18,50
A2	0,0109	0,3934	0,4043	1,61
A3	0,0092	0,0333	0,0425	89,66

Os custos dos meios de cultura A1 e A2 foram maiores, uma vez que eram fontes de macro e micronutrientes. Contudo, o custo do meio de cultura BG11 se deve principalmente às fontes de N, P e K. A fonte de N,  $\text{NaNO}_3$ , corresponde à quase 80 % do custo do meio de cultura BG11. O meio de cultura A3 apresentou uma redução de custo de 89,7 % em relação ao meio de cultura controle por substituir totalmente as fontes de N, P, K e Ca.

### 3.2.3.2. Identificação taxonômica de *Scenedesmus* sp. BR003

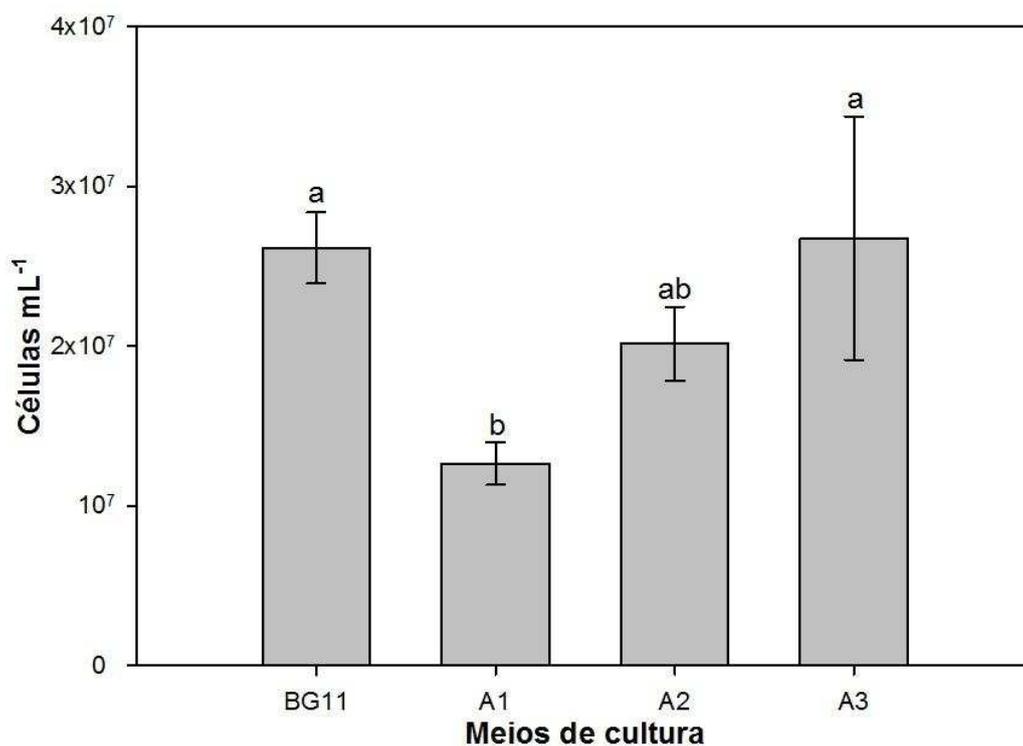
A cepa de *Scenedesmus* sp. BR003 isolada apresentou as seguintes características morfológicas: cenóbios geralmente com 4 células, apresentando alinhamento alternado. As células possuíam formato de meia lua para as células da extremidade e fusiformes a lunadas para as células do meio do cenóbio. As extremidades das células eram agudas, não sendo observada a presença de espinhos. As células possuíam um cloroplasto. O cloroplasto possuía um pirenoide, mas esse nem sempre foi observado nas células.

### 3.2.3.3. Efeitos de diferentes meios de cultura no cultivo de *Chlorella* sp. BR001 e *Scenedesmus* sp. BR003

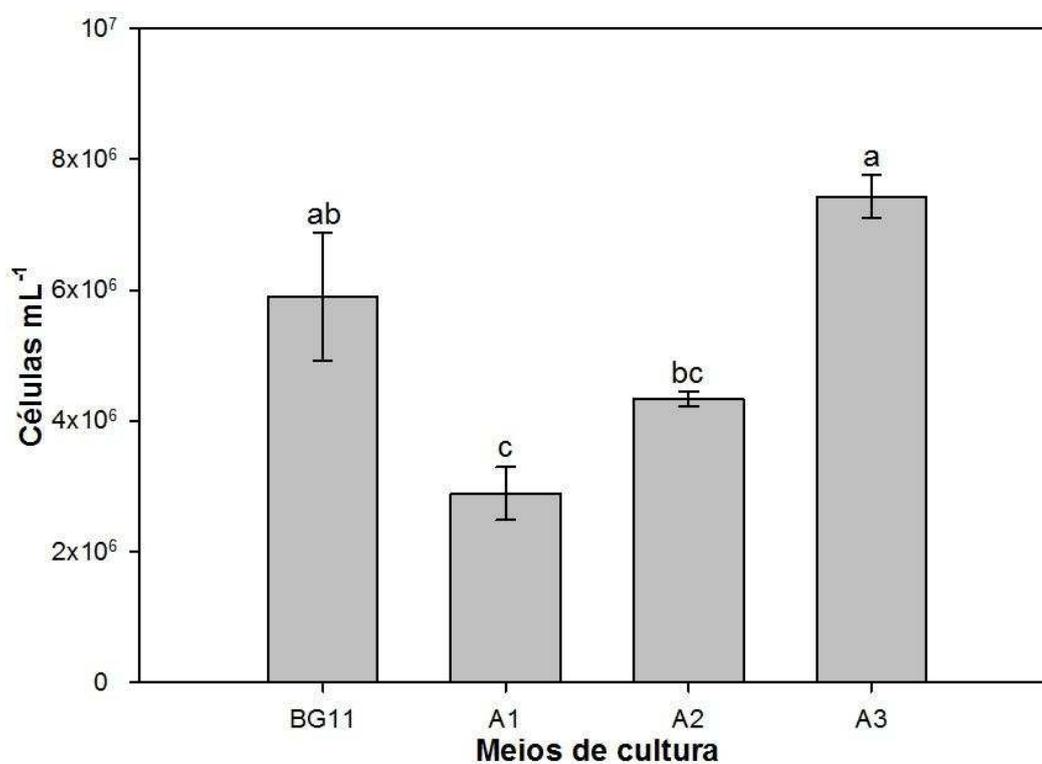
As cepas *Chlorella* sp. BR001 e *Scenedesmus* sp. BR003 apresentaram concentrações celulares finais diferentes quando cultivadas em meio de cultura BG11. A cepa *Chlorella* sp. BR001 apresentou maior concentração celular do que *Scenedesmus* sp. BR003,  $2,6 \times 10^7$  céls mL<sup>-1</sup> e  $5,9 \times 10^6$  céls mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Porém as concentrações celulares finais não foram estatisticamente comparadas entre as duas cepas por não terem sido ajustadas a um mesmo valor no início do cultivo. Os meios de cultura foram comparados individualmente para cada cepa.

As concentrações celulares finais para *Chlorella* sp. BR001 foram estatisticamente maiores para os meios de cultura BG11, A2 e A3 (Figura 1). O aumento do número de células nesses meios de cultura do primeiro dia de cultivo para o sétimo dia de cultivo foi de aproximadamente 2 vezes.

Para *Scenedesmus* sp. BR003 as concentrações celulares finais foram estatisticamente superiores para os meios de cultura BG11 e A3 (Figura 2). Houve incremento de células de 2,8 vezes do primeiro para o sétimo dia de cultivo, para estes meios de cultura.



**Figura 1** – Concentração celular final de *Chlorella* sp. BR001 no 7º dia, cultivada em diferentes meios de cultura. Barras contendo diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.



**Figura 2** – Concentração celular final de *Scenedesmus* sp. BR003 no 7º dia, cultivado em diferentes meios de cultura. Barras contendo diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

### 3.2.3.4. Efeitos de diferentes meios de cultura no pH de cultivo de *Chlorella* sp. BR001 e *Scenedesmus* sp. BR003

O pH apresentou pouca alteração entre as duas cepas para um mesmo meio de cultura. As maiores variações de pH ocorreram nos meios de cultura BG11 e A2. Os meios de cultura A1 e A3 se comportaram como soluções tamponadas durante o ajuste inicial de pH, assim como ocorreram poucas variações ao término dos cultivos. As médias de variações de pH se encontram na Tabela 4.

**Tabela 4** – Variação do pH em cultivo de 7 dias de *Chlorella* sp. BR001 e *Scenedesmus* sp BR003.

Meio de cultura	pH inicial	pH ajustado	pH final para BR001	pH final para BR003
BG11	7,2	6,5 ± 0,1	9,14 ± 0,10	9,34 ± 0,10
A1	4,26	6,5 ± 0,1	7,05 ± 0,22	6,61 ± 0,05
A2	5,75	6,5 ± 0,1	9,60 ± 0,10	9,44 ± 0,10
A3	5,16	6,5 ± 0,1	6,18 ± 0,04	6,22 ± 0,02

### 3.2.4. DISCUSSÃO

A cepa de *Scenedesmus* foi identificada a partir de descrições do gênero na literatura. Uma característica comum ao gênero são a formação de colônias planas, com 2, 4, 8 ou 16 células arranjadas paralelamente entre si através do maior eixo (An *et al.*, 1999; Lüring, 2003; Hindák & Hindáková, 2008). Durante o isolamento optou-se por micropipetar apenas cenóbios com 4 células. A cepa isolada apresentou principalmente cenóbios com 4 células.

Algumas espécies do gênero apresentam células em apenas uma linha, enquanto outras espécies apresentam células alternadas (Hindák & Hindáková, 2008). *Scenedesmus* possui células de diferentes formatos, mas sempre alongadas. Os polos das células podem se agudos ou alongados, a parede celular é lisa ou pode conter ornamentações, com ou sem espinhos. O gênero apresenta apenas um cloroplasto parietal e um pirenóide (Komárek & Fott, 1983 *apud* Hegewald, 1997). A estirpe isolada apresentava células alongadas com formato diferenciado entre as células da extremidade e as do meio do cenóbio, não sendo alinhadas entre si.

Posteriormente a presença de espinhos nas extremidades das células se

tornou uma característica para a criação do gênero *Desmodesmus*, enquanto espécies sem espinhos foram colocadas dentro do gênero *Scenedesmus* (Lürling, 2003). A cepa isolada é pertencente ao gênero *Scenedesmus*, porque não apresentou espinhos nas extremidades das células.

Nos meios de cultura a base de fertilizantes foram obtidas diferentes concentrações celulares finais, mas o custo por litro de meio de cultura foi reduzido para todos os meios desenvolvidos no presente trabalho.

Os fertilizantes solúveis 1 e 2 são compostos por macro e micronutrientes (Anexo, Tabela A2). Para suplementação de macronutrientes, aumentou-se também as dosagens de micronutrientes. Os elementos cobalto, cobre e zinco foram adicionados em concentrações 20 vezes maiores para o meio de cultura A1 em relação ao meio de cultura BG11. Já o meio de cultura A2 teve uma concentração 10 vezes maior de cobre e 4 vezes maior de zinco quando comparado ao meio de cultura BG11.

O meio de cultura A3 apresentou maior produção de células em relação aos meios de cultura A1 e A2 para *Chlorella* sp. BR001 e *Scenedesmus* sp. BR003 (Figura 1). A produção de células no meio de cultura A3 foi estatisticamente igual em relação ao meio de cultura BG11, demonstrando que a formulação do meio de cultura A3 foi adequada para as duas cepas avaliadas. O meio de cultura A2 teve produção significativamente igual em relação aos meios de cultura A3 e BG11 apenas para *Chlorella* sp. BR001. Pacheco-Vega & Sánchez-Saavedra (2009) também obtiveram concentrações celulares similares cultivando *Chaetoceros muelleri* em meios de cultura f/2 e a base de fertilizantes.

O meio de cultura A3 teve uma dosagem cerca de 100 vezes maior de P em relação ao controle, mas deve-se levar em conta que o meio de cultura BG11 é deficiente em P em relação aos demais meios de cultura analisados como meio controle. A concentração de P no meio de cultura A3 corresponde ao dobro da concentração do meio de cultura MC.

A menor concentração de células obtida no meio de cultura B1 provavelmente se deve às maiores concentrações de cobre ( $0,585 \text{ mg L}^{-1}$ ), cobalto ( $0,234 \text{ mg L}^{-1}$ ) e zinco ( $1,17 \text{ mg L}^{-1}$ ) em relação ao BG11. Concentrações de cobre acima de  $0,127 \text{ mg L}^{-1}$  inibem a atividade fotossintética de *Chlorella pyrenoidosa*. A menor atividade da fotossíntese em altas concentrações de cobre é resultado da inativação do centro de reação do fotossistema II e inibição

do transporte de elétrons da plastoquinona  $Q_A^-$  para  $Q_B$  (Jianrong & Qiran, 2009). Fargašová *et al.* (1999) também observou a toxicidade do cobre para *Scenedesmus quadricauda* na concentração de  $0,33 \text{ mg L}^{-1}$ .

Osman *et al.* (2004) observaram que o cobalto apresenta efeito tóxico na produção de biomassa de *Scenedesmus obliquus* em concentrações acima de  $2 \text{ mg L}^{-1}$ . Plekhanov & Chemeris (2003) relataram redução da atividade fotossintética de *Chlorella pyrenoidosa* na menor quantidade de cobalto utilizada em seus experimentos ( $5,89 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Segundo Omar (2002) o zinco apresentou efeito positivo no crescimento de *Scenedesmus obliquus* e *Scenedesmus quadricauda* em concentrações entre  $0,5-1,5 \text{ mg L}^{-1}$ , na faixa de  $1,5-8 \text{ mg L}^{-1}$  foi observado efeito inibitório sobre o crescimento das duas espécies. *Chlorella vulgaris* cultivada em meios de cultura com concentrações variadas de zinco ( $0,33-5,23 \text{ mg L}^{-1}$ ), teve seu crescimento inibido em concentrações superiores à  $3,92 \text{ mg L}^{-1}$  (Huang *et al.*, 2009).

Supõe-se que o cobalto e zinco tenham exercido um menor efeito negativo do que o cobre na produção de células do meio de cultura A1, já que as concentrações utilizadas são menores do que as concentrações tóxicas reportadas na bibliografia (Omar, 2002; Plekhanov & Chemeris, 2003; Osman *et al.*, 2004 e Huang *et al.*, 2009). O meio de cultura A2 possui concentrações de  $0,22 \text{ mg L}^{-1}$  de cobre e  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  de zinco. Estas concentrações parecem não exercer efeito negativo na produção de células de *Chlorella* sp. BR001.

Verificou-se aumento do valor de pH nos cultivos com os meios de cultura BG11 e A2 para as duas cepas. Os meios de cultura A1 e A3 tiveram pouca variação de pH, se comportando como soluções tamponadas para ambas as cepas. Os meios tamponados apresentam vantagens em relação a meios não tamponados, pois dispensam o monitoramento e consumo de corretivos durante o cultivo. Khalil *et al.* (2010) cultivaram *Chlorella ellipsoidea* em diferentes faixas de pH, obtendo maiores rendimentos em massa seca em pHs 9 e 10.

Nalewajko *et al.* (1997) verificaram que o pH ótimo para a atividade fotossintética foi variável entre três cepas de *Scenedesmus*, sendo 8 para duas cepas e entre 6-7 para a terceira cepa.

É provável de que o pH não tenha sido um fator limitante para o crescimento de *Chlorella* sp. BR001 e *Scenedesmus* sp. BR003, uma vez que as microalgas nos meios de cultura BG11 e A3 apresentaram concentrações

celulares finais iguais, mas o pH apresentou-se alcalino para o meio de cultura BG11 e levemente ácido para o meio de cultura A3.

### **3.2.5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES PARA EXPERIMENTOS FUTUROS**

O uso de fertilizantes agrícolas comerciais se mostrou promissor para a substituição dos sais inorgânicos de pureza analítica de meios de cultura convencionais utilizados nos cultivos de microalgas.

O meio de cultura A3 se mostrou potencial para o cultivo de microalgas em escala comercial. O meio de cultura A3 apresentou produção de células igual ao meio de cultura BG11, e o custo da produção foi reduzido em cerca de 90 % em relação ao meio de cultura controle. O meio de cultura A2 ainda que tenha apresentado bom potencial para cultivo de microalgas, não parece uma alternativa interessante, por ter custo próximo ao meio de cultura BG11.

Observou-se que fertilizantes contendo macro e micronutrientes em suas formulações, apesar de ricos em composição, não possibilitam ajustar a concentração dos meios de cultura em função do meio de cultura controle. Esse fato, juntamente com elevadas concentrações de micronutrientes e o elevado custo em relação aos fertilizantes sólidos solúveis, restringem sua aplicação no cultivo de microalgas.

Para os futuros experimentos optou-se por cultivar as microalgas em condições similares às de fotobiorreatores, com aeração controlada e enriquecida com CO<sub>2</sub> a fim de se obter maiores rendimentos em biomassa, e também para serem realizadas as análises de conteúdos celulares.

### **3.3. DESENVOLVIMENTO DE MEIOS DE CULTURA A PARTIR DE FERTILIZANTES GRANULARES E LÍQUIDOS**

---

A partir do experimento preliminar (item 3.2), foram pesquisados novos fertilizantes para desenvolvimento de novos meios de cultura. Optou-se por utilizar fertilizantes granulados, solúveis e não solúveis, de forma a reduzir ainda mais os custos dos meios de cultura. Foi utilizado um fertilizante líquido como fonte de Fe, uma vez que não foram encontradas outras opções no comércio local. Os novos fertilizantes possibilitaram também maiores opções para formulação dos novos meios de cultura.

Os fertilizantes foram obtidos no município de Viçosa, MG e regiões próximas para o desenvolvimento de meios de cultura similares ao BG11. Também foram obtidos fertilizantes juntamente ao Departamento de Solos da UFV. Foram selecionados 7 fertilizantes para suprirem todos os macronutrientes do meio de cultura controle. Os fertilizantes foram: sulfato de amônio (Fertilizantes Heringer, Brasil), superfosfato simples (Adubos Marisa, Brasil), cloreto de potássio (Fertilizantes Heringer, Brasil), monofosfato de amônio purificado (Fertilizantes Heringer, Brasil), nitrato de cálcio (Fertilizantes Heringer, Brasil), sulfato de magnésio (Multitécnica Nutrientes Minerais, Brasil), solução de ferro quelado (Ubyfol Agroquímica, Brasil).

As composições dos fertilizantes estão apresentadas em Anexo (Tabela A3). Com base na composição e concentração dos fertilizantes comerciais foram desenvolvidos 5 meios de cultura a base de fertilizantes (B1, B2, B3, B4 e B5). Utilizou-se como base a porção mínima solúvel em água dos nutrientes informada pelos fabricantes. Os meios alternativos foram complementados com solução de micronutrientes (A<sub>5</sub>) do meio BG11, feita a partir de sais inorgânicos de pureza analítica (Tabela 5).

