

Variáveis bióticas e abióticas no cultivo indoor de *Messastrum gracile* em meio misto de macrófitas

Lívia Clara Colla¹
Lívia Castro Borges²
Iago Oliveira Silverio²
Lúcia Helena Sipaúba Tavares³

Tecnologia Ambiental

Resumo

O meio de cultura é uma preparação química que possui nutrientes necessários para que microrganismos se multipliquem e se desenvolvam de forma adequada, permitindo seu estudo, identificação e análise. Melhorar os meios de cultura com aplicação de ingredientes alternativos, são tecnologias adotadas nos protocolos de cultivo de microalga. Dentre essas alternativas estão as plantas aquáticas de fácil ocorrência nessa região e tem um enorme armazenamento de nitrogênio e fósforo. O que mais influencia no desenvolvimento da microalga é o meio de cultura, e a sua composição física e química tem grande influência no bom desempenho do cultivo. Assim o uso de meio alternativo e o conhecimento dos parâmetros do meio de cultura possibilitou maior conhecimento sobre o crescimento da microalga, bem como, contribui para o desenvolvimento de novos protocolos de cultivo.

Palavras-chave: *Lemna minor*; *Eichhornia crassipes*; Microalga; Biomassa; Meio de cultura.

¹Mestranda. Programa de Pós-graduação em aquicultura – Centro de Aquicultura, CAUNESP, Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton, livia.colla@unesp.br.

²Graduando em ciências biológicas. Faculdade de ciências agrárias e veterinárias da Unesp de Jaboticabal, Centro de Aquicultura - CAUNESP, Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton, livia.borges@unesp.br; iago.o.silverio@unesp.br.

³Profª Drª. Programa de Pós-graduação em aquicultura – Centro de Aquicultura, CAUNESP, Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton, lucia.sipauba@unesp.br.

INTRODUÇÃO

A abordagem tradicional para identificar os fatores requeridos para uma elevada biomassa de microalga inicia com a utilização de um meio de cultura definido, o qual a adição de outros elementos contribuirá para o aumento do valor nutricional e consequentemente, o crescimento da microalga. A escolha do meio de cultura usado depende de vários fatores, como a presença de elementos necessários ao crescimento da microalga e, se estes elementos podem afetar a qualidade do produto final e, o custo-benefício do meio utilizado (DALAY et al., 2007). O procedimento mais comum para o cultivo de microalgas é o crescimento foto-autotrófico, possuindo maior eficácia na conversão de energia solar, podendo ser cultivadas em ambientes iluminados naturalmente ou artificialmente (PEREZ-GARCIA, 2011). O meio de cultura é a fonte dos nutrientes necessários para os microrganismos sobreviverem e para ativação das suas funções biológicas, como a síntese e a ação dos componentes celulares (NASCIMENTO, 2019).

O cultivo de microalgas para uso diverso é extremamente dispendioso, neste enfoque a utilização de meios de cultura alternativos tem sido adotado nos últimos anos, como por exemplo o uso da macrófita que viabiliza uma elevada biomassa com alto valor nutricional (SIPAÚBA-TAVARES, 2013). Tanto as macrófitas como as microalgas são produtoras primárias, portanto, ricas em nutrientes pois retiram do meio aquático uma diversidade de compostos para aumento de biomassa. O cultivo de microalgas tem crescido nos últimos anos em função da ampla utilidade desses microrganismos nos diferentes mercados da indústria. Assim, para que haja uma elevada biomassa é necessário que o meio de cultura propicie um crescimento vigoroso com elevado valor nutricional para uso lucrativo da microalga. Um dos grandes problemas para uma produção rendável no mercado é o custo dos meios de cultura comerciais que possuem preços elevados e afetam a produção em larga escala. Esses meios de cultura possuem macro e micronutrientes que são responsáveis pelo aumento da biomassa (SIPAÚBA-

Realização



Apoio



TAVARES et al., 2018 a,b).

Os meios de cultura podem ser do tipo comercial ou alternativo. O meio de cultura comercial é eficaz, mas tem elevado custo, deixando a produção das microalgas inviável quando se quer produzir elevada biomassa (ABALDE et al., 1995). O meio comercial possui formulação específica para cada grupo de microalgas com os nutrientes necessários ao desenvolvimento destes microrganismos. A forma encontrada para reduzir o custo de produção foi desenvolver meios alternativos que forneça os 32 nutrientes essenciais para as microalgas. Os meios de cultura vêm sendo desenvolvidos para diferentes cultivos de microalgas (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009, 2018 a,b).

