



Cultivo da microalga *Chlorella sorokiniana* em diversas concentrações de *Victoria amazonica*, enriquecido com fertilizante inorgânico (NPK) e sob diferentes temperaturas. Microalgae cultivation of *Chlorella sorokiniana* in different concentrations of *Victoria amazonica*, enriched with inorganic fertilizer (NPK) and at different temperatures.

Jocilene Braga dos Santos¹, [Erlei Cassiano Keppeler](#)^{2*}

¹ Universidade Federal do Acre, Curso do Bacharelado em Ciências Biológicas, *Campus* de Cruzeiro do Sul, Instituto da Biodiversidade, Laboratório de Análises de Água e Limnologia, Centro Multidisciplinar, Canela Fina, 69980-000, Cruzeiro do Sul, Estado Acre, Brasil.

² Universidade Federal do Acre, Centro Multidisciplinar, *Campus* de Cruzeiro do Sul, Instituto da Biodiversidade, Laboratório de Análises de Água e Limnologia, Canela Fina, 69980-000, Cruzeiro do Sul, Estado Acre, Brasil.

*Autor correspondente: E.C.K. (e-mail: erlei.keppeler@ufac.br).

Resumo

O gênero *Chlorella* tem potencial biotecnológico e se adequa à alta produção de biomassa por ser conhecida a sua tecnologia de cultivo em grande escala. Com o fim de definir as condições que melhor favorecem seu desenvolvimento visando à otimização dos cultivos para um maior crescimento algal, esta pesquisa tem como objetivo verificar se é diferente o crescimento celular em função de diferentes concentrações do extrato da macrófita *Victoria amazonica*, enriquecido com NPK inorgânico e sob diferentes temperaturas. Concluiu-se que, o substrato da macrófita aquática foi eficiente para o cultivo, representando um meio de baixo custo para a produção e manutenção do cultivo de *Chlorella sorokiniana*.

Palavras-chave: Crescimento. Macrófita. Tecnologia.

Abstract

The *Chlorella* genus has biotechnological potential and is suitable for high biomass production because of its large-scale cultivation technology. In order to define the conditions that best favor its development aiming to optimize crops for greater algal growth, this research aims to verify whether cell growth is different due to different concentrations of the macrophyte extract *Victoria amazonica*, enriched with NPK inorganic and under different temperatures. It was concluded that, the aquatic macrophyte substrate was efficient for cultivation, representing a low cost means for the production and maintenance of the cultivation of *Chlorella sorokiniana*.

Keywords: Growth. Macrophyte. Technology.

Introdução

O termo alga é empregado para denominar uma ampla diversidade de organismos, sua morfologia, fisiologia, reprodução e ecologia (BICUDO, MENEZES, 2006), sem raízes, caules e folhas (ANDERSEN, 2013).

As microalgas são pequenos organismos fotossintéticos que se encontram em águas salgada ou doce (ZORN et al., 2016). Abrangem seres unicelulares e multicelulares, com hábitos planctônicos e perifíticos, sendo que a maioria das microalgas (algas com dimensões microscópicas) têm hábitos planctônicos (LOURENÇO, 2006).

Elas são microrganismos heterogêneos, usualmente microscópicos, unicelulares, coloniais ou filamentosos, coloridos e geralmente fotoautotróficos, filogeneticamente, podem ser procarióticos ou eucarióticos (OLAIZOLA, 2003). Os seus requerimentos nutricionais relativamente simples e cuja biomassa pode ser empregada para obtenção de biocompostos, como suplemento alimentar humano, alimento animal ou fonte de biocombustíveis (ANDRADE; COSTA, 2008).

Microalgas são comumente utilizadas na aquicultura como ração para pós-larvas de moluscos, peixes e crustáceos, pois são fáceis de crescer (ARAÚJO et al., 2020). Elas são pequenas, crescem rapidamente, têm altos níveis de ácidos graxos e acumulam grandes quantidades de óleo, que pode ser extraído e convertido em biodiesel por meio de processos químicos (DERNER et al., 2006).

A microalga *Chlorella sorokiniana* é um microrganismo eucariota, pertencente ao maior grupo de algas verdes (Chlorophyta) (LOURENÇO, 2006). A morfologia celular pode ser esférica ou oval e reproduz-se assexuadamente por bipartição ou fissão binária (QIAO et al., 2009). A *Chlorella sorokiniana* tem sido extensivamente estudada em relação à sua fisiologia, genética e produção de biomassa lipídica alta (CHISTI, 2007). Pois, produz carotenoides de elevada importância para a indústria farmacêutica, como a luteína, violaxantina e zeaxantina, α -caroteno e β -caroteno (CORDERO et al., 2011).