Os custos dos meios de cultura a base de fertilizantes apresentaram em geral, uma redução de 98 % em relação ao BG11. A Tabela 6 contém os custos finais dos meios de cultura a base de fertilizantes juntamente com a suplementação com a solução A<sub>5</sub> do meio BG11.

Os meios de cultura B1, B3 e B5 foram formulados para se assemelharem ao BG11. Contudo, alguns fertilizantes possuem mais de um

elemento em sua composição segundo informações dos fabricantes. O superfosfato simples, por exemplo, é rico em P e Ca, assim como o monofosfato de amônio possui N e P em sua composição. Logo, alguns meios de cultura propostos no presente trabalho possuem uma concentração maior de alguns elementos (Tabela 7).

**Tabela 5** – Composição dos meios de cultura a base de fertilizantes agrícolas (g L<sup>-1</sup>).

Composto	Meio de cultura (g L <sup>-1</sup> )				
	B1	B2	B3	B4	B5
Sulfato de amônio	1,2375	0,4125			
Monofosfato de amônio			2,0625	0,6875	
Superfosfato simples	0,1357	0,2500			0,1357
Cloreto de potássio	0,0298	0,1739	0,0298	0,1739	0,0298
Nitrato de cálcio			0,0517	0,0517	1,6500
Sulfato de magnésio			0,0822		
Solução de ferro quelado			0,2669 <sup>a</sup>		
<b>A<sub>5</sub></b>					
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>			0,0029		
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O			0,0018		
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O			0,00022		
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O			0,000079		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O			0,00039		
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O			0,000049		
<b>Massa total</b>	<b>1,4933</b>	<b>0,9267</b>	<b>2,2342</b>	<b>1,0033</b>	<b>1,9058</b>

<sup>a</sup>Quantidade adicionada em volume da solução de ferro quelado.

**Tabela 6** – Custo da produção de 1 litro de meio de cultura alternativo.

Meio de cultura	Custo (R\$)	Suplementação com micronutrientes do BG 11 (R\$)	Custo final (R\$)	Economia em relação ao BG11 (%)
B1	0,0021		0,0046	98,87
B2	0,0016		0,0042	98,98
B3	0,0053	0,0025	0,0078	98,08
B4	0,0026		0,0052	98,74
B5	0,0045		0,0071	98,27

**Tabela 7** – Características dos meios de cultura utilizados

Meio de cultura	Características em relação ao meio de cultura controle	Concentração dos elementos em relação ao meio controle			
		Elemento 1	Elemento 2	Elemento 3	Elemento 4
B1	Rico em Ca	Ca – 2 × maior			
B2	Deficiente em N Rico em P, K e Ca	N – 3 × menor	P – 2 × maior	K – 6 × maior	Ca – 4 × maior
B3	Rico em P	P – 65 × maior			
B4	Deficiente em N Rico em P e K	N – 3 × menor	P – 22 × maior	K – 6 × maior	
B5	Rico em Ca	Ca – 32 × maior			

Os meios de cultura B2 e B4 são variações dos meios de cultura B1 e B3, respectivamente. Os meios de cultura B2 e B4 tiveram a concentração de N, reduzida para 1/3 da concentração do meio de cultura controle. O meio de cultura BG11 possui uma concentração de N elevada quando comparado a outros meios de cultura avaliados no presente trabalho. Cabe ressaltar que meios de cultura deficientes em N podem estimular o acúmulo de lipídeos por microalgas (Hu *et al.*, 2008).

O meio de cultura BG11 apresenta baixo teor de K. Os meios de cultura obtidos na literatura possuem  $\text{KNO}_3$  em sua composição (e.g. MC, MBM e MDM), e uma vez que o N é utilizado em grandes proporções, o K é também adicionado em grandes quantidades. O meio de cultura BG11 leva  $\text{NaNO}_3$  como fonte de N. O K geralmente é adicionado a partir de sais inorgânicos que são fonte de N e P.

Com base nestas informações decidiu-se aumentar a concentração de K para os meios de cultura B2 e B4 em 6 vezes em relação ao meio de cultura BG11, ficando próxima às concentrações dos meios de cultura BBM e MBM. MDM e MC apresentam concentrações de K muito elevadas, acima de  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ , provavelmente em função de uma maior suplementação de N e P.

Como o meio de cultura BG11 também possui baixa concentração de P optou-se por dobrar sua concentração para o meio de cultura B2. Tais medidas não foram necessárias para os meios de cultura B3 e B4, pois possuíam o monofosfato de amônio como fonte de N, e este também possui elevada concentração de P.

Os meios de cultura B1 e B2 possuem uma concentração maior de Ca, uma vez que o superfosfato simples utilizado na suplementação de P também

possui Ca em sua composição. O Ca é encontrado em grande concentração em B5, uma vez que a fonte de N utilizada foi o fertilizante nitrato de cálcio.

Dentre os meios de cultura elaborados, B1 apresenta composição mais próxima ao meio de cultura BG11, tendo apenas o dobro da concentração de Ca. Optou-se por trabalhar com variações diretas de N, P e K por serem os elementos com maior variedade de fertilizantes dentre os encontrados. As alterações de composição dos meios de cultura afetaram pouco seus custos. As variações propositais de composição foram realizadas apenas nos meios de cultura B2 e B4. As diferentes concentrações dos demais meios de cultura em relação ao meio de cultura BG11 ocorreram em função das composições dos fertilizantes utilizados.

Além dos efeitos de nutrição, o objetivo de se usar diferentes concentrações e tipos de fertilizantes deu-se pela necessidade de observar a ocorrência de inibição do crescimento das microalgas estudadas em relação ao meio de cultura BG11.

O meio de cultura B5 foi elaborado depois do primeiro experimento (Experimento I, item 3.4) realizado no cultivo de *Chlorella* sp. BR001, para verificar o efeito de diferentes fontes de N ( $\text{NH}_4^+$  e  $\text{NO}_3^-$ ) no Experimento II (Item 3.5) com *Scenedesmus* sp. BR003.

### **3.4. EXPERIMENTO I: EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA A BASE DE FERTILIZANTES GRANULARES E LÍQUIDOS NO CULTIVO DE *Chlorella* sp. BR001**

---

#### **3.4.1. OBJETIVO**

Para investigar os meios de cultura a fertilizantes granulares e líquidos, delineou-se um experimento para avaliar o crescimento de *Chlorella* sp. BR001. Os cultivos também foram utilizados para avaliar modelos de monitoramento de crescimento de microalga por densidade óptica.

Testou-se a seguinte hipótese: *Chlorella* sp. BR001 apresenta diferença estatística quanto à produção de biomassa, quando cultivada em meio de cultura controle e meios de cultura a base de fertilizantes.

#### **3.4.2. MATERIAIS & MÉTODOS**

##### **3.4.2.1. Obtenção de material biológico**

A cepa de *Chlorella* sp. BR001 foi obtida junto à Coleção de Cianobactérias e Microalgas – Projeto Petrobrás, do Laboratório de Ficologia do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

##### **3.4.2.2. Produção de inóculos**

A produção de inóculos foi realizada em sala de cultivo do Laboratório de Ficologia do Departamento de Biologia Vegetal da UFV. A cepa *Chlorella* sp. BR001 foi inoculada em Erlenmeyers de 50 mL utilizando o meio de cultura BG11, pH  $7,4 \pm 0,1$ , em condições fotoautotróficas de crescimento: temperatura de  $25 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 16:8 h (luz:escuro), irradiância média na altura da bancada de  $60 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , proveniente de duas lâmpadas fluorescentes de 40 W. Quando o inóculo alcançava concentração entre  $10^6$ - $10^7$  céls mL<sup>-1</sup>, era transferido para Erlenmeyer de maior volume, e o volume completado com meio de cultura fresco até a obtenção de 2 litros de cultura. Depois a cultura foi transferida para garrafão (*carboy*) de 9 litros, sendo adicionado meio de cultura fresco até a obtenção de 8 litros de cultura com concentração celular de  $10^7$  céls mL<sup>-1</sup>. A partir de 1 litro de cultura, para melhor homogeneização, o cultivo passou

a receber aeração constante a partir de bomba de diafragma. As vidrarias utilizadas para a produção de inóculo e o meio de cultura foram esterilizados conforme item 3.2.2.3.

#### **3.4.2.3. Delineamento experimental**

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado onde se avaliou o cultivo de *Chlorella* sp. BR001 em 5 meios de cultura diferentes. Os meios de cultura foram BG11 (controle), B1, B2, B3 e B4 com 3 repetições. O delineamento resultou em 15 unidades experimentais.

#### **3.4.2.4. Condições de cultivo**

O cultivo monoespecífico foi realizado em condições fotoautotróficas de crescimento: fotoperíodo de 12:12 h (luz:escuro) para simular uma condição de cultivo *outdoor*, irradiância média na altura da bancada de  $89 \mu\text{mols m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proveniente de 8 lâmpadas fluorescentes de 40 W.

Os cultivos foram realizados em Erlenmeyers de 2000 mL, contendo 1425 mL de meio de cultura e 475 mL de inóculo (25 % v v<sup>-1</sup> de inóculo). A concentração celular do inóculo foi de  $1,32 \times 10^7$  céls mL<sup>-1</sup>. Após as diluições do inóculo nos meios de cultura, as concentrações celulares reduziram, em média, para  $3,52 \times 10^6$  céls mL<sup>-1</sup>. Os pHs dos meios de cultura foram ajustados uma vez ao dia em  $6,5-7,0 \pm 0,1$  com soluções 1 M de NaOH ou HCl após a inoculação.

A temperatura da sala de cultivo não foi controlada, mas foi monitorada diariamente. Durante cultivo, obteve-se em média 20 °C para a temperatura mínima e 25 °C para a temperatura máxima.

As vidrarias e os meios de cultura foram esterilizados conforme item 3.2.2.3. Os fertilizantes comerciais utilizados como fonte primária de N foram adicionados após a esterilização. Isto se deve a possibilidade da fonte de N dos fertilizantes comerciais ser amônia, que volatiliza durante esterilização em autoclave (Harrison & Berges, 2005).

Os cultivos foram homogeneizados por injeção de ar atmosférico fornecido por compressor de 2 *horsepower* (HP). A vazão foi ajustada à 0,2 vvm (volume de ar por volume de cultura por minuto) medida por termo-anemômetro

(modelo TAD-500, Instrutherm Instrumentos de Medição). O ar foi enriquecido com 5 % de CO<sub>2</sub> cuja vazão foi medida diretamente pelo escoamento empistonado (Saliba, 2005) em um tubo transparente com diâmetro interno de 7,7 mm. Utilizou-se este método uma vez que a vazão de CO<sub>2</sub> foi menor do que o limite de sensibilidade do termo-anemômetro.

A vazão foi ajustada por válvula do tipo agulha, em função da velocidade média aferida pelo termo-anemômetro (ar) e pelo método do escoamento empistonado (CO<sub>2</sub>), considerando o diâmetro da mangueira (7,7 mm), ligada ao compressor e cilindro de CO<sub>2</sub>, respectivamente. A velocidade do ar foi calculada conforme equações a seguir:

$$V = \frac{4Q}{\pi D^2} \quad (1)$$

em que:

V = velocidade do ar ou CO<sub>2</sub> (m s<sup>-1</sup>)

Q = vazão de ar ou CO<sub>2</sub> (L min<sup>-1</sup>)

D = diâmetro do tubo transparente

Considerando uma taxa de inserção de ar de 0,2 vvm, a vazão de mistura ar e CO<sub>2</sub> requerida pode ser calculada como:

$$Q = 0,2V_t \quad (2)$$

em que:

V<sub>t</sub> = volume total de cultura (L)

O cultivo foi monitorado por curva de crescimento e teve duração de 16 dias. Ao término do experimento amostras frescas foram coletadas para quantificação de massa seca e concentração celular final.

### 3.4.2.5. Curvas de crescimento

Amostras para a realização de curvas de crescimento foram coletadas a cada 2 dias para contagem de células. As curvas de crescimento foram obtidas a partir da contagem de células em câmara de Neubauer utilizando-se microscópio de luz (modelo CX40 RF 100, Olympus Corporation) configurado com a objetiva de 20 vezes de magnificação. Foram coletadas duas amostras por tratamento, sendo fixadas e diluídas em formalina neutra tamponada 10 % (v v<sup>-1</sup>), tampão fosfato de potássio 0,05 M, pH 6,8. As amostras foram acondicionadas no escuro e em temperatura ambiente após a fixação.

Também foram coletadas amostras para validação dos modelos de crescimento por densidade óptica. Amostras foram coletadas e lidas no comprimento de onda de 750 nm (modelo UVmini-1240, Shimadzu Corporation) (Griffiths *et al.*, 2011a). As amostras foram diluídas com água deionizada para manter a absorbância ente 0,1-0,9. Todos os procedimentos foram feitos em duplicata.

Para melhor interpretação das curvas de crescimento calculou-se a taxa instantânea de crescimento de todo o cultivo ( $r$ ) e da fase *log* de crescimento ( $r_{\log}$ ) (Equação 3) (Wood *et al.*, 2005), determinados pela equações a seguir:

$$r \text{ ou } r_{\log} = \frac{\ln(N_t/N_0)}{\Delta t} \quad (3)$$

em que:

$N_0$  = número de células no início do intervalo de tempo

$N_t$  = número de células no final do intervalo de tempo

$\Delta t$  = intervalo de tempo entre  $N_0$  e  $N_t$

$\ln$  = logaritmo neperiano

### 3.4.2.6. Determinação de massa seca

Ao final do experimento os cultivos algais foram centrifugados a 8000 rpm por 10 minutos a 25 °C até toda a biomassa ser concentrada. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram lavados com água deionizada, as amostras foram

novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. O processo de lavagem foi repetido mais uma vez (Zhu & Lee, 1999). Os *pellets* foram transferidos para vasilhame plástico de massa conhecida, sendo então rapidamente congelados com nitrogênio líquido e liofilizados.

#### **3.4.2.7. Monitoramento dos cultivos por densidade óptica**

O monitoramento do crescimento de microalgas pode ser realizado indiretamente, correlacionando a absorbância com a densidade de células ou massa seca (Griffiths *et al.*, 2011a). Cultivou-se, previamente, *Chlorella* sp. BR001 nas mesmas condições do item 3.4.2.4. Amostras foram coletadas durante a fase *log* de crescimento (dias 5 e 6 de cultivo), diluídas em série com meio de cultura fresco, sendo contadas conforme item 3.4.2.5 e lidas no comprimento de onda de 750 nm em espectrofotômetro (modelo UVmini-1240, Shimadzu Corporation) (Griffiths *et al.*, 2011a). As amostras foram diluídas utilizando com água deionizada como solvente para manter a absorbância entre 0,1-0,9. Todos os procedimentos foram feitos em duplicata. Os modelos de regressões lineares foram obtidos correlacionando a absorbância com a concentração celular.

#### **3.4.2.8. Análises estatísticas**

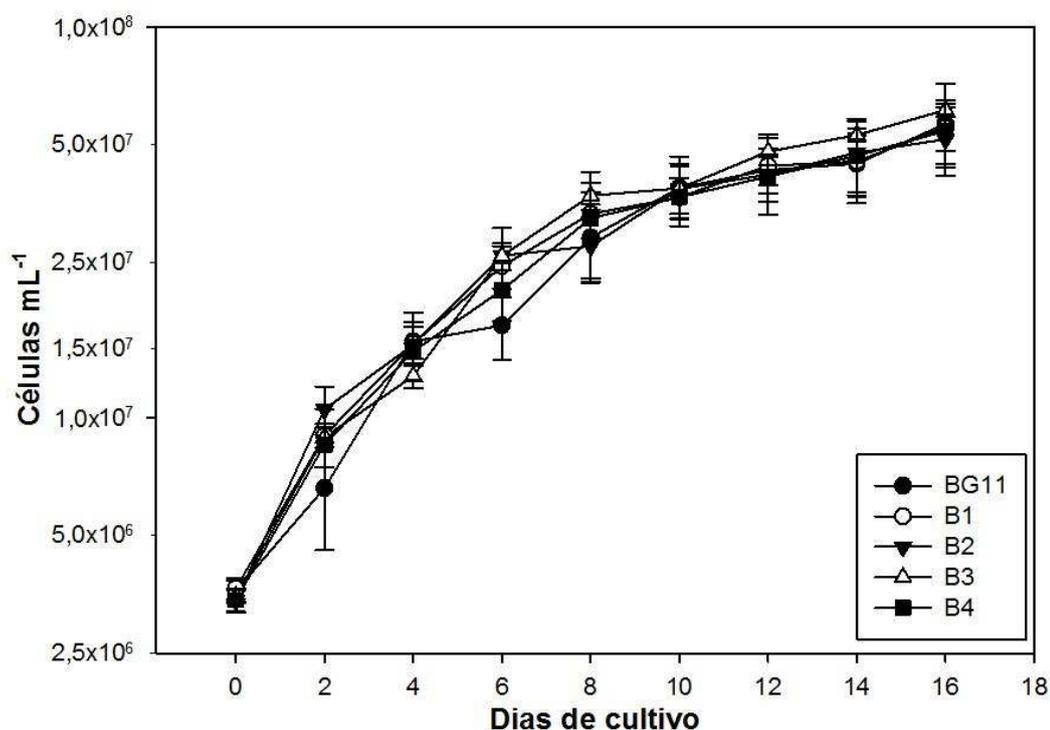
Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. A ANOVA e o teste de Tukey foram executados no *software* SAS (versão 9.2, SAS Institute). Para a confecção dos gráficos e obtenção dos modelos de regressão linear foi utilizado o *software* SigmaPlot (versão 11.0, Systat Software).