A diversificação na utilização de subprodutos vem tomando grande impulso para diminuir os impactos nos ecossistemas naturais e/ou artificiais. No caso das macrófitas (plantas aquáticas), é considerada um fertilizante de grande potencial e na sua composição possui altas quantidades de nitrogênio, fósforo, magnésio, manganês, cobre, zinco, e outros elementos que são de suma importância para o crescimento das microalgas (SAHU, 2002).

Mesmo com resultados positivos, os meios de cultura alternativos em certos casos necessitam de vitaminas como a tiamina, biotina e cianocobalamina para potencializar o resultado do desenvolvimento microalgal (BEER et al., 2009), sendo que aproximadamente 70% das algas requerem vitaminas B₁₂ (SIPAÚBA-TAVARES & BACHION, 2002), além de vitamina C e E, que auxiliam na divisão celular das microalgas (TAIZ & ZEIGER, 2004).

Estudos realizados mostram que algumas algas têm se destacado com meios de cultura não convencionais, embora as tecnologias para produção de microalgas estejam em constante desenvolvimento, sendo considerados recentes os subprodutos alternativos, tendo como resultado elevada biomassa como forma de baratear o custo de produção. Assim, estudos que possibilitem maior conhecimento sobre tecnologias alternativas para a produção vigorosa das microalgas com baixo custo de produção irão contribuir para o desenvolvimento de novos protocolos para o cultivo de microalgas. Diferentes meios de cultura têm quantidades diferentes de nutrientes que podem alterar significativamente a

Realização

Apoio

quantidade de biomassa produzida durante o cultivo, sendo importante otimizar a composição do meio de cultura para alcançar o maior rendimento de produtos de valor agregado às microalgas.

O cultivo de microalgas com macrófita tem chamado atenção no desenvolvimento de novos protocolos para baratear o custo de produção interagindo com a biomassa algal de alta qualidade, sendo estratégias que podem trazer maior rentabilidade e produtividade. Utilizar os recursos do próprio ambiente como forma de reutilização e na formação de um novo produto, são ecotecnologias que devem ser adotadas para a obtenção de uma produção racional refletindo diretamente nos custos de produção, visto que poderão gerar outros produtos através da biomassa algal.

A escolha da macrófita *Echhornia crassipes* (EC) e *Lemna minor* (LM) se deve ao fato de serem facilmente encontradas na região e por apresentarem elevado potencial como meio de cultura para microalga *Messastrum gracile* (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009, 2018 a, b).

Até o presente momento, os meios de macrófitas utilizados para crescimento da microalga foram compostos somente por uma espécie de planta aquática. Assim, será adotada uma cultura mista de macrófita (EC+LM) para verificar se o cultivo misto é eficaz no crescimento e valor nutricional de *Messastrum gracile*.

METODOLOGIA

A microalga *M. gracile* é proveniente da Universidade Federal de São Carlos, linhagem nº CCMA-UFSscar5, isolada da Represa do Broa (SP, Brasil), cultivada indoor em sistema de cultivo estático não axênico com aeração constante e temperatura mantida entre $22 \pm 2^\circ\text{C}$. O experimento foi realizado na intensidade de luz de $60 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoper\u00edodo de 24 horas, adotando as associa\u00e7\u00f5es das macr\u00f3fitas *Eichhornia crassipes* e *Lemna minor* como meio de cultura, em frascos com volume de 2 L dura\u00e7\u00e3o de 16 dias, onde ser\u00e3o avaliados os par\u00e2metros do meio de cultura. As vari\u00e1veis do meio de cultura foram mensuradas em diferentes pontos da curva de crescimento, representados

Realiza\u00e7\u00e3o

Apoio

no 4º, 8º, 12º e 16º dias de cultivo. O experimento foi realizado em sistema estático ou “batch”. O protocolo de cultivo é usualmente utilizado para a avaliação desta microalga de acordo com o procedimento adotado (Figura 1).