### **3.4.3. RESULTADOS**

#### **3.4.3.1. Efeitos de diferentes meios de cultura no crescimento de *Chlorella* sp. BR001**

A cepa *Chlorella* sp. BR001 apresentou crescimento similar dentre os meios de cultura avaliados (Figura 3). As medidas de crescimento também apontaram um comportamento similar de *Chlorella* sp. BR001 nos diferentes meios de cultura (Tabela 8). No 10º dia de cultivo a microalga em meio de

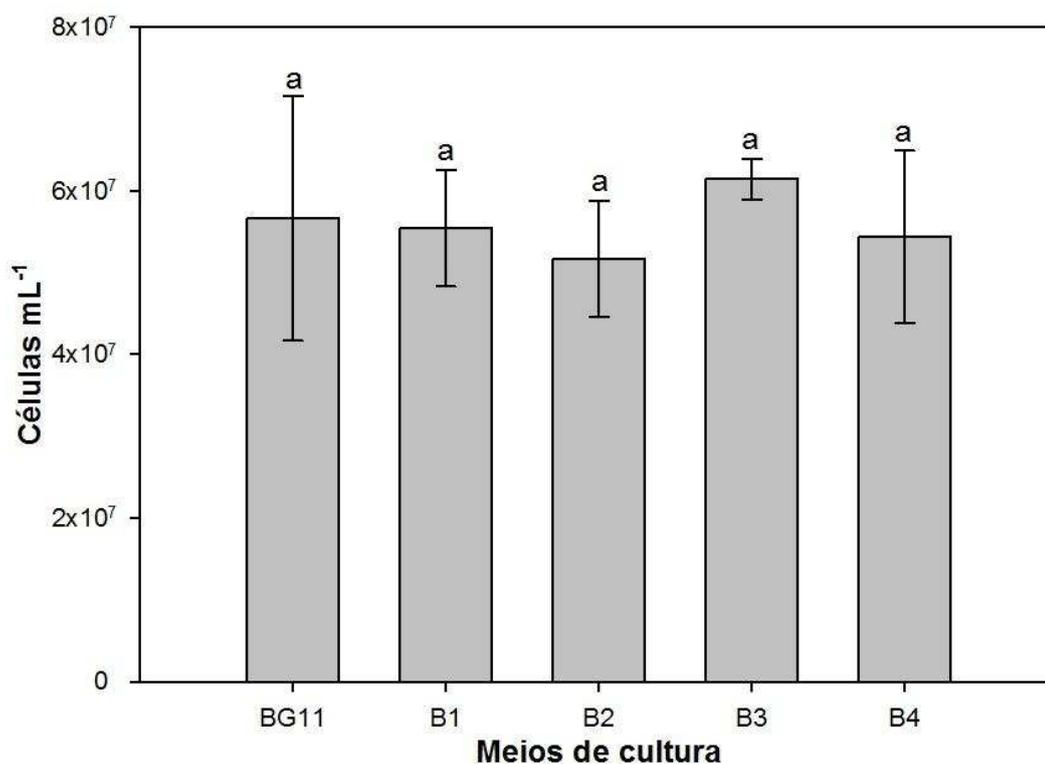
cultura BG11 entrou em fase estacionária. Optou-se por cessar o cultivo no 16º dia em função da baixa taxa de crescimento observada em todos os meios de cultura. *Chlorella* sp. BR001 entrou em fase estacionária entre os dias 8 e 10 de cultivo para os demais meios de cultura. O crescimento similar de *Chlorella* sp. BR001 entre os meios de cultura estudados resultaram em concentrações celulares finais estatisticamente iguais (Figura 4). Em média, a concentração celular final foi de  $5,59 \times 10^7$  céls mL<sup>-1</sup>.



**Figura 3** – Curvas de crescimento de *Chlorella* sp. BR001 cultivada em diferentes meios de cultura.

**Tabela 8** – Medidas de crescimento de *Chlorella* sp. BR001 cultivada em diferentes meios de cultura. Médias numa mesma linha contendo diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

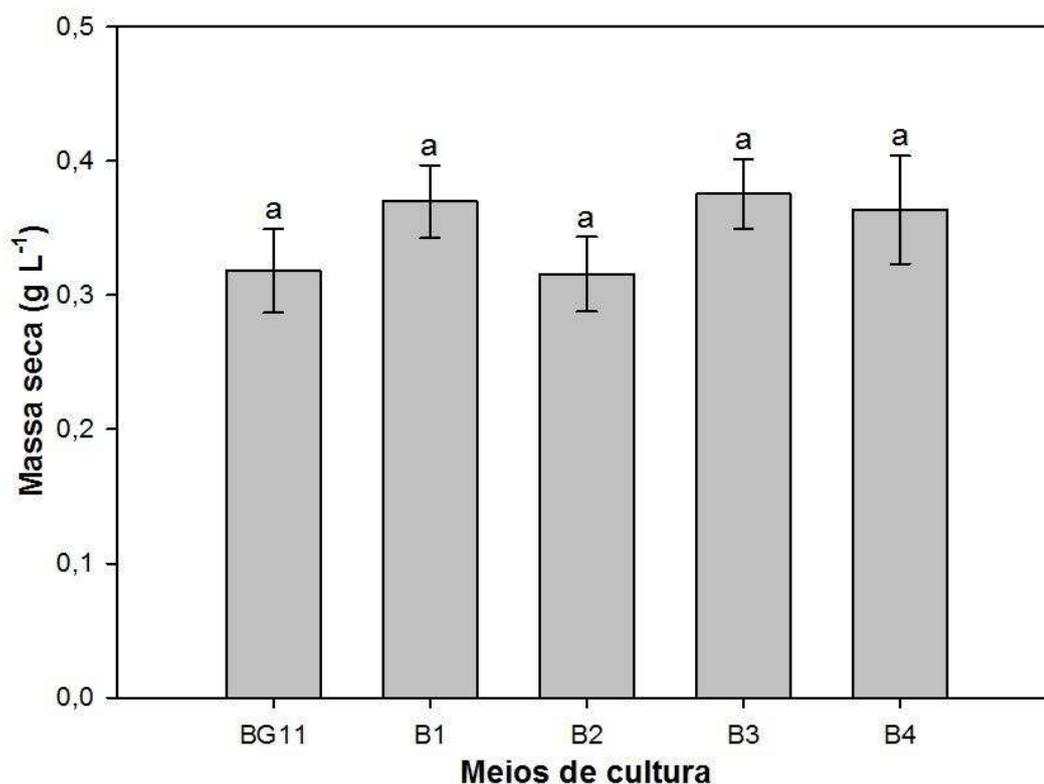
Parâmetro (dia <sup>-1</sup> )	Meios de cultura				
	BG11	B1	B2	B3	B4
$r$	0,170±0,014 <sup>A</sup>	0,169±0,005 <sup>A</sup>	0,170±0,011 <sup>A</sup>	0,179±0,004 <sup>A</sup>	0,172±0,014 <sup>A</sup>
$r_{\log}$	0,236±0,018 <sup>A</sup>	0,230±0,017 <sup>A</sup>	0,242±0,017 <sup>A</sup>	0,240±0,011 <sup>A</sup>	0,237±0,014 <sup>A</sup>



**Figura 4** – Concentração celular de *Chlorella* sp. BR001 no 16º dia, cultivada em diferentes meios de cultura. Barras contendo diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

#### 3.4.3.2. Efeitos de diferentes meios de cultura sobre a massa seca de *Chlorella* sp. BR001

Os rendimentos em massa seca não diferiram significativamente entre os diferentes meios de cultura (Figura 5). Os meios de cultura apresentaram uma concentração em massa seca em média de 0,35 g L<sup>-1</sup>.



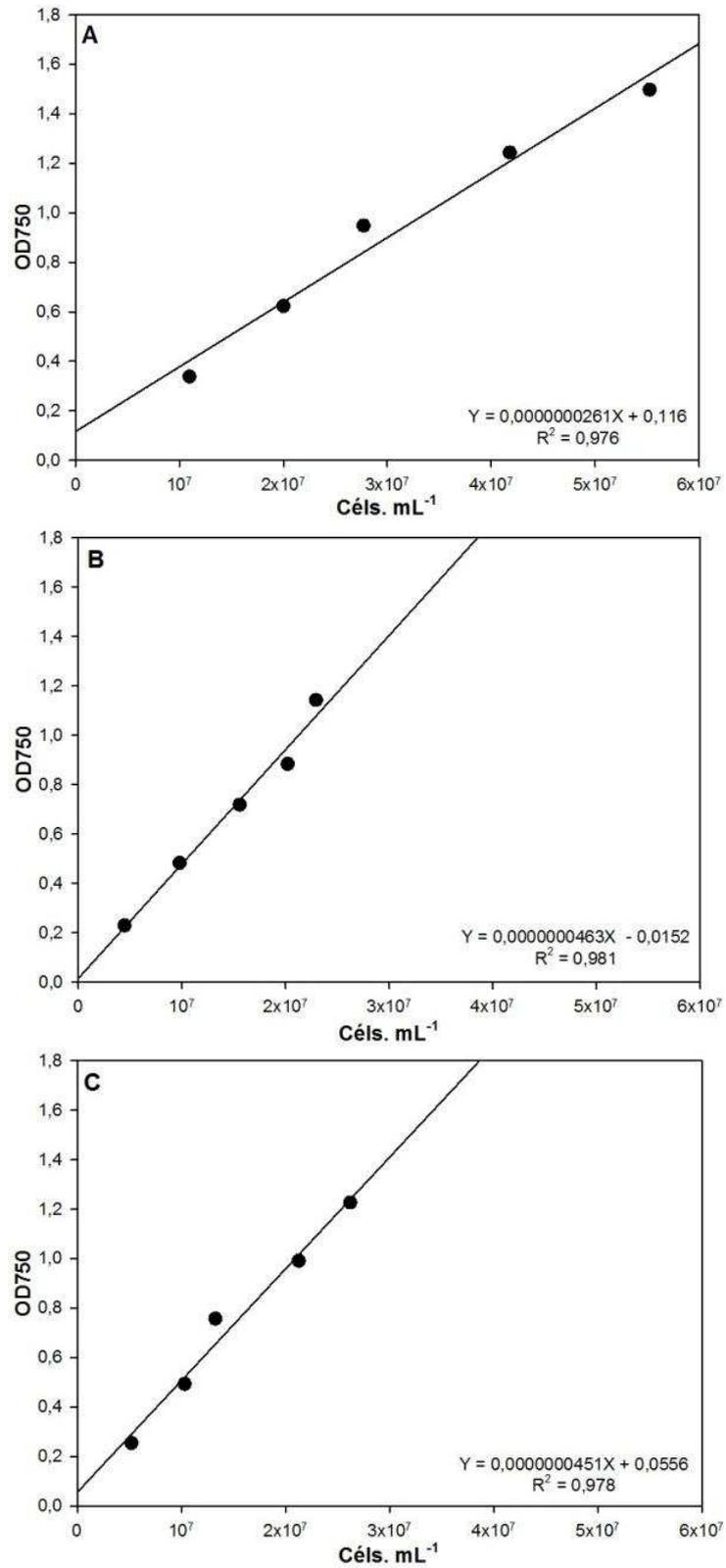
**Figura 5** – Massa seca de *Chlorella* sp. BR001 no 16º dia, cultivada em diferentes meios de cultura. Barras contendo diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

#### 3.4.3.3. Efeitos de diferentes meios de cultura no monitoramento indireto de cultivos de *Chlorella* sp. BR001

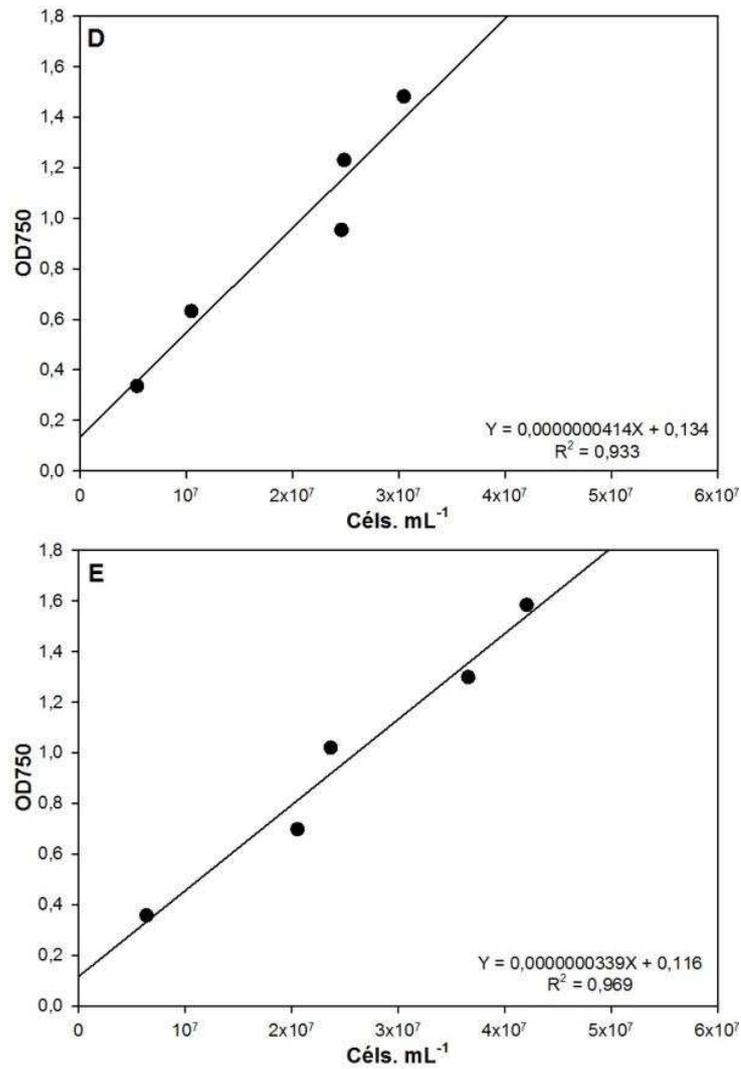
Os modelos obtidos correlacionando a concentração de células com a absorbância apresentaram coeficientes de determinação ( $R^2$ ) acima de 0,95 para todos meios de cultura, excetuando o meio de cultura B3 (Figuras 6 e 7).

Comparando as curvas de crescimento obtidas a partir da contagem de células e as curvas preditas pelos modelos de regressão linear, observou-se que os modelos tiveram diferentes respostas em função dos meios de cultura e da fase de crescimento de *Chlorella* sp. BR001 (Figuras 8 e 9).

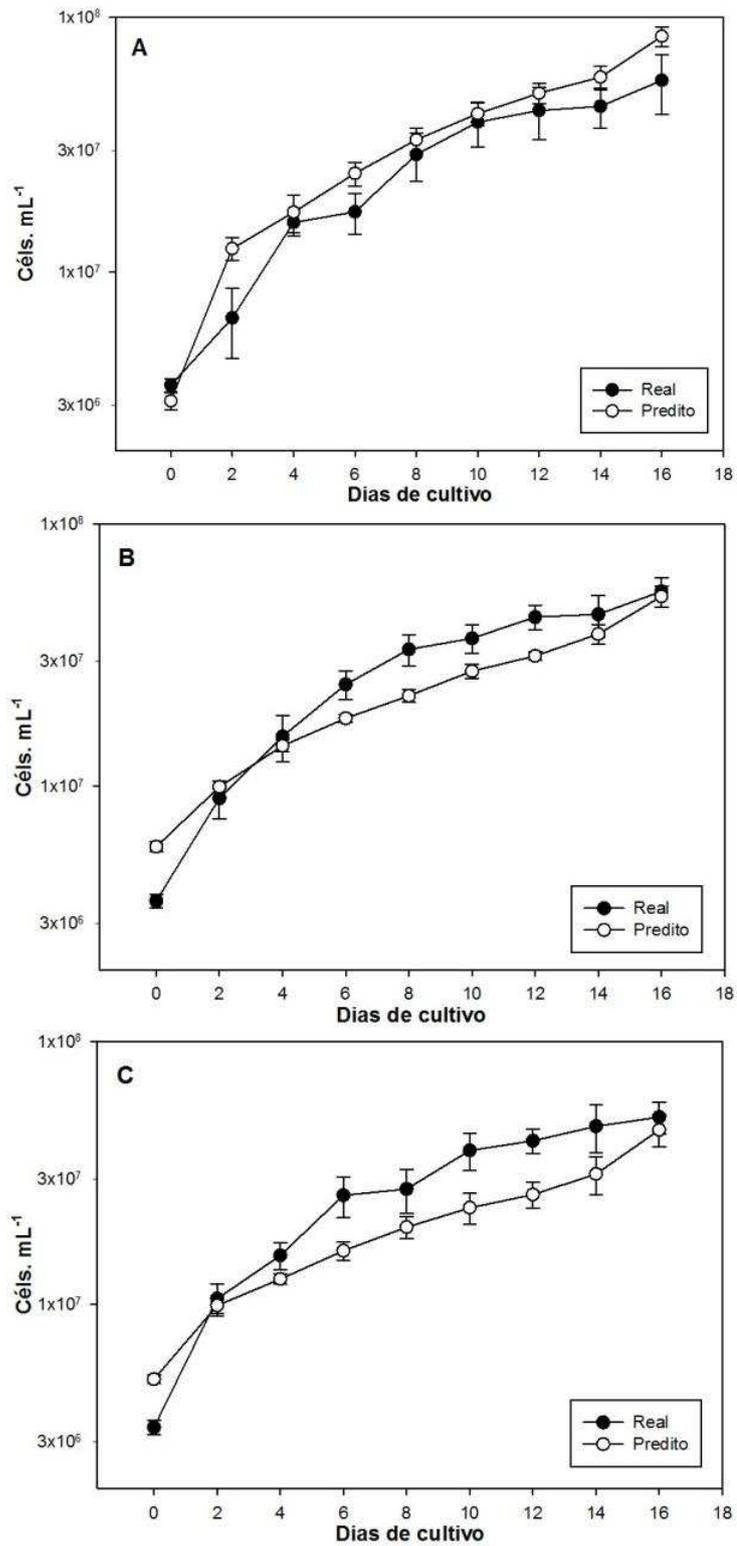
Em geral os modelos subestimaram ou superestimaram a concentração celular. Diferenças entre as médias finais das estimativas reais e preditas em diferentes estádios de crescimento podem ser observadas na Tabela 9.



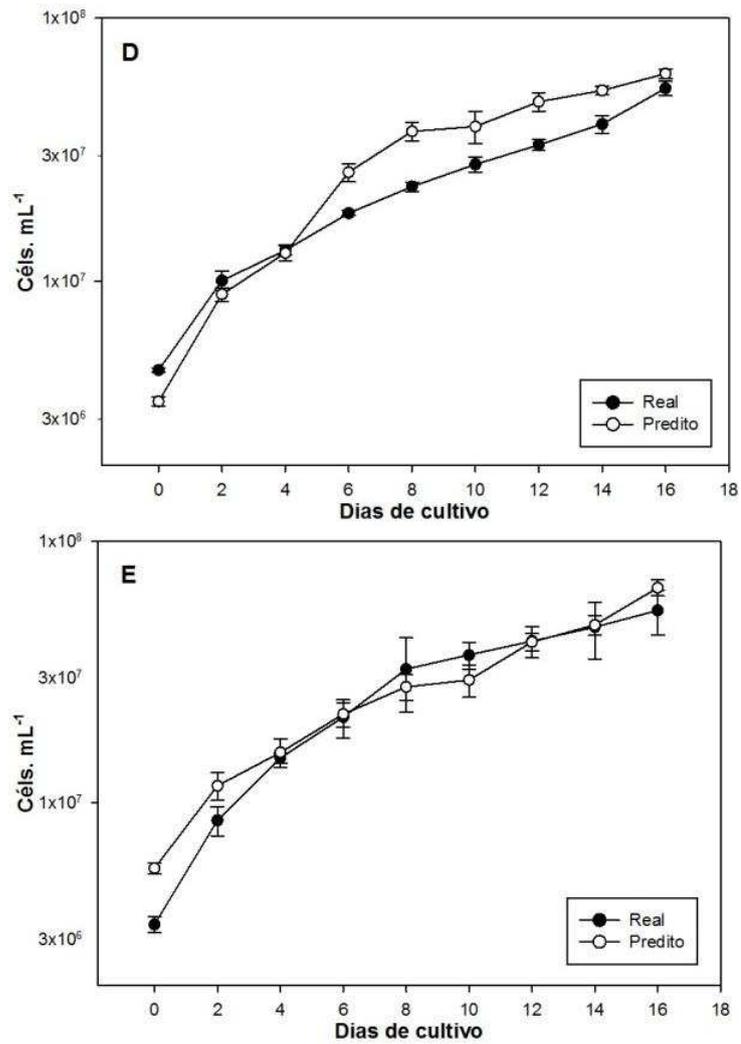
**Figura 6** – Modelos de regressão linear obtidos a partir da correlação de concentração celular e absorbância para *Chlorella* sp. BR001 cultivada em diferentes meios de cultura. Legenda: A – BG11, B – B1 e C – B2.