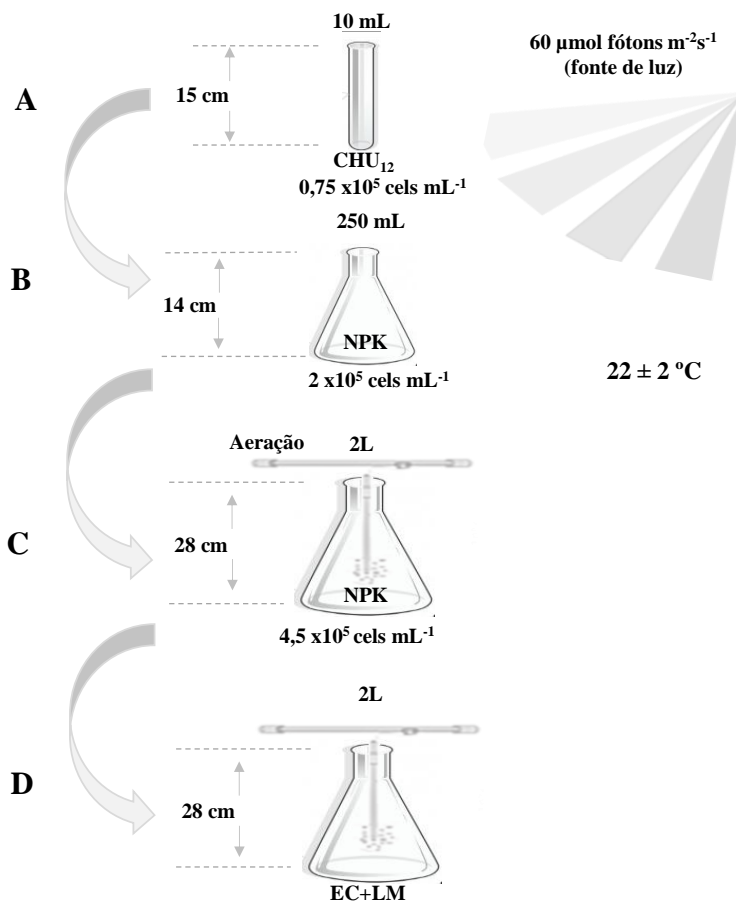


Figura 1. Diagrama esquemático do preparo da microalga *M. gracile* em volume de 2L, para o cultivo em meio misto de macrófita onde: A = Manutenção da cepa 10 mL em meio CHU₁₂; B = Cultivo inicial em 250 mL somente em meio NPK (20:5:20); C = Cultivo em meio NPK em volume de 2L; D = Experimento com a associação das macrófitas como meio de cultura, EC+LM = *Eichhornia crassipes* + *Lemna minor*.

O meio com extrato de macrófita utilizando as espécies *Eichhornia crassipes* e a *Lemna minor*, foi elaborado de acordo com o protocolo de cultivo baseado em Sipaúba-

Tavares et al. (2009). O experimento foi iniciado com 10 mL de volume contendo meio CHU₁₂, quando as culturas alcançaram a fase exponencial de crescimento (7 dias), aproximadamente 10 mL da amostra com densidade $0,75 \times 10^5$ célula mL⁻¹ foi transferida a um volume maior de 250 mL contendo o meio NPK (20:5:20). Novamente após atingir o sétimo dia de crescimento foi adicionada à 2 L contendo meio NPK com a densidade de 2×10^5 célula mL⁻¹. Após 7 dias de crescimento a cultura com densidade de aproximadamente $4,5 \times 10^5$ célula mL⁻¹ foi transferida para recipientes esterilizados de 2 L contendo o meio de cultura *Eicchornia crassipes* e *Lemna minor*. Foi adicionado ao meio vitamina do complexo B na taxa de 0,01gL⁻¹ (7mg – B₁; 7mg – B₂; 5mg – B₆; 33µg – B₁₂) mais vitamina H (0,01mg) (Figura 1).

As variáveis do meio de cultura como os compostos nitrogenados e fósforo total foram quantificados por espectrofotometria de acordo com a metodologia descrita em Koroleff (1976) e Golterman et al. (1978). A clorofila-a foi determinada extraindo os pigmentos com álcool 90% e quantificada em espectrofotômetro (663 e 750nm) e processada de acordo com a metodologia proposta por Nusch (1980). Condutividade, oxigênio dissolvido e pH do meio de cultura foram avaliados com auxílio de sonda multisensor YSI 556MPS. A biomassa seca foi determinada seguindo a metodologia proposta por Vollenweider (1974).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 abaixo mostra as variáveis físicas e químicas avaliadas durante cultivo da microalga *M. gracile*. A biomassa seca foi elevada crescendo ao longo do período experimental com o maior valor no 16º dia de crescimento ($0,5 \pm 0,02$ g L⁻¹). Isso reflete diretamente na clorofila-a que apresentou um padrão crescente de suas concentrações atingindo o maior pico ao redor do 16º dia de crescimento com $2,6 \pm 0,1$ mg L⁻¹ (Tabela 1). Esses resultados já demonstram a eficácia dessas plantas no desempenho de *M. gracile*. Elevados teores de clorofila-a e biomassa seca em meio de cultura contendo uma única