**Figura 7** – Modelos de regressão linear obtidos a partir da correlação de concentração celular e absorbância para *Chlorella* sp. BR001 cultivada em diferentes meios de cultura. Legenda: D – B3 e E – B4.



**Figura 8** – Curvas de crescimento de *Chlorella* sp. BR001 cultivada em diferentes meios de cultura. As curvas foram obtidas a partir de contagem de células e empregando os modelos que correlacionam a concentração celular e a densidade óptica a 750 nm. Legenda: A – BG11, B – B1 e C – B2.



**Figura 9** – Curvas de crescimento de *Chlorella* sp. BR001 cultivada em diferentes meios de cultura. As curvas foram obtidas a partir de contagem de células e empregando os modelos que correlacionam a concentração celular e a densidade óptica a 750 nm. Legenda: D – B3 e E – B4.

**Tabela 9** – Diferenças entre a concentração celular obtida por contagem de células (real) e modelos (predita) para *Chlorella* sp. BR001 cultivada em diferentes meios de cultura e fases de crescimento.

Meio de cultura	Concentração celular real (cél/s mL <sup>-1</sup> )	Concentração celular predita (cél/s mL <sup>-1</sup> )
BG11	$6,61 \times 10^6$	$1,24 \times 10^7$
B1	$9,01 \times 10^6$	$9,97 \times 10^6$
B2	$1,05 \times 10^7$	$9,92 \times 10^6$
B3	$8,93 \times 10^6$	$1,01 \times 10^7$
B4	$8,55 \times 10^6$	$1,16 \times 10^7$
BG11	$2,70 \times 10^7$	$3,31 \times 10^7$
B1	$3,07 \times 10^7$	$2,22 \times 10^7$
B2	$2,97 \times 10^7$	$1,97 \times 10^7$
B3	$3,79 \times 10^7$	$2,29 \times 10^7$
B4	$3,62 \times 10^7$	$2,77 \times 10^7$
BG11	$5,05 \times 10^7$	$8,43 \times 10^7$
B1	$5,36 \times 10^7$	$5,31 \times 10^7$
B2	$4,96 \times 10^7$	$4,62 \times 10^7$
B3	$6,01 \times 10^7$	$5,40 \times 10^7$
B4	$5,64 \times 10^7$	$6,64 \times 10^7$

### 3.4.4. DISCUSSÃO

A microalga *Chlorella* sp. BR001 teve um crescimento similar nos meios de cultura avaliados (Figura 3). Não foi observada fase de adaptação (*lag*) para nenhum dos meios de cultura, demonstrando que os meios de cultura a base de fertilizantes não apresentaram nenhum efeito negativo para o crescimento de *Chlorella* sp. BR001 no início do cultivo. Comportamento diferente foi observado por Scragg *et al.* (2002) que cultivaram *C. emersonii* nos meios de cultura MC e baixo teor de N, e obtiveram diferentes períodos de tempo para as fases de crescimento *lag*, *log*, estacionária e de senescência.

Os cultivos não tiveram o volume ajustado em função da evaporação de água ao longo do cultivo, parte-se do pressuposto que a evaporação foi homogênea, apresentando pouca ou nenhuma interferência nas análises de crescimento, desde que analisadas entre pequenos intervalos de tempo. Porém, pode-se assumir que houve uma superestimação da concentração de células final, quando comparada a concentração celular inicial. O volume final dos cultivos correspondia a cerca de 83 % dos cultivos iniciais.

Os resultados de concentração celular final (Figura 4) e massa seca (Figura 5) se complementam, contribuindo para a confirmação de que os meios de cultura a base de fertilizantes não apresentaram efeitos inibitórios para a microalga em relação ao meio de cultura controle.

A microalga apresentou uma produção de massa seca baixa para todos os meios de cultura avaliados. A média de massa seca ficou em  $0,35 \text{ g L}^{-1}$ . Illman *et al.* (2000) estudaram o crescimento de cinco espécies de *Chlorella* em dois meios de cultura diferentes, e apenas duas espécies em apenas um meio de cultura tiveram produção superior a  $0,5 \text{ g L}^{-1}$ . As concentrações celulares obtidas por esses autores também foi baixa, não atingindo  $10^7 \text{ céls mL}^{-1}$ . Concentrações celulares inferiores a  $10^7 \text{ céls mL}^{-1}$  também foram obtidas por Scragg *et al.* (2002). No presente trabalho a concentração final de células ficou em média  $5,59 \times 10^7 \text{ céls mL}^{-1}$ . Phukan *et al.* (2011) cultivaram *Chlorella* sp. MP-1 em 4 meios de cultura, e obtiveram resultados inferiores a  $1 \text{ g L}^{-1}$ .

Resultados diferentes foram reportados por Liu *et al.* (2011) que obteve uma produção máxima de  $1,9 \text{ g L}^{-1}$  de massa seca para *C. zofingiensis*. Valores acima de  $1 \text{ g L}^{-1}$  também foram obtidos por Feng *et al.* (2011) e Griffiths *et al.* (2011b). Gouveia & Oliveira (2009) chegaram a uma concentração média de  $1,5 \text{ g L}^{-1}$  e uma concentração máxima de  $3 \text{ g L}^{-1}$  para *C. vulgaris*.

Brennan & Owende (2010) apontam que a concentração de massa seca para cultivos em fotobiorreatores e tanques ficam entre de 1-2 g L<sup>-1</sup>. No presente trabalho foram obtidos resultados similares de massa seca para os diferentes meios de cultura, é provável que a cepa estudada não consumiu completamente os nutrientes em função de seu baixo crescimento. Isto impossibilitou que fossem observados os efeitos das diferentes concentrações dos meios de cultura a base de fertilizantes (Tabela 7) no crescimento de *Chlorella* sp. BR001. Rendimentos similares de massa seca para cultivos convencionais e a base de fertilizantes também foram obtidos por Raouf *et al.* (2006) e Ak (2011).

Outros resultados obtidos pelo grupo de pesquisa em condições diferentes de cultivo também resultaram em baixos rendimentos de biomassa (Machado, 2010; Lira, 2011, Vieira, 2011). Tais evidências levam a crer que a estirpe *Chlorella* sp. BR001, ainda que apresente crescimento em diferentes meios de cultura a base de fertilizantes, não seja uma opção interessante como fonte de triacilglicerídeos para biodiesel.

As curvas de crescimento são importantes em estudos de cultivos de microalgas. A partir das curvas de crescimento pode-se inferir sobre comportamento da microalga em relação ao cultivo ao longo do tempo. Contudo, o acompanhamento diário do crescimento de microalgas demanda de muito tempo se houverem muitas unidades experimentais. Já o acompanhamento do crescimento através de massa seca demanda de grande volume de cultivo. A contagem de células é um método simples, que demanda de pouco volume de cultivo, porém pode ser impraticável em função do delineamento experimental.

A determinação indireta do crescimento de microalgas é uma alternativa simples e prática. Segundo Griffiths *et al.* (2011a) deve-se escolher um comprimento de onda distante do espectro absorvido por pigmentos de microalgas, tais como 550 ou 770 nm, assim como a escolha da fase de crescimento da microalga para se construir a curva padrão. Se a curva padrão for obtida de um cultivo em crescimento inicial, onde as células apresentam elevada concentração de pigmentos, pode-se subestimar a produção de biomassa ao final do cultivo, onde as células possuem menor concentração de pigmentos.

Os modelos utilizados no presente trabalho não foram precisos para todos os meios de cultura avaliados (Figuras 8 e 9). Segundo Griffiths *et al.* (2011a), os modelos podem apresentar erros de estimação superiores a 70 %. Os meios de cultura BG11 e B4 apresentaram os modelos que mais se

assemelharam às concentrações celulares reais. Contudo os modelos não foram precisos para estimar a fase estacionária desses cultivos de *Chlorella* sp. BR001.

Os meios de cultura B1, B2 e B3 apresentaram correspondência na fase inicial e final do cultivo, mas entre estes pontos os valores preditos não ficaram próximos aos valores reais (Figuras 8 e 9). As curvas padrão foram feitas ao longo de cinco dias consecutivos de cultivo, ou seja, foram feitas a partir de um cultivo em fase *log* inicial. Curvas padrão que englobam todos os estádios de cultivo são mais precisas, podendo ser realizadas em intervalos de 3-4 dias (Griffiths *et al.*, 2011a). As diferenças obtidas para os meios de cultura também podem ter sido acometidas pelos fertilizantes utilizados nos meios de cultura, que não são completamente solúveis e apresenta partículas em suspensão.

O uso de densidade óptica se mostrou mais prático do que contagem de células para o monitoramento de crescimento da microalga, mas cuidados devem ser tomados para a construção das curvas padrão. As partículas em suspensão dos fertilizantes parecem afetar as estimativas de concentração celular, aumentando o erro do método, o que restringe seu uso no monitoramento de cultivos com meios de cultura a base de fertilizantes. As partículas em suspensão provavelmente absorvem e desviam parte do comprimento de onda utilizado, aumentando a imprecisão da curva padrão.

### **3.4.5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES PARA EXPERIMENTOS FUTUROS**

Observou-se que os meios de cultura se apresentaram como potenciais para o cultivo de microalgas, mas o baixo rendimento em massa seca de *Chlorella* sp. BR001 impediu que fossem observadas diferenças de crescimento em função das diferentes composições dos meios de cultura a base de fertilizantes. Existem relatos na literatura de outras cepas de *Chlorella* com baixo rendimento em massa seca em diferentes condições de cultivo. Outros experimentos realizados pelo grupo de pesquisa apresentaram valores de massa seca próximos ao obtido, levando a crer que a cepa *Chlorella* sp BR001 possua baixo rendimento em massa seca. Logo concluiu-se que a cepa não possui potencial para uso como fonte de lipídeos para a síntese de biodiesel, motivo pelo qual não foram realizadas as análises de conteúdos celulares.

Os usos de modelos para monitoramento do crescimento de microalgas apresentaram-se ineficientes, em especial para os meios de cultura a base de fertilizantes onde a quantidade de partículas em suspensão é maior. Contudo, foram mais práticos do que a contagem de células, sendo uma alternativa interessante para o monitoramento de cultivos em que existam apenas sais inorgânicos solúveis. Deve-se tomar cuidado na construção das curvas padrão, que devem englobar todos os estádios de crescimento.

## **3.5. EXPERIMENTO II: EFEITO DE DIFERENTES MEIOS DE CULTURA A BASE DE FERTILIZANTES GRANULARES E LÍQUIDOS NO CULTIVO DE *Scenedesmus* sp. BR003**

---

### **3.5.1. OBJETIVO**

Diante dos resultados obtidos no experimento I, optou-se por substituir a cepa de microalga tomando por base relatos da literatura. Foi utilizada a cepa *Scenedesmus* sp. BR003 para investigar o efeito dos meios de cultura a base de fertilizantes. Adicionou-se mais um meio de cultura ao delineamento experimental, totalizando 6 meios de cultura para o experimento.

A seguinte hipótese foi testada: *Scenedesmus* sp. BR003 apresenta diferença estatística quanto à produção de biomassa, quando cultivado em meio de cultura controle e meios de cultura a base de fertilizantes.

### **3.5.2. MATERIAIS & MÉTODOS**

#### **3.5.2.1. Obtenção de material biológico**

A cepa de *Scenedesmus* sp. BR003 foi obtida junto à Coleção de Cianobactérias e Microalgas – Projeto Petrobrás, do Laboratório de Ficologia do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

#### **3.5.2.2. Produção de inóculos**

A produção de inóculos foi realizada conforme item 3.4.2.2.

#### **3.5.2.3. Delineamento experimental**

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, onde se avaliou o cultivo de *Scenedesmus* sp. BR003 em 6 meios de cultura com 3 repetições. Os meios de cultura foram BG11 (controle), B1, B2, B3, B4 e B5. O delineamento resultou em 18 unidades experimentais.

#### 3.5.2.4. Condições de cultivo

Os cultivos monoespecíficos foram realizados em condições fotoautotróficas de crescimento: temperatura de  $30 \pm 2$  °C, fotoperíodo de 16:8 h (luz:escuro), irradiância média na altura da bancada de  $110 \mu\text{mols f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  proveniente de 4 lâmpadas fluorescentes brancas de 40 W. Os cultivos foram realizados em Erlenmeyers de 2000 mL, contendo 1520 mL de meio de cultura e 380 mL de inóculo (20 % v v<sup>-1</sup> de inóculo). As unidades experimentais foram homogeneizadas por injeção de ar atmosférico fornecido por compressor de 2 HP, a vazão foi ajustada à 0,2 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto) utilizando termo-anemômetro. O ar foi enriquecido com 5 % de CO<sub>2</sub>, tendo a concentração monitorada 3 vezes ao dia por analisador de CO<sub>2</sub> (modelo GFM 130, Gas Data). A vazão de ar foi ajustada conforme item 3.4.2.4.

As vidrarias e os meios de cultura foram esterilizados conforme item 3.2.2.3. Os fertilizantes comerciais utilizados como fonte primária de N foram adicionados após a esterilização. Isto se deve a possibilidade da fonte de N dos fertilizantes comerciais ser amônia, que volatiliza durante esterilização em autoclave (Harrison & Berges, 2005).

A concentração celular do inóculo de *Scenedesmus* sp. BR003 foi de  $2,17 \times 10^7$  céls mL<sup>-1</sup>. Após as diluições dos inóculos nos meios de cultura, as concentrações celulares reduziram, em média, para  $4,34 \times 10^6$  céls mL<sup>-1</sup>. Os pHs dos meios de cultura foram ajustados à  $7,5-8,0 \pm 0,1$  com soluções 1 M de NaOH ou HCl após a inoculação.

Os pHs dos cultivos foram ajustados uma vez por dia entre  $7,5-8,0 \pm 0,1$  com soluções 1 M de NaOH ou HCl. O volume da cultura foi ajustado diariamente com adição de água deionizada autoclavada conforme item 3.2.2.3. O cultivo teve duração de 16 dias. Ao término do experimento amostras frescas foram coletadas para quantificação de massa seca e pigmentos. Lâminas temporárias foram feitas, e imagens digitais foram obtidas em fotomicroscópio para medição celular e análise de padrão cenobial. Adicionalmente, parte dos cultivos foram congelados com nitrogênio líquido e armazenados em -20 °C para determinação de proteínas hidrossolúveis totais e carboidratos neutros totais. As determinações destes conteúdos celulares ocorreram na semana posterior à coleta (Lourenço, 2006).

Centrifugou-se 1 L dos cultivos a 11000 rpm por 10 minutos a 25 °C em

garrafas de 250 mL até toda a biomassa ser concentrada. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram lavados com água deionizada, as amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. O processo de lavagem foi repetido mais uma vez (Zhu & Lee, 1999). Os *pellets* foram transferidos para vasilhame plástico, sendo então rapidamente congelados com N líquido (-196 °C) e liofilizados. A biomassa foi armazenada em -20 °C para determinação de lipídeos totais.

#### **3.5.2.5. Curvas de crescimento**

As curvas de crescimento foram realizadas a partir da contagem de células conforme item 3.4.2.5. As amostras para a realização de curvas de crescimento foram coletadas nos dias 0 e 1 para observação de fase *lag*. Posteriormente as coletas foram realizadas a cada 3 dias.

#### **3.5.2.6. Determinação de massa seca**

Foram coletados 40 mL de cultura ao término do experimento, sendo centrifugados a 11000 rpm por 10 minutos a 25 °C em tubos do tipo Falcon de massa conhecida. O sobrenadante foi descartado e os *pellets* foram lavados com mesmo volume de água deionizada, as amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. O processo de lavagem foi repetido mais uma vez (Zhu & Lee, 1999). Os tubos foram secos em estufa à 75 °C por 24 horas e pesados para obtenção da massa seca.

#### **3.5.2.7. Extração e quantificação de pigmentos**

As quantificações de clorofila *a* e *b* e carotenóides totais foram realizadas no término do cultivo, segundo extração proposta por Griffiths *et al.* (2011a), sendo substituído o dimetilsulfóxido (DMSO) por metanol como solvente. O extrato metanólico foi lido nos comprimentos de onda de 665, 652 e 470 nm em leitora de microplacas (UVM 340, AsysHitech). O processo ocorreu ao abrigo da luz para evitar a oxidação dos pigmentos.

Foram utilizadas as equações propostas por Wellburn (1994), para cálculo da concentração de clorofila *a* ( $C_a$ ) (Equação 4), clorofila *b* ( $C_b$ ) (Equação

5) e carotenóides totais ( $C_t$ ) (Equação 6), sendo os resultados expressos em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

$$C_a = 16,72 \times A_{665} - 9,16 \times A_{652} \quad (4)$$

em que:

$A_{665}$  = valor da absorbância no comprimento de onda de 665 nm

$A_{652}$  = valor da absorbância no comprimento de onda de 652 nm

$$C_b = 34,09 \times A_{652} - 15,28 \times A_{665} \quad (5)$$

em que:

$A_{652}$  = valor da absorbância no comprimento de onda de 652 nm

$A_{665}$  = valor da absorbância no comprimento de onda de 665 nm

$$C_t = \frac{(1000 \times A_{470} - 1,63 \times C_a - 104,96 \times C_b)}{221} \quad (6)$$

em que:

$A_{470}$  = valor da absorbância no comprimento de onda de 470 nm

$C_a$  = concentração de clorofila *a* ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

$C_b$  = concentração de clorofila *b* ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

### 3.5.2.8. Extração e quantificação de proteínas hidrossolúveis totais

A extração de proteínas hidrossolúveis totais foi realizada conforme Meijer & Wijffels (1998). A quantificação foi realizada pelo método de Lowry adaptado por Lucarini & Kilikian (1999). Foram realizadas 3 repetições por unidade experimental. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 750 nm em leitora de microplacas (UVM 340, AsysHitech). Utilizou-se albumina do soro bovino como padrão. Os resultados foram expressos % de proteínas hidrossolúveis totais em massa seca.

### **3.5.2.9. Extração e quantificação de carboidratos neutros totais**

A quantificação de carboidratos neutros compreendeu duas etapas: a extração de carboidratos intracelulares proposto por Teoh *et al.* (2004), substituindo-se o HCl por H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Seguiu-se com a quantificação pelo método de Dubois adaptado por Masuko *et al.* (2005), utilizando-se glicose como padrão. Foi utilizado o comprimento de onda de 490 nm em leitora de microplacas (UVM 340, AsysHitech). Foram feitas 3 repetições por unidade experimental e os resultados foram expressos em % de carboidratos neutros totais em massa seca. Os carboidratos neutros correspondem aos oligossacarídeos, proteoglicanos, glicoproteínas e glicolipídeos (Masuko *et al.*, 2005).

### **3.5.2.10. Extração e quantificação de lipídeos totais**

Os lipídeos totais foram extraídos pelo método de Bligh & Dyer, utilizando metanol, clorofórmio e água na proporção de 2:2:0,8 (Smedes & Thomasen, 1996). Após a extração, as amostras foram centrifugadas à 3000 rpm por 15 minutos a 25 °C para separação de fases (Izard & Limberger, 2003). Para melhor visualização do sistema trifásico, adicionou-se mais um volume de água, resultando na proporção de 2:2:1,8 (metanol:clorofórmio:água) (Smedes & Thomasen, 1996), e as amostras foram novamente centrifugadas. A fase superior foi cuidadosamente retirada com auxílio de pipeta Pasteur e o extrato inferior (clorofórmio) foi utilizado para a quantificação de lipídeos totais pelo método sulfo-fosfo-vanilina, utilizando o comprimento de onda de 530 nm em leitora de microplacas (UVM 340, AsysHitech) (Izard & Limberger, 2003). Foram feitas 3 repetições por unidade experimental e os resultados foram expressos em % de lipídeos totais em massa seca. Foi utilizado óleo de milho comercial como padrão (Cheng *et al.*, 2011).

### **3.5.2.11. Medições celulares**

Foram fotografadas lâminas temporárias em microscópio invertido (modelo CKX41, Olympus Corporation) acoplado ao sistema de captura de imagem (modelo SC30, Olympus Corporation), utilizando-se a objetiva 40 vezes de magnificação. As imagens foram obtidas pelo software cell<sup>F</sup> (versão 5.1, Olympus Corporation). Foram medidas 30 células aleatórias por tratamento utilizando o *software* AxioVision (versão 4.8, Carl Zeiss Imaging Solutions). O

*software* foi calibrado utilizando-se fotomicrografias de régua micrométrica com escala de 0,01 mm, obtidas nas mesmas configurações do fotomicroscópio para aquisição de imagens das lâminas temporárias. Os comprimentos das células foram obtidos medindo a distância entre as duas extremidades das células. A largura foi mensurada na região mediana da célula.

As fotomicrografias também foram utilizadas para discutir o padrão colonial de *Scenedesmus* sp. BR003. Utilizou-se o *software* Adobe Photoshop CS4 (versão 11, Adobe Systems) para tratamento das fotomicrografias e o *software* CorelDRAW (versão 15, Corel Corporation) para montagem da prancha.

#### **3.5.2.12. Análises estatísticas**

Todos os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. A ANOVA e o teste de Tukey foram executados no *software* SAS (versão 9.2, SAS Institute). Para a confecção dos gráficos foi utilizado o *software* SigmaPlot (versão 11.0, Systat Software).

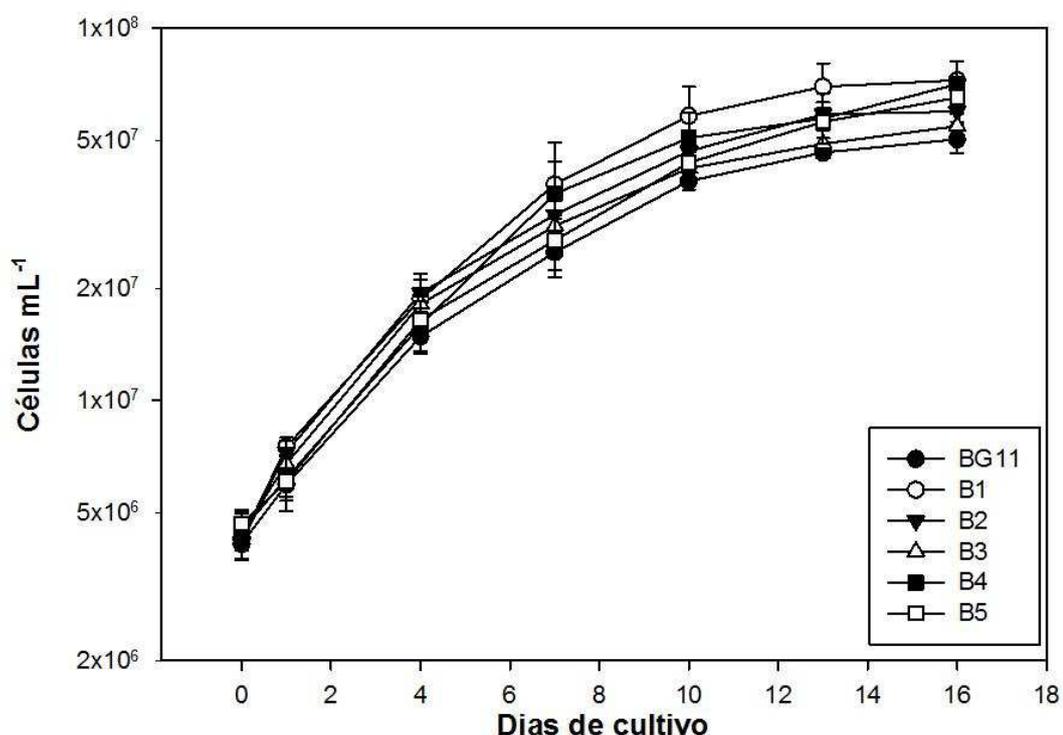
### **3.5.3. RESULTADOS**

#### **3.5.3.1. Efeitos de diferentes meios de cultura no crescimento de *Scenedesmus* sp. BR003**

A cepa *Scenedesmus* sp. BR003 não apresentou uma fase *lag* em nenhum dos meios de cultura (Figura 10). A microalga apresentou crescimento igual durante a fase *log* (Tabela 10). O cultivo foi finalizado no 16º dia com base no crescimento da microalga no meio de cultura controle. *Scenedesmus* sp. BR003 entrou em fase estacionária no 13º dia para todos os meios de cultura. Microalgas apresentam a tendência de acumularem lipídeos na fase estacionária (Hu *et al.*, 2008), motivo pelo qual o cultivo foi mantido até o 16º dia. Durante a fase estacionária as células reduzem seu gasto energético em sucessivas divisões e passam a sintetizar substâncias de reserva (e.g. lipídeos, carboidratos) (Willians & Laurens, 2010).

A cepa *Scenedesmus* sp. BR003 apresentou uma produção de células estatisticamente maior nos meios de cultura a base de fertilizantes em relação

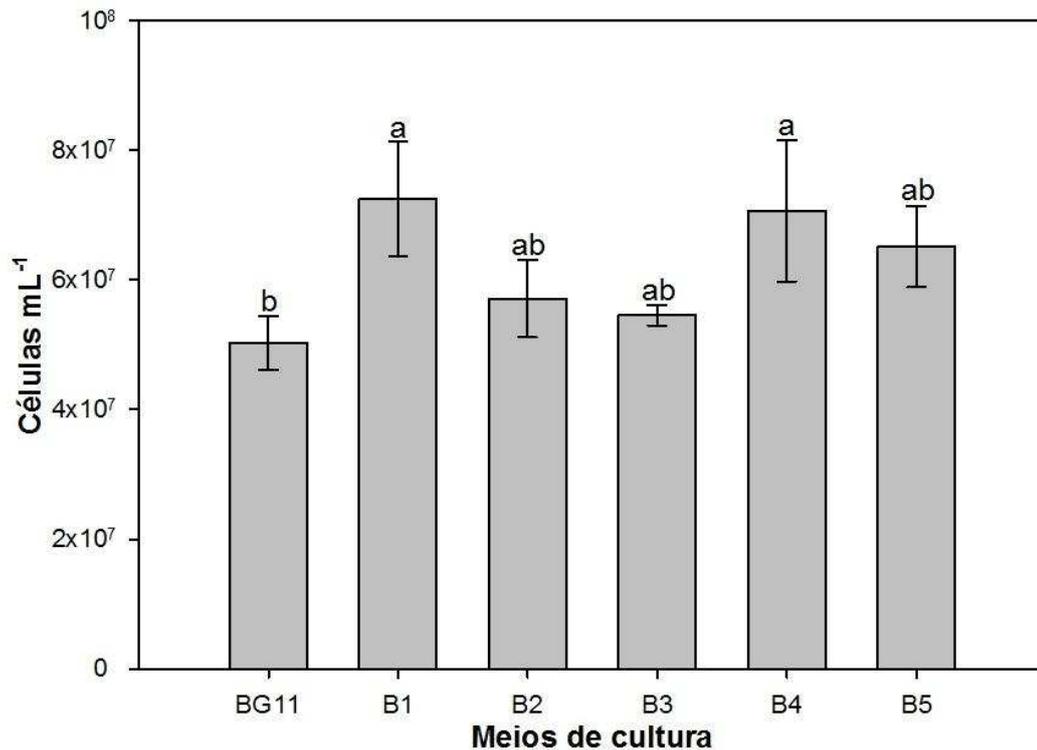
ao meio de cultura BG11 (Figura 11). *Scenedesmus* sp. BR003 apresentou maiores concentrações celulares nos meios de cultura B1 e B4 ao término do cultivo,  $7,25 \pm 0,89 \times 10^7$  céls mL<sup>-1</sup> e  $7,07 \pm 1,09 \times 10^7$  céls mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Nos meios de cultura B2, B3 e B5 a cepa *Scenedesmus* sp. BR003 apresentou rendimentos intermediários de células.



**Figura 10** – Curvas de crescimento de *Scenedesmus* sp. BR003 cultivado em diferentes meios de cultura.

**Tabela 10** – Medidas de crescimento de *Scenedesmus* sp, BR003 cultivado em diferentes meios de cultura. Médias numa mesma linha contendo diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

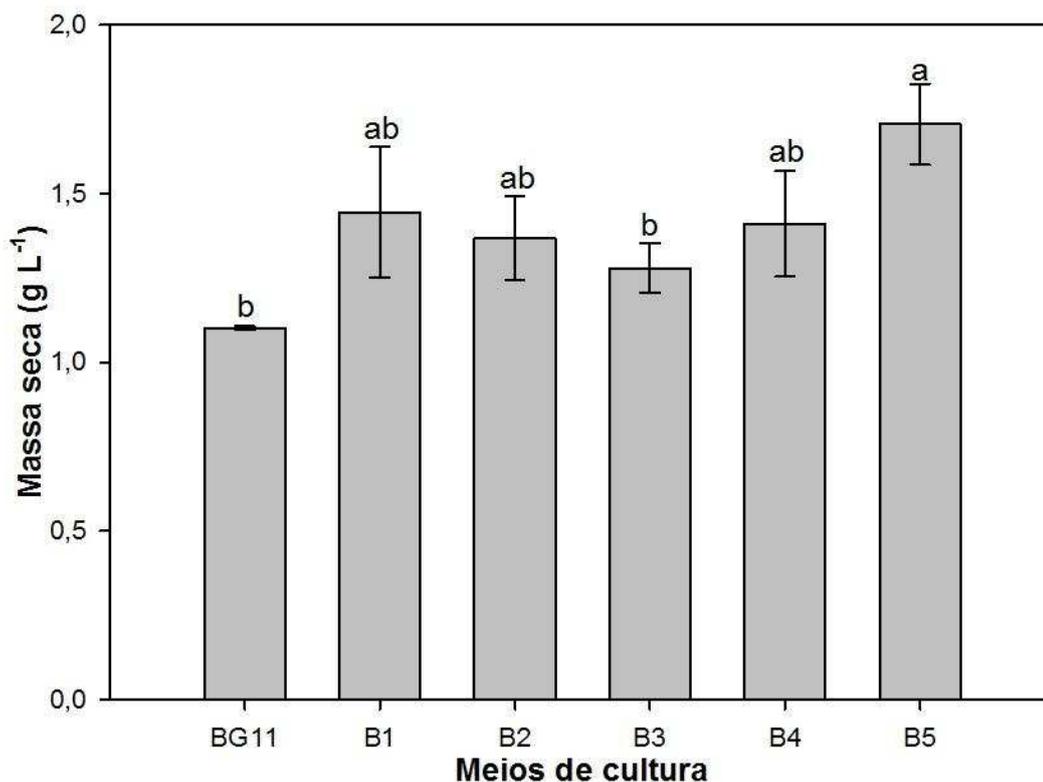
Parâmetro (dia <sup>-1</sup> )	Meios de cultura					
	BG11	B1	B2	B3	B4	B5
$r$	0,157±0,007 <sup>A</sup>	0,177±0,011 <sup>A</sup>	0,166±0,012 <sup>A</sup>	0,158±0,001 <sup>A</sup>	0,172±0,005 <sup>A</sup>	0,165±0,011 <sup>A</sup>
$r_{\log}$	0,225±0,013 <sup>A</sup>	0,261±0,023 <sup>A</sup>	0,242±0,012 <sup>A</sup>	0,226±0,021 <sup>A</sup>	0,242±0,017 <sup>A</sup>	0,223±0,015 <sup>A</sup>



**Figura 11** – Concentração celular de *Scenedesmus* sp. BR003 no 16º dia, cultivado em diferentes meios de cultura. Barras contendo diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

### 3.5.3.2. Efeitos de diferentes meios de cultura em massa seca de *Scenedesmus* sp. BR003

*Scenedesmus* sp. BR003 apresentou um maior rendimento em massa seca no meio de cultura B5 ( $1,71 \pm 0,12 \text{ g L}^{-1}$ ) dentre os meios testados. Rendimentos intermediários em massa seca de *Scenedesmus* sp. BR003 foram obtidos nos meios de cultura B1, B2 e B4. Os meios de cultura BG11 e B3 proporcionaram os menores rendimentos em massa seca da microalga, respectivamente,  $1,10 \pm 0,01 \text{ g L}^{-1}$  e  $1,27 \pm 0,07 \text{ g L}^{-1}$ . Os resultados de biomassa podem ser observados na Figura 12.



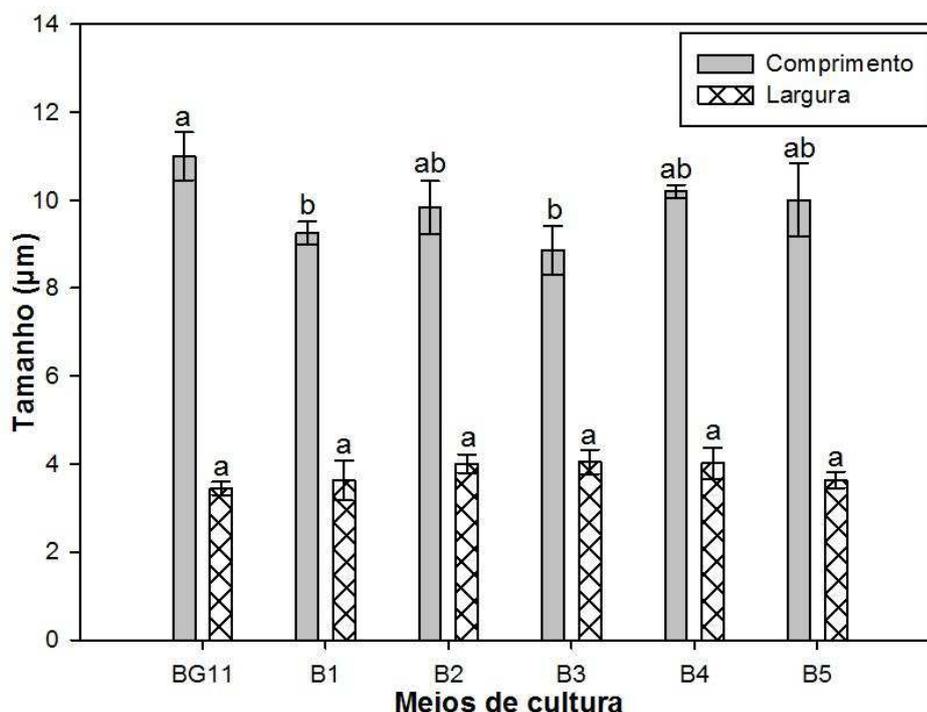
**Figura 12** – Massa seca de *Scenedesmus* sp. BR003 no 16º dia, cultivado em diferentes meios de cultura. Barras contendo diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

### 3.5.3.3. Efeitos de diferentes meios de cultura na plasticidade fenotípica de *Scenedesmus* sp. BR003

Foram observadas diferenças significativas para o comprimento das células de *Scenedesmus* sp. BR003 cultivado em diferentes meios de cultura, contudo não foram observadas diferenças quanto à largura das células (Figura 13). *Scenedesmus* sp. BR003 apresentou células com maior comprimento quando cultivada no meio de cultura BG11 ( $10,99 \pm 0,55 \mu\text{m}$ ). As células de *Scenedesmus* sp. BR003 foram menores nos meios de cultura B1 e B3, e valores intermediários foram obtidos para os meios de cultura B2, B4 e B5.

A partir das fotomicrografias observou-se que os meios de cultura influenciaram na formação de cenóbios (Figura 14). *Scenedesmus* sp. BR003 em meio de cultura BG11 apresentou principalmente cenóbios com 4 células, e 2 células em menor proporção. Ocorreram poucas células individuais no meio de cultura BG11. Padrões similares foram observados no meio de cultura B2, mas com uma maior proporção de cenóbios com 2 células. Também ocorreram a presença de muitos cenóbios com 4 células nos meios de cultura B4 e B5, com

presença de cenóbios de 2 células e células individuais. Contudo, foram observados cenóbios com 8 células no meio e cultura B4, enquanto ocorreram cenóbios com 3 células no meio de cultura B5. Células individuais de *Scenedesmus* sp. BR003 foram muito recorrentes nos meios de cultura B1 e B3, ocorrendo também cenóbios com 2 células em ambos. *Scenedesmus* sp. BR003 em meio de cultura B3 também apresentou cenóbios com 3 células e aglomerados de células sem padrão cenobial definido.