Realização

Apoio



VARIÁVEIS	TEMPO (DIAS)			
	4	8	12	16
°C	21,36±0,09	21,66±0,13	21,04±0,05	20,65±0,20
PH	8,83±0,08	8,71±0,07	7,64±0,05	8,81±0,06
COND	466±32	528±11	602±0,04	546±55
OD	7,58±0,12	8,90±0,20	8,84±17,95	8,33±0,13
NIT	4,52±0,5	5,13±0,07	4,16±0,6	4,07±0,4
FT	1,11±0,01	1,10±0,02	1,14±0,02	1,11±0,04
BS	0,14±0,01	0,20±0,01	0,30±0,02	0,50±0,02
CLOROFILA	0,5±0,09	1,1±0,1	1,8±0,8	2,7±0,1

°C – Temperatura; Cond – Condutividade (mS cm⁻¹); OD – Oxigênio dissolvido (mg L⁻¹); NIT – Nitrogênio total (mg L⁻¹); FT – Fósforo total (mg L⁻¹); BS – Biomassa seca (g L⁻¹); Clorofila – (mg L⁻¹).

espécie também foram elevados (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2018 a,b).

Níveis de nitrogênio e fósforo foram elevados no meio de cultura, principalmente o nitrogênio acima de 4,07±0,4 mg L⁻¹. Em geral o nitrogênio manteve-se similar nos diferentes dias de crescimento de *M. gracile*. O mesmo ocorreu com o fósforo, no entanto em concentrações bem diferentes ao redor de 1,10±0,02 mg L⁻¹, ao longo do período de cultivo (Tabela 1). Segundo Shilton et al. (2012) a remoção de fósforo pela microalga é devido ao crescimento de biomassa e o teor de fósforo na biomassa algal pode ser triplicado 1 a 3% de tomada luxuriante. Provavelmente, tal fato influenciou na menor concentração de fósforo no meio de cultura tornando elevada a biomassa seca.

O excesso de amônia causa a inibição do crescimento da alga (SOLETTO, et al., 2005), neste experimento os teores de nitrogênio foram elevados.

O fósforo tem grande importância para alga para realização de transferência de energia e a síntese de ácidos nucleicos, que fazem parte da formação do DNA, influenciando diretamente na composição da biomassa (REYNOLDS, 2006). Os nutrientes são assimilados pelas microalgas para geração de carboidrato, proteína, lipídios e outros produtos de interesse.

Realização

Apoio

Os teores de oxigênio dissolvido como também a temperatura não variou muito ao longo do período experimental pois foram fatores que estavam sob controle. Elevadas concentrações de condutividade acima de 466 ± 32 nS cm^{-1} estiveram associadas as altas concentrações de nutrientes no meio de cultura.

O pH foi alcalino ao longo do período experimental, variando de $7,64\pm 0,05$ a $8,83\pm 0,08$, sendo fundamental para o desenvolvimento desta microalga. A taxa de maior crescimento e assimilação dos nutrientes depende do pH, para a *M. gracile* o valor dessa variável fica na faixa de 5 e 9 (Kim et al., 2013). A quantidade de água do meio de cultura neste estudo foi totalmente sob controle e livre de contaminações. Assim, propicia um meio ideal para o crescimento da microalga.

CONCLUSÕES OU CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos estudos e resultados preliminares, foi observado que o meio de cultura misto com as macrófitas *Lemna minor* e *Eichhornia crassipes* demonstra eficiente para produção de biomassa da alga *Messastrum gracile*, e elevadas concentrações de nutrientes podem ser utilizados em outras vias metabólicas. Deve-se levar em consideração que o meio de cultura a base de macrófita possui condições como na produção de *M. gracile*.