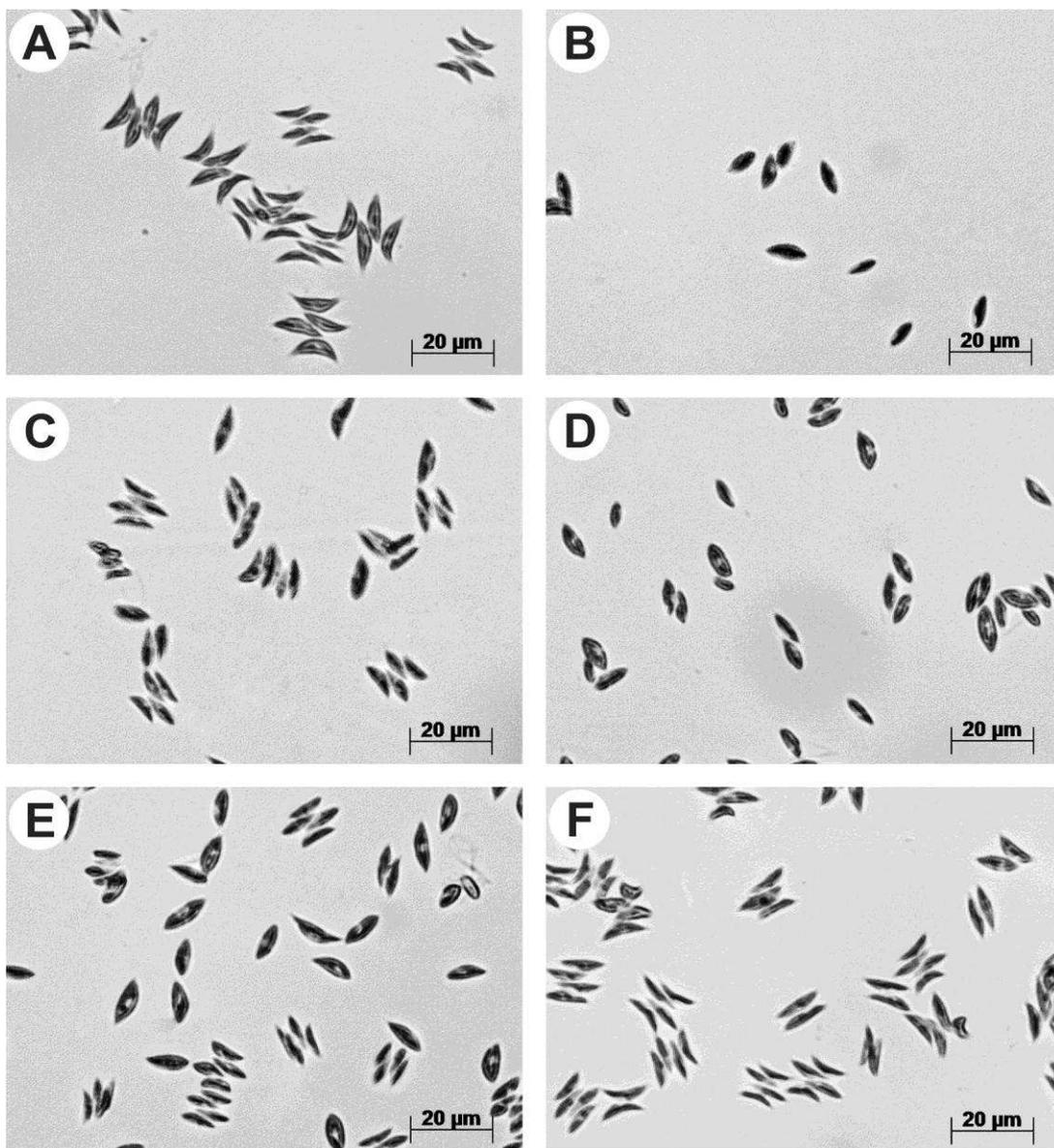
**Figura 13** – Tamanhos celulares de *Scenedesmus* sp. BR003 no 16º dia, cultivado em diferentes meios de cultura. Barras contendo diferentes letras dentro de cada parâmetro diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

#### 3.5.3.4. Efeitos de diferentes meios de cultura nos pigmentos de *Scenedesmus* sp. BR003

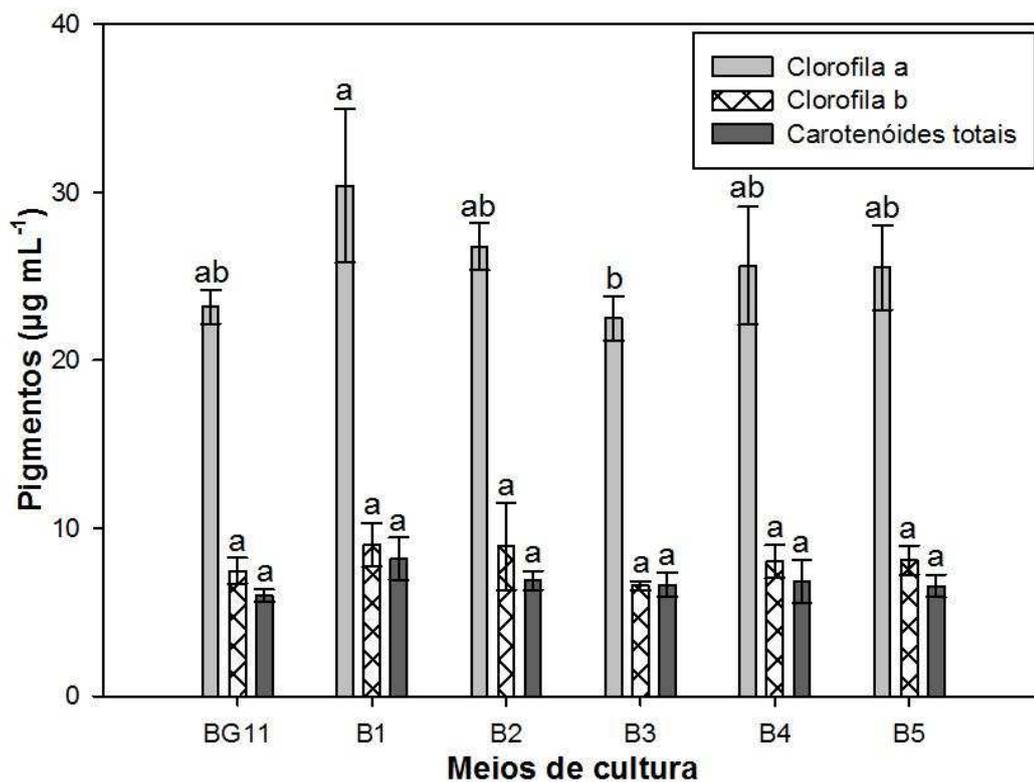
A maior concentração de clorofila *a* de *Scenedesmus* sp. BR003 foi obtida no meio de cultura B1 ( $30,39 \pm 4,49 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Figura 15). *Scenedesmus* sp. BR003 nos meios de cultura B2, B4 e B5 apresentou concentrações intermediárias de clorofila *a*. A menor concentração de clorofila *a* de *Scenedesmus* sp. BR003 ocorreu no meio de cultura B3.

Não foram encontradas diferenças significativas para a concentração de clorofila *b* entre os meios de cultura (Figura 15). O teor de clorofila *b* foi em média de  $8 \mu\text{g mL}^{-1}$  para os meios de cultura. Também não foram encontradas

diferenças significativas para a concentração de carotenóides totais para os meios de cultura (Figura 15). A concentração de carotenóides totais ficou em média de  $6,85 \mu\text{g mL}^{-1}$ .



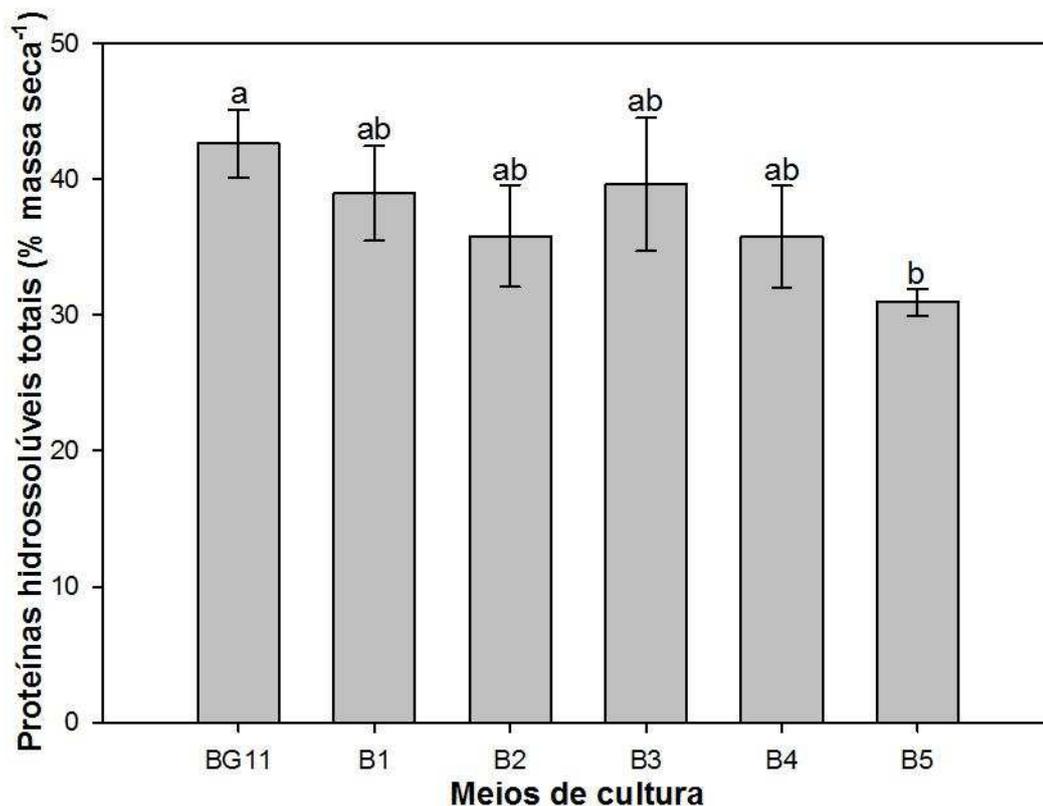
**Figura 14** – Padrão de cenóbios de *Scenedesmus* sp. BR003 no 16º dia, cultivado em diferentes meios de cultura. Legenda: A – BG11, B – B1, C – B2, D – B3, E – B4 e F – B5.



**Figura 15** – Concentração de clorofila a, clorofila b e carotenóides totais de *Scenedesmus* sp. BR003 no 16º dia, cultivado em diferentes meios de cultura. Barras contendo diferentes letras dentro de cada parâmetro diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

### 3.5.3.5. Efeitos de diferentes meios de cultura nos teores de proteínas hidrossolúveis totais de *Scenedesmus* sp. BR003

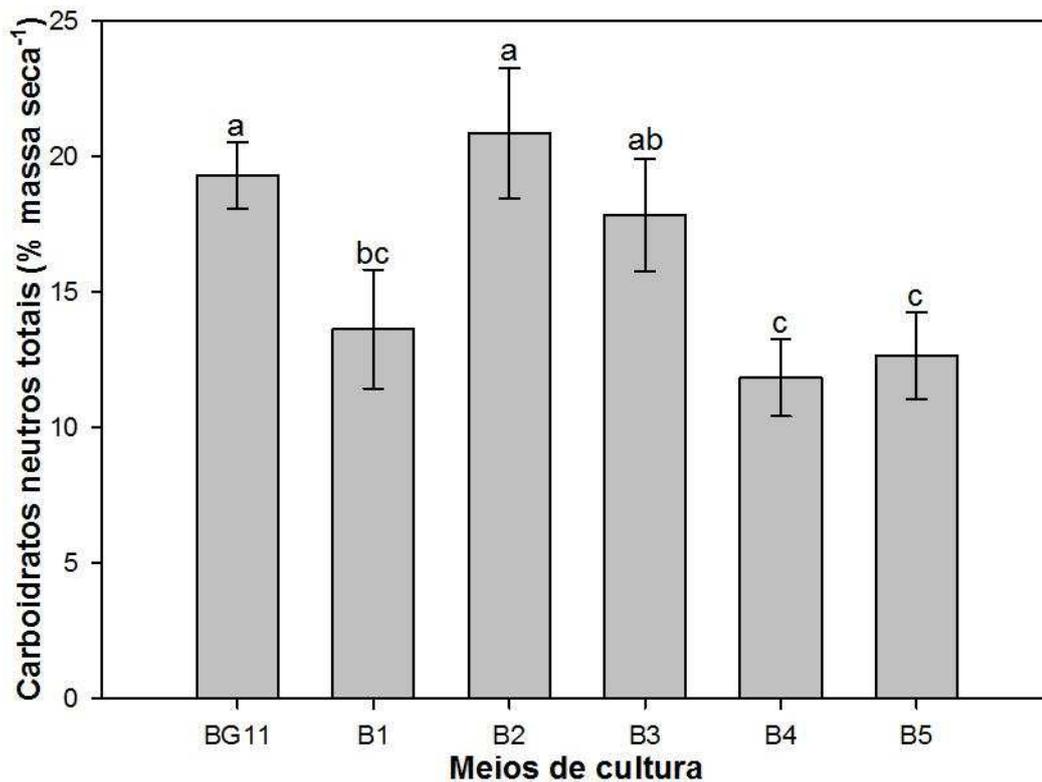
Os teores de proteínas hidrossolúveis totais de *Scenedesmus* sp. BR003 apresentaram diferenças significativas entre tratamentos (Figura 16). O maior acúmulo de proteínas hidrossolúveis totais de *Scenedesmus* sp. BR003 foi obtido no meio de cultura controle ( $42,62 \pm 2,54$  % massa seca<sup>-1</sup>). Rendimentos intermediários de proteínas hidrossolúveis totais de *Scenedesmus* sp. BR003 foram obtidos nos meios de cultura B1, B2, B3 e B4.



**Figura 16** – Percentual de proteínas hidrossolúveis totais de *Scenedesmus* sp. BR003 no 16º dia, cultivado em diferentes meios de cultura. Barras contendo diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

### 3.5.3.6. Efeitos de diferentes meios de cultura nos teores de carboidratos neutros totais de *Scenedesmus* sp. BR003

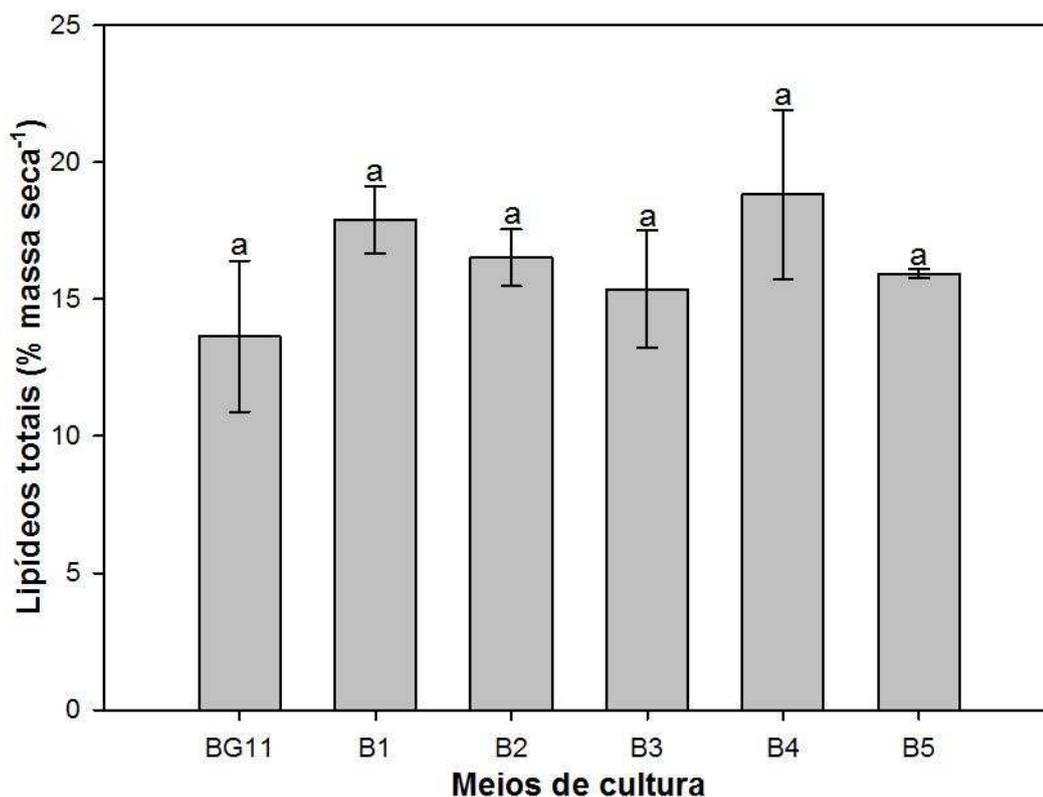
*Scenedesmus* sp. BR003 cultivado nos meios de cultura controle e B2 apresentou um maior acúmulo de carboidratos neutros totais dentre os meios de cultura estudados (Figura 17). O acúmulo de carboidratos neutros totais por *Scenedesmus* sp. BR003 foi intermediário nos meios de cultura B1 e B3, enquanto menores rendimentos foram obtidos nos meios de cultura B4 e B5.



**Figura 17** – Percentual de carboidratos neutros totais de *Scenedesmus* sp. BR003 no 16º dia, cultivado em diferentes meios de cultura. Barras contendo diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

### 3.5.3.7. Efeitos de diferentes meios de cultura nos teores de lipídeos totais de *Scenedesmus* sp. BR003

Não houve diferença significativa para o acúmulo de lipídeos totais de *Scenedesmus* sp. BR003 cultivado nos diferentes meios de cultura (Figura 18). Os teores de lipídeos totais ficaram próximos a 15-18 % em massa seca.



**Figura 18** – Percentual de lipídeos totais de *Scenedesmus* sp. BR003 no 16º dia, cultivado em diferentes meios de cultura. Barras contendo diferentes letras diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 %.

### 3.5.4. DISCUSSÃO

Os meios de cultura elaborados proporcionaram valores similares ou superiores em grande parte dos parâmetros estudados de *Scenedesmus* sp. BR003 em relação ao meio de cultura controle. Os resultados reforçam o potencial do uso de fertilizantes em substituição aos sais inorgânicos de pureza analítica (Valenzuela-Espinoza et al., 1999; Raof et al., 2006).

Fertilizantes agrícolas possuem em sua composição total aproximadamente 40 % dos elementos pelos quais ele é utilizado, mas algumas vezes as concentrações dos elementos são inferiores a 10 % (Anexo, Tabela A3). A fração desconhecida do fertilizante agrícola pode conter elementos que podem inibir o crescimento de microalgas. Valenzuela-Espinoza *et al.* (1999) realizaram a análise elementar de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e observaram que o fertilizante possuía pequenas quantidades de alumínio, cromo, Fe, manganês e zinco. Contudo, as concentrações de micronutrientes encontradas no fertilizante foi inferior à da composição do meio de cultura f/2. Contudo, o meio de cultura f/2 não possui alumínio e cromo em sua composição original. Não foram

encontrados mais relatos sobre análises elementares de fertilizantes para cultivos de microalgas na literatura.

Baixas concentrações dos elementos de interesse obrigam a uma maior adição de fertilizantes agrícolas, representando uma carga salina maior do que as de meios de cultura empregados em laboratório. É provável que a carga salina maior e a baixa solubilidade dos fertilizantes resultem numa rápida saturação de filtros de baixa porosidade. Os filtros de baixa porosidade são uma alternativa para a recuperação de biomassa de microalgas. Segundo Grima *et al.* (2003), a troca de filtros está entre os principais custos deste processo. A baixa solubilidade também faz com que partículas fiquem em suspensão, aumentando a turbidez dos meios de cultura e reduzindo a penetração de luz nos fotobiorreatores.

A filtração do meio de cultura antes da inoculação pode ser uma alternativa que reduza os problemas da baixa solubilidade em escala laboratorial, contudo tal prática pode se tornar inviável em aplicações biotecnológicas, assim como aumentar os resíduos do cultivo. É provável também que as microalgas utilizem parte do fertilizante não solúvel, uma vez que estes possuem frações dos elementos não solúveis em água, levando a uma subutilização do fertilizante. Mediante estes fatores, optou-se em não filtrar os meios de cultura antes da inoculação no presente trabalho.

A estirpe de *Scenedesmus* sp. BR003 não apresentou fase de adaptação para aos diferentes meios de cultura (Figura 10). Maiores taxas de crescimento foram obtidas no início de todos os cultivos, perdurando até o 10º dia de cultivo (fase *log*). Griffiths *et al.* (2011b) obtiveram resultados similares, uma vez que no início do cultivo a concentração de biomassa é baixa e não há limitação de nutrientes ou luz.

Como o comportamento de crescimento foi similar entre os tratamentos, a redução da taxa de crescimento depois do 10º dia (Figura 10) se deve, provavelmente, a uma menor penetração de luz nos cultivos devido a alta densidade de células. Uma vez que os meios de cultura possuíam diferentes cargas nutricionais, supõe-se que a redução da taxa de crescimento não tenha sido provocada apenas pela depleção de nutrientes.

*Scenedesmus* sp. BR003 apresentou maiores rendimentos em células para os meios de cultura B1 e B4,  $7,25 \pm 0,89 \times 10^7$  céls mL<sup>-1</sup> e  $7,07 \pm 1,09 \times 10^7$

céls mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 11). Os meios de cultura B1 e B4 possuíam NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como fonte de N. Xin *et al.* (2010) verificaram que *Scenedesmus* sp. LX1 quando cultivado em NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, apresentou maiores taxas de crescimento do que quando cultivado em outras fontes de N, mas apresentou menor concentração de células ao término do cultivo por causa do decréscimo de pH ocasionado pela assimilação de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Tal problema não foi observado no presente trabalho uma vez que o pH foi monitorado. A cepa *Scenedesmus* sp. BR003 apresentou maiores concentrações celulares nos outros meios de cultura a base de fertilizantes em relação ao meio de cultura BG11. Os resultados do presente trabalho reforçam o potencial do uso de fertilizantes agrícolas como fonte de nutrientes para microalgas (Valenzuela-Espinoza *et al.*, 1999; Raof *et al.*, 2006).

Os resultados de massa seca foram similares aos de concentração celular final (Figura 12). A maior diferença observada entre os dois parâmetros foi no meio de cultura B5, onde *Scenedesmus* sp. BR003 apresentou um valor de massa seca maior. Isto se deve, provavelmente, aos sais que não foram solubilizados durante a etapa de lavagem da biomassa para determinação de massa seca. As concentrações de massa seca de *Scenedesmus* sp. BR003 obtidas para os meios de cultura B1 (1,44 ± 0,19 g L<sup>-1</sup>), B2 (1,37 ± 0,12 g L<sup>-1</sup>) e B4 (1,41 ± 0,16 g L<sup>-1</sup>), foram próximas aos obtidos por Tang *et al.* (2011), que utilizaram condições parecidas de cultivo.

Não foram observados efeitos inibitórios marcantes no crescimento de *Scenedesmus* sp. BR003 para nenhum dos meios de cultura a base de fertilizantes. Logo, considerando a carga salina maior destes meios de cultura em relação ao meio controle, era de se esperar que houvesse maiores rendimentos para a concentração celular e massa seca.

Pode-se fazer uma comparação entre os meios de cultura B1, B3 e B4. O meio de cultura B4 possui 1/3 de N em relação aos meios de cultura B1 e B3, mas *Scenedesmus* sp. BR003 apresentou melhores resultados no meio de cultura B4 do que no meio de cultura B3. Os resultados do meio de cultura B4 foram similares ao meio de cultura B1 para concentração celular e massa seca de *Scenedesmus* sp. BR003. Ainda que os meios de cultura B1 e B3 sejam diferentes em composição e concentração (Tabela 5), era de se esperar que o meio de cultura B3 proporcionasse um resultado similar, ou melhor, ao meio de cultura B1 devido a alta concentração de P. É provável que a elevada concentração de monofosfato de amônio do meio de cultura B3 tenha inibido o

crescimento de *Scenedesmus* sp. BR003.

*Scenedesmus* sp. BR003 apresentou maior rendimento de clorofila *a* no meio de cultura B1 dentre todos os meios de cultura avaliados. Não foram observadas diferenças para clorofila *b* e carotenóides totais, demonstrando que os meios de cultura não apresentaram efeitos negativos marcantes sobre a síntese de pigmentos de *Scenedesmus* sp. BR003.

Segundo Morabito *et al.* (2007) o tamanho de células do fitoplâncton pode ser influenciado pela temperatura e nutrientes. Como os cultivos do presente trabalho foram realizados em sala com temperatura controlada, pode-se assumir que os diferentes tamanhos de células foram ocasionados por diferenças nutricionais. Contudo não foi possível identificar os nutrientes relacionados aos tamanhos celulares de *Scenedesmus* sp. BR003. Não foram observadas diferenças significativas para a largura de células de *Scenedesmus* sp. BR003 entre tratamentos (Figura 13). Chen *et al.* (2011) observaram em *S. obliquus* uma relação inversa entre o comprimento de células e a concentração de P, contudo não se pode afirmar no presente trabalho que os diferentes comprimentos de células de *Scenedesmus* sp. BR003 tenham sido influenciados apenas pela concentração de P dos meios de cultura a base de fertilizantes. Os resultados de Griffiths *et al.* (2011b) cultivando *Scenedesmus* sp. em meios de cultura rico e pobre em N, mostraram que este nutriente não exerceu efeito nos tamanhos das células.

A plasticidade fenotípica de *Scenedesmus* sp. BR003 também foi evidenciada no presente trabalho. O gênero é caracterizado pela formação de cenóbios de 4 e 8 células, mas sob certas condições pode se desenvolver em formas unicelulares (Peña-Castro *et al.*, 2004). Observou-se que *Scenedesmus* sp. BR003 apresentou diferentes padrões cenobiais em função dos meios de cultura (Figura 14). As condições de cultivo influem no padrão celular de *Scenedesmus* (Peña-Castro *et al.*, 2004, Liu *et al.*, 2010, Lüring, 2011). *Scenedesmus* sp. BR003 apresentou menores comprimentos celulares nos meios de cultura B1 e B3, e também muitas formas unicelulares e colônias com menor número de células.

Os padrões fenotípicos de *Scenedesmus* sp. BR003 observados nos demais meios de cultura se assemelham ao BG11, diferindo apenas numa maior presença de células individuais (Figura 14). É provável que os meios de cultura B1 e B3 afetem negativamente o comprimento de células e tamanho de colônias

de *Scenedesmus* sp. BR003 devido às altas concentrações de  $\text{NH}_4^+$ . Isto é corroborado pelos cultivos realizados com  $\text{NO}_3^-$ , dos meios de cultura BG11 e B5, que tinham a mesma equivalência em N para os meios de cultura B1 e B3. Cabe ressaltar que colônias maiores de *Scenedesmus* geralmente são mais fáceis de sedimentar (Lüring, 2003), sendo assim um ponto importante para a recuperação de biomassa em aplicações biotecnológicas.

*Scenedesmus* sp. BR003 apresentou maior rendimento de proteínas hidrossolúveis para o meio de cultura controle (Figura 16). Contudo as diferenças entre tratamentos não foram discrepantes, demonstrando que a quantidade fornecida de N foi suficiente para *Scenedesmus* sp. BR003 assimilar, mesmo para os meios de cultura B2 e B4, que possuem 1/3 de N em relação aos outros meios de cultura. Pacheco-Vega & Sánchez-Saavedra (2009), também obtiveram teores similares de proteínas quando cultivaram *Chaetoceros muelleri* em meios de cultura convencional e a base de fertilizantes agrícolas. Comportamento similar também foi identificado por Valenzuela-Espinoza *et al.* (2002) e Raouf *et al.* (2006).

Maiores concentrações de carboidratos hidrossolúveis totais de *Scenedesmus* sp. BR003 foram obtidas nos meios de cultura controle e B2 (Figura 17). A partir das curvas de crescimento (Figura 8) pode-se observar que *Scenedesmus* sp. BR003 apresentou um declínio na concentração celular ao final do cultivo para o meio de cultura B2, enquanto o menor crescimento foi obtido no meio de cultura controle. Segundo Willians & Laurens (2010), microalgas podem acumular carboidratos em situações de depleção de nutrientes. Os resultados encontrados são um indício de que *Scenedesmus* sp. BR003 acumula carboidratos ao atingir a fase estacionária de crescimento. Novos estudos precisam ser feitos para identificar a via metabólica preferencial para acúmulo de reservas que a microalga apresenta durante a fase estacionária.

*Scenedesmus* sp. BR003 apresentou menores rendimentos para carboidratos neutros totais para os meios de cultura B4 e B5. Contudo, não foi possível encontrar nenhuma correlação entre as diferentes composições dos meios de cultura e o acúmulo de carboidratos neutros totais de *Scenedesmus* sp. BR003. Pacheco-Vega & Sánchez-Saavedra (2009) e Valenzuela-Espinoza *et al.* (2002) também não encontraram diferenças quanto a teor de carboidratos quando cultivaram microalgas em meios de cultura convencional e a base de

fertilizantes.

Também não foram encontradas diferenças estatísticas significativas para o teor de lipídeos totais de *Scenedesmus* sp. BR003 cultivado nos diferentes meios de cultura (Figura 18). Este é outro indício de que a microalga tende para o acúmulo de carboidratos hidrossolúveis totais durante a fase estacionária. O teor de lipídeos totais da microalga ficou em torno de 16 % em massa seca.

Trabalhos na literatura também relataram que não ocorreram diferenças no acúmulo de lipídeos totais por microalgas cultivadas em meios de cultura convencionais e a base de fertilizantes (Pacheco-Vega & Sánchez-Saavedra, 2009; Valenzuela-Espinoza *et al.*, 2002). Yoo *et al.* (2010) obtiveram 9 % em massa seca de lipídeos totais para *Scenedesmus* sp. Griffiths *et al.* (2011b) observaram que *Scenedesmus* sp. quando cultivado em 1,5 g L<sup>-1</sup> de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> apresentou um teor de lipídeos totais máximo de 9 %, enquanto a alga cultivada em 0,15 g L<sup>-1</sup> de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> apresentou um teor de lipídeos totais máximo de 43 %. Grandes rendimentos em triacilgliceróis foram obtidos em cultivos de *S. rubescens* em condições de baixa concentração de N e P. Esta espécie tende a acumular lipídeos tanto em deficiência de N quanto P (Tan & Lin, 2011).

### **3.5.5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES PARA EXPERIMENTOS FUTUROS**

O uso de fertilizantes agrícolas é uma alternativa potencial para substituição dos sais inorgânicos de pureza analítica para cultivos de microalgas. Os fertilizantes não apresentaram efeitos inibitórios marcantes para *Scenedesmus* sp. BR003 e proporcionaram rendimentos similares ou melhores para os parâmetros estudados em relação ao meio de cultura controle. Contudo mais pesquisas precisam ser feitas para melhor compreensão do uso de fertilizantes agrícolas no cultivo de microalgas, assim como o desenvolvimento de novas formulações de meios de cultura.

Os meios de cultura B1 e B4 se sobressaíram quanto aos parâmetros estudados de *Scenedesmus* sp. BR003, demonstrando que a composição e a concentração dos fertilizantes são importantes para o cultivo da microalga. Uma vantagem do meio de cultura B4 frente ao meio de cultura B1 são as células e

colônias maiores, que podem ser mais fáceis de serem recuperadas. A recuperação de biomassa é um dos gargalos para aplicações biotecnológicas de microalgas (Grima *et al.*, 2003). As evidências de que as diferenças fenotípicas foram causadas por altas concentrações de  $\text{NH}_4^+$  abrem margem para novos estudos com menores concentrações de fertilizantes para a obtenção de células e cenóbios maiores.

A microalga *Scenedesmus* sp. BR003 se mostrou robusta ao crescer em 5 diferentes meios de cultura a base de fertilizantes, alguns com carga salina maior do que o meio de cultura controle. Os rendimentos em biomassa foram similares a alguns reportados na literatura para o gênero. Contudo os resultados obtidos no presente trabalho levantam alguns indícios de que a microalga seja sensível a altas concentrações de  $\text{NH}_4^+$ . As evidências de que o monofosfato de amônio apresenta efeitos indesejados no cultivo de *Scenedesmus* sp. BR003 enfatizam a necessidade de mais estudos com este fertilizante, que apresenta boa solubilidade em água.

Ainda que a microalga *Scenedesmus* sp. BR003 seja robusta para cultivos em diferentes composições e concentrações de meios de cultura, novos estudos devem ser realizados para estimular a síntese *de novo* de lipídeos de forma a potencializar seu uso como matéria-prima para biodiesel.

### 3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Ak I., 2011. Effect of an organic fertilizer on growth of blue-green alga *Spirulina platensis*. **Aquacult Int.** doi:10.1007/s10499-011-9473-5.

An S.S., Friedl T., Hegewald E., 1999. Phylogenetic relationships of *Scenedesmus* and *Scenedesmus*-like coccoid green algae as inferred from ITS-2 rDNA sequence comparisons. **Plant Biol.** 1, 418-428. doi:10.1111/j.1438-8677.1999.tb00724.x.

Andersen R.A., 2005. Algal culturing techniques, 1<sup>st</sup> ed. **Elsevier Academic Press.** pp. 435-438.

Brennan L., Owende P., 2010. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renew Sust Energ Rev.** 14, 557-577. doi:10.1016/j.rser.2009.10.009.

Chen M., Li J., Dai X., Sun Y., Chen F., 2011. Effect of phosphorus and temperature on chlorophyll *a* contents and cell sizes of *Scenedesmus obliquus* and *Microcystis aeruginosa*. **Limnology.** 12, 187-192. doi:10.1007/s10201-010-0336-y.

Cheng Y.S., Zheng Y., VanderGheynst J.S., 2011. Rapid quantitative analysis of lipids using a colorimetric method in a microplate format. **Lipids.** 46, 95-103. doi:10.1007/s11745-010-3494-0.

Chiu S.Y., Kao C.Y., Chen C.H., Kuan T.C. Ong S.C., Lin C.S., 2008. Reduction of CO<sub>2</sub> by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. **Bioresour Technol.** 99, 3389-3396. doi:10.1016/j.biortech.2007.08.013.

Converti A., Casazza A.A., Ortiz E.Y., Perego P. Borghi M.D., 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chem Eng Process.** 48, 1146-1151. doi:10.1016/j.cep.2009.03.006.

Fargašová A., Bumbálová A., Havránek E., 1999. Ecotoxicological effects and uptake of metals (Cu<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Mo<sup>6+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, V<sup>5+</sup>) in freshwater alga *Scenedesmus quadricauda*. **Chemosphere.** 38, 1165-1173. doi:10.1016/S0045-6535(98)00346-4.

Feng Y., Li C., Zhang D., 2011. Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. **Bioresour Technol.** 102, 101–105. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.016.

Griffiths M.J., Garcin C., van Hille R.P., Harrison S.T.L., 2011a. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. **J Microbiol Methods**. 85, 119-123. doi:10.1016/j.mimet.2011.02.005.

Griffiths M.L., van Hille R.P., Harrison S.T.L., 2011b. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. **J Appl Phycol**. doi:10.1007/s10811-011-9723-y.

Grima E.M., Belarbi E.H., Fernández A., Medina A.R., Chisti Y., 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotech Adv**. 20,491-515. doi:10.1016/S0734-9750(02)00050-2.

Gouveia L., Oliveira A.C., 2009 Microalgae as a raw material for biofuels production. **J Ind Microbiol Biotechnol**. 36, 269–274. doi:10.1007/s10295-008-0495-6.

Harrison P.J., Berges J.A., 2005. Marine culture media, in: Andersen, R.A. (Ed.), *Algal culturing techniques*, 1<sup>st</sup> ed. **Elsevier Academic Press**. pp. 21-33.

Hegewald E.H., 1997. Taxonomy and phylogeny of *Scenedesmus*. **Algae**. 12, 235-246.

Heredia-Arroyo T., Wei W., Hu B., 2010. Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*. **Appl Biochem Biotechnol**. 162, 1978-1995. doi:10.1007/s12010-010-8974-4.

Hindák F., HindákováAl., 2008. Morphology and taxonomy of some rare chlorococcalean algae (Chlorophyta). **Biologia**. 6, 781-790. doi:10.2478/s11756-008-0099-7.

Ho S.H., Chen W.M., Chang J.S., 2010. *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO<sub>2</sub> mitigation and biodiesel production. **Bioresour Technol**. 101, 8725-8730. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.112.

Hsieh C.H., Wu W.T., 2009. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. **Bioresour Technol**. 100, 3921-3926. doi:10.1016/j.biortech.2009.03.019.

Huang Z., Li L., Huang G., Yan Q., Shi B., Xu, X., 2009. Growth-inhibitory and metal-binding proteins in *Chlorella vulgaris* exposed to cadmium or zinc. **Aquat Toxicol**. 91, 54-61. doi:10.1016/j.aquatox.2008.10.003.

Illman A.M., Scragg A.H., Shales S.W., 2000. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme Microb Technol**. 27, 631–635. doi:10.1016/S0141-0229(00)00266-0.

Izard J., Limberger R. J., 2003. Rapid screening method for quantitation of bacterial cell lipids from whole cells. **J Microbiol Methods**. 55, 411-418.

doi:10.1016/S0167-7012(03)00193-3.

Jianrong X.I.A., Qiran T.I.A.N., 2009. Early stage toxicity of excess copper to photosystem II of *Chlorella pyrenoidosa* - OJIP chlorophyll a fluorescence analysis. **J Environ Sci.** 21, 1569-1574. doi:10.1016/S1001-0742(08)62457-2.

Khalil Z.I., Asker M.M.S., El-Sayed S., Kobbia I.A., 2010. Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*. **World J Microbiol Biotechnol.** 26, 1225-1231. doi:10.1007/s11274-009-0292-z.

Kawachi M., Noël M.H., 2005. Sterilization and sterile technique, in: Andersen, R.A. (Ed.), Algal culturing techniques, 1<sup>st</sup> ed. **Elsevier Academic Press.** pp. 65-81.

Khalil Z.I., Asker M.M.S., El-Sayed S., Kobbia I.A., 2010. Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*. **World J Microbiol Biotechnol.** 26, 1225-1231. doi:10.1007/s11274-009-0292-z.

Kugrens P., Clay B.L., Aguiar R., 2000. Ultrastructure of *Lobocharacium coloradoense*, gen. et sp. nov. (Chlorophyta, Characiosiphonaceae), an unusual coenocyte from Colorado. **J Phycol.** 36, 421-432. doi:10.1046/j.1529-8817.2000.99089.x.

Lira, R.D.A., 2011. Estudo do rendimento de biomassa da microalga nativa *Chlorella* sp. visando a obtenção de biocombustíveis. Tese de doutorado. Viçosa. **Universidade Federal de Viçosa.** Brasil. 119p.

Liu J., Huang J., Fan K.W., Jiang Y., Zhong Y., Sun Z., Chen F., 2010 Production potential of *Chlorella zofingiensis* as a feedstock for biodiesel. **Bioresour Technol.** 101, 8658-8663. doi:10.1016/j.biortech.2010.05.082.

Liu J., Huang J., Sun Z., Zhong Y., Jiang Y., Chen F., 2011. Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: assessment of algal oils for biodiesel production. **Bioresour Technol.** 102, 106-110. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.017.

Lourenço S.O., 2006. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações, 1<sup>st</sup> ed. **Rima.**

Lucarini A.C.; Kilikian B.V., 1999. Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances. **Biotechnol Techn.** 13, 149-154. doi:10.1023/A:1008995609027.

Lürling, M., 2003. Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. **Ann Limnol-Int J Lim.** 39, 85-101. doi:10.1051/limn/2003014.

Lürling M., 2011. Metribuzin impairs the unicell-colony transformation in the green alga *Scenedesmus obliquus*. **Chemosphere.** 82, 411-417. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.09.070.