AGRADECIMENTOS

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

REFERÊNCIAS

- ABALDE, J.; CID, Á.; FIDALGO, P.; TORRES, E.; HERRERO, C. **Microalgas: cultivo y aplicaciones**. Universidade da Coruña: Servicio de publicacións, n. 26, p. 2010, 1995.
- BEER, L.L.; BOYD, E.S.; PETERS, J.W.; POSEWITZ, M.C. **Engineering algae for biohydrogen and biofuel production**. Current Opinion in Biotechnology, v.20, n.3, p.264- 271, 2009
- DALAY, M. C.; IMAMOGLU, E.; DEMIREL, Z. **Agricultural Fertilizers as Economical Alternative for Cultivation of *Haematococcus pluvialis***. Journal of Microbiology and

Realização

Apoio

- Biotechnology. v. 17, n. 3, p. 393– 397, 2007.
- GOLTERMAN, H. L.; CLYMO, R. S.; OHNSTAD, M. A. M. **Methods for physical and chemical analysis of freshwater**. London: Blackwell Scientific, 213 p., 1978.
- KIM, S.; PARK, J.E.; CHO, Y.B.; HWANG, S.J. **Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions**. Bioresour. Technol. v. 144, p. 8–13, 2013.
- KOROLEFF, F. **Determination of ammonia**. In: GRASHOF, K. (ed.). Methods of seawater analysis. New York: Verlag Chemie Weinheim, 126-133 p., 1976.
- NASCIMENTO, E.C.R. **Microalgas: agentes naturais no processo de floculação e conhecimento de alunos sobre seu uso**. Dissertação de Mestrado. Universidade do Rio Grande do Norte, p. 61, 2019.
- NUSCH, E. A. **Comparison of different method for chlorophyll and phaeo-pigments determination**. Archivie Hydrobiologia, v. 14, p. 14-36, 1980.
- PÉREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F.M.E.; DE-BASHAN, L.E.; BASHAN Y. **Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products**. Water Research, v. 45, n. 1, p. 11-36, 2011.
- REYNOLDS C. S. **Ecology of Phytoplankton - Ecology, Biodiversity and Conservation**. Cambridge, 2006.
- SAHU, A.; SAHOO, S. K.; GIRI, S. S. **Efficacy of water hyacinth compost in nursery ponds for larval rearing of indian mayar carp, *Labeo rohita***. Bioresource of Technology, v. 85, p. 309-311, 2002.
- SHILTON, A.N.; POWELL, N.; GUIEYSSE, B. **Plant based phosphorus recovery from wastewater via algae and macrophytes**. Current opinion in biotechnology, v. 23, n. 6, p. 884-889, 2012.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H. **Uso racional da água em aquicultura**. Jaboticabal: Maria L. Brandel – ME, p. 190, 2013
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; BACHION, M.A. **Population growth and development of two species of Cladocera, *Moina micrura* and *Diaphanosoma birgei*, in laboratory**. Brazilian Journal of Biology, v. 62, p. 701 - 711, 2002.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; IBARRA, L.C.; FIORESI, T.B. ***Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korshikov (Chlorophyta) laboratory cultured in CHU₁₂ and macrophyte with NPK media**. Boletim do Instituto de Pesca, v. 35, n. 1, p. 111-118, 2009.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H., SEGALLI A. M. D. L., SCARDOELLI-TRUZZI B. **Aquatic Plants: Alternative medium for microalgae growth**. Annals of Aquaculture Research. v. 2, p. 1009, 2015.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; FLORÊNCIO, T.; SCARDOELLI-TRUZZI, B. **Aquaculture biological waste as culture medium to cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korshikov**. Brazilian Journal of Biology. v. 78, n. 03, p. 579-587, 2018 a.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; GALATTI-TEDESQUE, M.; MELO-SANTO, G.L.; SCARDOELLI-TRUZZI, B. **Macrophytes to improve the cultivation of *Ankistrodesmus gracilis***. Journal of Algal Biomass Utilization. v. 9, n. 1, p. 18-25, 2018 b.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. Editora Artmed. 3ª edição. Porto Alegre, p. 309- 332, 2004.
- SOLETTI, D.; BINAGHI, L.; LODI, A.; CARVALHO, JCM.; CONVERTI, A. **Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources**. Aquaculture, v. 243, n. 1-4, p. 217-224, 2005.
- VOLLENWEIDER, R.A.; TALLING, J.F.; WESTLAKE, D.F. **A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments**. Blackwell Scientific Pub., 1974.

Realização

Apoio