Lv J.M., Cheng L.H., Xu X.H., Zhang L., Chen H.L., 2010. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. **Bioresour Technol.** 101, 6797-6804. doi:10.1016/j.biortech.2010.03.120.

Machado M.F., 2010. Cultivo de microalgas (*Chlorella* sp. e *Ankistrodesmus* sp. – Chlorophyceae) em água residuária suplementada com uréia e CO<sub>2</sub>. Dissertação de mestrado. Viçosa. **Universidade Federal de Viçosa. Brasil.** 39p.

Mandal S., Mallick N., 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. **Appl Microbiol Biotechnol.** 84, 281-291. doi:10.1007/s00253-009-1935-6.

Masuko T., Minami A., Iwasaki N., Majima T., Nishimura S.I., Lee Y.C., 2005. Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format. **Anal Biochem.** 339, 69-72. doi:10.1016/j.ab.2004.12.001.

McFadden G.I., Melkonian M., 1986. Use of Hepes buffer for microalgal culture media and fixation for electron microscopy. **Phycologia.** 22, 551-557. doi:10.2216/i0031-8884-25-4-551.1.

Meijer E.A., Wijffels R.H., 1998. Development of a fast, reproducible and effective method for the extraction and quantification of proteins of micro-algae. **Biotechnol Techn.** 12, 353-358. doi:10.1023/A:1008814128995.

Morabito G., Oggioni A., Caravati E., Panzani P., 2007. Seasonal morphological plasticity of phytoplankton in Lago Maggiore (N. Italy). **Hydrobiologia.** 578, 47-57. doi:10.1007/s10750-006-0432-5.

Nalewajko C., Colman B., Olaveson M., 1997. Effects of pH on growth, photosynthesis, respiration, and copper tolerance of three *Scenedesmus* strains. **Environ Exper Bot.** 37, 153-160. doi:10.1016/S0098-8472(96)01029-5.

Omar H.H., 2002. Bioremoval of zinc ions by *Scenedesmus obliquus* and *Scenedesmus quadricauda* and its effect on growth and metabolism. **Int Biodeter Biodegrad.** 50, 95-100. doi:10.1016/S0964-8305(02)00048-3.

Osman M.E.H., El-Naggar A.H., El-Sheekh M.M., El-Mazally E.E., 2004. Differential effects of Co<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> on protein metabolism in *Scenedesmus obliquus* and *Nitzschia perminuta*. **Environ Toxicol Pharm.** 16, 169-178. doi:10.1016/j.etap.2003.12.004.

Pacheco-Vega J.M., Sánchez-Saavedra M.D.P., 2009. The biochemical composition of *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann Grown) with an agricultural fertilizer. **J World Aquacult Soc.** 40, 556-560. doi:10.1111/j.1749-7345.2009.00276.x.

Peña-Castro J., Martínez-Jerónimo F., Esparza-García F., Cañizares-Villaunueva R.O., 2004. Phenotypic plasticity in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae)

in response to heavy metals stress. **Chemosphere**. 57, 1629-1636. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.06.041.

Plekhanov S.E., Chemeris Y.K., 2003. Early toxic effects of zinc, cobalt, and cadmium on photosynthetic activity of the green alga *Chlorella pyrenoidosa* chick s-39. **Biol Bull**. 5, 610-616. doi:10.1023/A:1025806921291.

Phukan M.M., Chutia R.S., Konwar B.K., Kataki R., 2011. Microalgae *Chlorella* as a potential bio-energy feedstock. **Appl Energ**. 88, 3307-3312. doi:10.1016/j.apenergy.2010.11.026.

Raof B., Kaushik B.D., Prasanna R., 2006. Formulation of a low-cost medium for mass production of *Spirulina*. **Biomass Bioenerg**. 30, 537-542. doi:10.1016/j.biombioe.2005.09.006.

Rodolfi L., Zittelli G. C., Barsanti L., Rosati G., Tredici M.R., 2003. Growth medium recycling in *Nannochloropsis sp.* mass cultivation. **Biomol Eng**., 20, 243-248. doi:doi:10.1016/S1389-0344(03)00063-7.

Ryu H.J., Oh K.K., Kim Y.S., 2009. Optimization of the influential factors for the improvement of CO<sub>2</sub> utilization efficiency and CO<sub>2</sub> mass transfer rate. **J Ind Eng Chem**. 15, 471-475. doi:10.1016/j.jiec.2008.12.012.

Saliba T.M., 2005. Manual práctico de higiene ocupacional e PPRA, 1<sup>st</sup> ed. **LTr**.

Scragg A.H., Illman A.M., Carden A., Shales S.W. 2002. Growth of microalgae with increased caloric values in a tubular bioreactor. **Biomass Bioenerg**. 23, 67-73. doi:10.1016/S0961-9534(02)00028-4.

Smedes F., Thomasen T.K., 1996. Evaluation of the Bligh & Dyer Lipid determination method. **Mar Pollut Bull**. 32, 681-688. doi:dx.doi.org/10.1016/0025-326X(96)00079-3.

Tan Y., Lin J., 2011. Biomass production and fatty acid profile of a *Scenedesmus rubescens*-like microalga. **Bioresour Technol**. 102, 10131-10135. doi:10.1016/j.biortech.2011.07.091.

Tang D., Han W., Li P., Miao X., Zhong J., 2011. CO<sub>2</sub> biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO<sub>2</sub> levels. **Bioresour Technol**. 102, 3071-3076. doi:10.1016/j.biortech.2010.10.047.

Teoh M.L., Chu W.L., Marchant H., Phang S.M., 2004. Influence of culture temperature on the growth, biochemical composition and fatty acid profiles of six Antarctic microalgae. **J Appl Phycol**. 16, 421-430. doi:10.1007/s10811-004-5502-3.

Trainor F.R., Egan P.F., 1990. The implications of polymorphism for the

systematics of *Scenedesmus*. **Br Phycol J.** 25, 275-279. doi:10.1080/00071619000650271.

Valenzuela-Espinoza E., Millán-Núñez R., Cebrero-Núñez F., 1999. Biomass production and nutrient uptake by *Isochrysis* aff. *galbana* (Clone T-ISO) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. **Aquacult Eng.** 20, 135-147. doi:10.1016/S0144-8609(99)00011-4.

Valenzuela-Espinoza E., Millán-Núñez R., Cebrero-Núñez F., 2002. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll *a* content in *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. **Aquacult Eng.** 25, 207-216. doi:10.1016/S0144-8609(01)00084-X.

Vieira, D.B., 2011. Cultivo de *Chlorella* sp. em fotobiorreator suplementado com gás de incineração de resíduos sólidos perigosos e avaliação de seqüestro de dióxido de carbono para produção de biomassa. Dissertação de mestrado. Viçosa. **Universidade Federal de Viçosa**. Brasil. 83p.

Watanabe A., 1960. List of algal strains in the collection at the Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo. **J Gen Appl Micro.** 6, 283-292.

Wellburn A.R., 1994. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers or different resolution. **J Plan Physiol.** 144, 307-313.

Williams P.J.L.B., Laurens L.M.L., 2010. Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. **Energy Environ Sci.** 3, 554-590. doi:10.1039/b924978h.

Wood A.M., Everroad R.C., Wingard L.M., 2005. Measuring growth rates in microalgal cultures, in: Andersen, R.A. (Ed.), *Algal culturing techniques*, 1<sup>st</sup> ed. **Elsevier Academic Press**. pp. 269-285.

Xin L., Hong-Ying H., Ke G., Jia Y., 2010. Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources. **Ecol Eng.** 36, 379-381. doi:10.1016/j.ecoleng.2009.11.003.

Yoo C., Jun, S.Y., Lee J.Y., Ahn C.Y., Oh H.M., 2010. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. **Bioresour Technol.** 101, S71-S74. doi:10.1016/j.biortech.2009.03.030.

Zhu C.J., Lee Y.K., 1997. Determination of biomass dry weight of marine microalgae. **J Appl Phycol.** 9, 189-194. doi:10.1023/A:1007914806640.

### 3.7. CONCLUSÕES GERAIS

---

A partir dos resultados obtidos pode-se afirmar que é possível substituir sais inorgânicos de pureza analítica dos meios de cultura por fertilizantes agrícolas comerciais para cultivos de microalgas. Os fertilizantes apresentam, em sua grande maioria, grande redução de custos em relação aos sais inorgânicos de pureza analítica. Tal medida é importante para aplicações biotecnológicas onde o produto final apresenta baixo valor agregado, como a produção de óleo para a síntese de biodiesel.

Os fertilizantes líquidos, apesar de ricos em composição, são mais caros e apresentam elevadas concentrações de alguns micronutrientes. Por terem composição fixa, reduzem as possibilidades de formulações de meios de cultura, impossibilitando que sejam feitas diferentes técnicas de cultivo, como cultivos em deficiência de nutrientes.

Os fertilizantes granulados são mais baratos e possibilitam que sejam feitas diversas técnicas de cultivos. Porém a solubilidade e a concentração dos fertilizantes devem ser levadas em conta.

A microalga para cultivos em meios de cultura a base de fertilizantes deve ser tolerante a altas cargas salinas. A tolerância e capacidade de assimilação de  $\text{NH}_4^+$  também é uma característica desejável, uma vez que fertilizantes a base de  $\text{NH}_4^+$  são mais baratos do que fertilizantes a base de  $\text{NO}_3^-$ .

*Chlorella* sp. BR001 apresentou baixo rendimento em massa seca para todos os tratamentos, mostrando que a mesma não possui potencial para aplicações tecnológicas.

Contudo, a cepa de *Scenedesmus* se mostrou promissora e robusta para cultivos com aplicações biotecnológicas, apresentando alto rendimento em massa seca para todos os meios de cultura B's. As vias metabólicas de acúmulo de carboidratos e lipídeos devem ser estudadas, a fim de verificar quais condições proporcionam o acúmulo de lipídeos pela microalga, possibilitando dessa forma concluir se a microalga é potencial para ser utilizada como fonte de lipídeos para biodiesel.

### 3.8. ANEXOS

**Tabela A1** – Composição dos meios de cultura reportados na literatura.

Sal inorgânico	Meios de cultura (g L <sup>-1</sup> )					
	BG11	BBM	MBM	MDM	MC	Baixo teor de N
Citrato férrico de amônio	0,00600					
Ácido cítrico	0,00600					
NaNO <sub>3</sub>	1,50000	0,2500				
KNO <sub>3</sub>			0,25	1,00	1,25	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	0,04000	0,0983 <sup>a</sup>	0,098 <sup>a</sup>	0,328 <sup>a</sup>		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		0,1750	0,175		1,25	1,361
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>						0,203
KCl						2,236
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,07500	0,0750	0,075	0,25	1,25	5,048 <sup>a</sup>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,03600	0,0250	0,0132 <sup>a</sup>	0,0132 <sup>a</sup>		
NaCl		0,0250	0,025	0,100		
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O		0,0050	0,020	0,020	0,020	0,015 <sup>a</sup>
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,02000					
KOH		0,0310				
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	0,00104	0,0637 <sup>b</sup>				
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		0,001 <sup>c</sup>				
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,00286	0,0114	0,0029	0,0029	0,0029	
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,00181	0,0014	0,0018	0,0018	0,0018	
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,00022	0,0088	0,00023206 <sup>e</sup>	0,00023206 <sup>e</sup>	0,00023206 <sup>e</sup>	
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,00008	0,0016	0,00008	0,00008	0,00008	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,00039	0,0012 <sup>d</sup>	0,00002 <sup>f</sup>	0,00002 <sup>f</sup>	0,00002 <sup>f</sup>	
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,00005	0,0005				
<b>MASSA FINAL</b>	<b>1,69</b>	<b>0,82</b>	<b>0,66</b>	<b>1,72</b>	<b>3,78</b>	<b>8,86</b>

<sup>a</sup>Sal inorgânico substituído pelo mesmo, mas na forma hidratada. A massa adicionada foi recalculada com base na quantidade de água do sal inorgânico hidratado.

<sup>b</sup>O EDTA da composição original foi substituído por quantidade equivalente de Na<sub>2</sub>EDTA.2H<sub>2</sub>O.

<sup>c</sup>Quantidade em mL.

<sup>d</sup>O MoO<sub>3</sub> da composição original foi substituído por quantidade equivalente de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O.

<sup>e</sup>O ZnCl<sub>2</sub> da composição original foi substituído por quantidade equivalente de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.

<sup>f</sup>O 3(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>O.7MoO<sub>3</sub>.4H<sub>2</sub>O da composição original foi substituído por quantidade equivalente de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O.

Fontes: Watanabe, 1960; Illman *et al.*, 2000; Andersen *et al.*, 2005.

**Tabela A2** – Composição dos fertilizantes utilizados nos meios de cultura A1, A2 e A3. Frações mínimas solúveis em água.

<b>Fertilizante 1</b>		<b>Fertilizante 2</b>		<b>Fertilizante 3</b>	
<b>Nutriente</b>	<b>Concentração (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Nutriente</b>	<b>Concentração (%)</b>	<b>Nutriente</b>	<b>Concentração (%)</b>
N	70,2	N	6	<b>Fertilizante 3.1</b>	
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	46,8	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	6	N	12
K <sub>2</sub> O	46,8	K <sub>2</sub> O	8	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	60
Mg	5,85	Ca	1	<b>Fertilizante 3.2</b>	
S	11,7	Mg	0,5	N	15
B	0,234	B	0,03	Ca	19
Cl	3,51	Cu	0,1	<b>Fertilizante 3.3</b>	
Co	0,234	Zn	1	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	2
Cu	0,585			K <sub>2</sub> O	45
Fe	1,17				
Mn	0,585				
Mo	0,117				
Zn	1,17				

**Tabela A3** – Composição dos fertilizantes utilizados nos meios de cultura B1, B2, B3, B4 e B5. Frações mínimas solúveis em água.

<b>Fertilizante</b>	<b>Elemento 1</b>	<b>%</b>	<b>Elemento 2</b>	<b>%</b>	<b>Elemento 3</b>	<b>%</b>
Sulfato de amônio	N	20				
Monofosfato de amônio	P <sub>2</sub> O	60	N	12		
Superfosfato simples	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	16	Ca	16	S	8
Cloreto de potássio	K <sub>2</sub> O	55	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	1		
Nitrato de cálcio	N	15	Ca	19		
Sulfato de magnésio	Mg	9	S	11		
Solução de ferro quelado	Fe	10				

**Tabela A4** – Custos dos meios de cultura reportados na literatura com base em preços fornecidos pela Sigma-Aldrich. Valores em real (R\$).

Sal inorgânico	Custo de 100 g	Meios de cultura					Baixo teor de N
		BG11	BBM	MBM	MDM	MC	
Citrato férrico de amônio	58,20	0,0035					
Ácido cítrico	100,00	0,0060					
NaNO <sub>3</sub>	23,60	0,3540	0,0590				
KNO <sub>3</sub>	54,00			0,1350	0,5400	0,6750	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	34,12	0,0136	0,0335	0,0335	0,1118		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	39,70		0,0695	0,0695		0,4963	0,5403
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	16,88						0,0343
KCl	21,10						0,4718
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	17,75	0,0133	0,0133	0,0133	0,0444	0,2219	0,8959
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	27,70	0,0100	0,0069	0,0037	0,0037		
NaCl	5,28		0,0013	0,0013	0,0053		
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	30,30		0,0015	0,0061	0,0061	0,0061	0,0046
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	36,00	0,0072					
KOH	28,90		0,0090				
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	67,80	0,0007	0,0432				
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	19,56 <sup>a</sup>		0,0002				
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	21,90	0,0006	0,0025	0,0006	0,0006	0,0006	
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	59,40	0,0011	0,0009	0,0011	0,0011	0,0011	
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	42,20	0,0001	0,0037	0,0001	0,0001	0,0001	
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	44,80	0,00004	0,0007	0,00004	0,00004	0,00004	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	162,00	0,0006	0,0019	0,00004	0,00004	0,00004	
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	134,60	0,0001	0,0007				
<b>CUSTO FINAL</b>		<b>0,4109</b>	<b>0,2478</b>	<b>0,2642</b>	<b>0,7130</b>	<b>1,4011</b>	<b>1,9469</b>

<sup>a</sup>Valor para 100 mL.

**Tabela A5** – Custos dos meios de cultura a base de fertilizantes A1, A2 e A3 com base em preços fornecidos pela Sigma-Aldrich e fornecedores de fertilizantes agrícolas. Valores em real (R\$).

Composto	Custo de 100 g	Meios de cultura		
		A1	A2	A3
Fertilizante 1	5,5833	0,0558		
Fertilizante 2	5,4545		0,0109	
Fertilizante 3.1	0,4360			0,0090
Fertilizante 3.2	0,2160			0,0001
Fertilizante 3.3	0,3360			0,0001
Subtotal fertilizantes		0,0558	0,0109	0,0092
<b>Suplementação com BG11</b>				
Citrato férrico de amônio	58,2000	0,0023	0,0035	0,0035
Ácido cítrico	100,0000	0,0040	0,0060	0,0060
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	27,7000	0,0100	0,0080	
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	67,8000	0,0007	0,0007	0,0007
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	36,0000	0,0072	0,0072	0,0072
NaNO <sub>3</sub>	23,6000	0,2549	0,3540	
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	17,7500		0,0114	0,0133
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	21,9000		0,0006	0,0006
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	59,4000		0,0011	0,0011
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	42,2000		0,0001	0,0001
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	44,8000		0,00004	0,00004
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	162,0000		0,0006	0,0006
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	134,6000		0,0001	0,0001
Subtotal suplementação com BG11		0,2790	0,3934	0,0332
<b>Custo final dos meios de cultura a base de fertilizantes</b>		<b>0,3349</b>	<b>0,4043</b>	<b>0,0425</b>

**Tabela A6** – Custos dos meios de cultura a base de fertilizantes B1, B2, B3, B4 e B5 com base em preços fornecidos pela Sigma-Aldrich e fornecedores de fertilizantes agrícolas. Valores em real (R\$).

Composto	Custo de 100 g	Meio de cultura				
		B1	B2	B3	B4	B5
Sulfato de amônio	0,0900	0,00114	0,000371			
Monofosfato de amônio	0,2100			0,00433	0,00144	
Superfosfato simples	0,0780	0,00011	0,00020			0,00011
Cloreto de potássio	0,1360	0,00004	0,00024	0,00004	0,00024	0,00004
Nitrato de cálcio	0,3660			0,00011		0,00356
Sulfato de magnésio	0,1040			0,00009		
Solução de ferro quelado <sup>1</sup>	28,00			0,00075		
<b>Subtotal fertilizantes</b>		<b>0,00209</b>	<b>0,00164</b>	<b>0,00532</b>	<b>0,00262</b>	<b>0,00454</b>
<b>A<sub>5</sub></b>						
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	21,9000			0,000626		
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	59,4000			0,001075		
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	42,2000			0,000093		
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	44,8000			0,000035		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	162,0000			0,000633		
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	134,6000			0,000066		
<b>Subtotal A<sub>5</sub></b>				<b>0,002530</b>		
<b>Custo final</b>		<b>0,00462</b>	<b>0,00417</b>	<b>0,00785</b>	<b>0,00515</b>	<b>0,00707</b>