O cultivo, em grande escala de algas, tem recebido atenção especial dada às suas características potenciais: ciclos de vida curtos, cultivo em água doce, salgada, salobra e águas residuais, uso de terras não cultiváveis, e o fato de não demandarem grandes áreas de produção (BHATNAGAR et al., 2010). Além disso, o cultivo de microalgas foi considerado uma estratégia de mitigação de gases de efeito estufa, na qual células movidas a energia solar capturam dióxido de carbono (CO_2) e o convertem em produtos químicos orgânicos (CHISTI, 2007). A necessidade de algas limpas e custo de produção baixo demanda as investigações sobre a resposta fisiológica das algas sob condições diferentes de crescimento (CHIA et al., 2013).

Nesse contexto, é muito importante a realização de estudos sobre o crescimento de *C. sorokiniana* em meio de cultura sob condições mixotróficas pois, essa alga oferece grande potencial na produção de biomassa renovável para aplicações de bioenergia (LI et al., 2014). Os objetivos deste trabalho consistiram em aproveitar os recursos naturais, como a macrófita aquática *Victoria amazonica* com o intuito de cultivar *Chlorella sorokiniana*, visando sua manutenção e produção em diferentes temperaturas. Para isso, foi necessário, avaliar o crescimento de algas sob diferentes concentrações de extrato da macrófita aquática, *Victoria amazonica*, observando as curvas da família das exponenciais típicas de populações de algas, resultantes de cada tratamento. Diante disso, foi necessário identificar o crescimento populacional utilizando diferentes extratos, usado na produção de biomassa de *Chlorella sorokiniana* que é também conhecida pelo potencial biotecnológico.

Material e métodos

A presente pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Análises de Água e Limnologia da Universidade Federal do Acre (UFAC) – *Campus* de Cruzeiro do Sul. O laboratório foi mantido em condições assépticas para manutenção de cepas de algas, repicagem e armazenamento de material estéril. Em fornecimento de determinada iluminação artificial (lâmpadas fluorescentes de 20 watts, cultivada em água destilada com o seu pH neutro; mantida sob aeração constante, feita por mini compressor de ar (Figura 1). A matriz celular da microalga *Chlorella sorokiniana* foi inoculada em quatro garrafas de plástico (PET) com capacidade de 2 litros, onde colocamos volume útil de 1.400ml de água destilada, em meio de diferentes concentrações da macrófita aquática (*Victoria amazonica*) coletada no Rio Crôa, com autorização mediante licença permanente de material biológico, expedida pelo SISBIO, sob o número 17919-2, de 30 de setembro de 2015. A macrófita foi moída usando liquidificador, enriquecido com fertilizante inorgânico (NPK). Posteriormente, foram pesadas as seguintes quantidades extratos: 2,5g, 5,0g e 10,0g onde cada quantidade determinou um tratamento nas temperaturas (20° e 30°C). Foi adicionado 20ml do conteúdo contendo a microalga em cada garrafa. Foi verificado, num intervalo de tempo de 24 horas a microalga *C. sorokiniana*, por um período constante de 8 dias (192 horas).



Figura 1 - Cultivo de *Chlorella sorokiniana*. Foto: Jocilene Braga dos Santos

A densidade celular foi expressa em número de células por mililitro de cultivo (células mL⁻¹). Com os dados experimentais de densidade celular, foram elaborados gráficos que representam as curvas de crescimentos da espécie em estudo, nos quais, plotou-se no eixo da ordenada o número de células. mL⁻¹ e no eixo da abcissa o tempo de cultivo em dia. A melhor curva exponencial foi ajustada por Levenberg-Marquardt.

Todos os dados quantificados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). A normalidade foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Preferencialmente, todas as variáveis analisadas deverão seguir distribuição normal. Após a verificação da significância da ANOVA as médias foram contadas utilizando o teste Tukey a 5% de probabilidade (ZAR, 2010). Os dados foram avaliados com auxílio do programa Lab fit (SILVA; SILVA, 2002) e do programa estatístico PAST (software PAleontological STatistics versão 3) (HAMMER, 2017).

Resultados e discussão

Os resultados no oitavo dia do crescimento da alga (Figura 2), revelaram que, houve diferença estatística significativa ($p < 0,01$) em todos os tratamentos, na temperatura de 20°C.

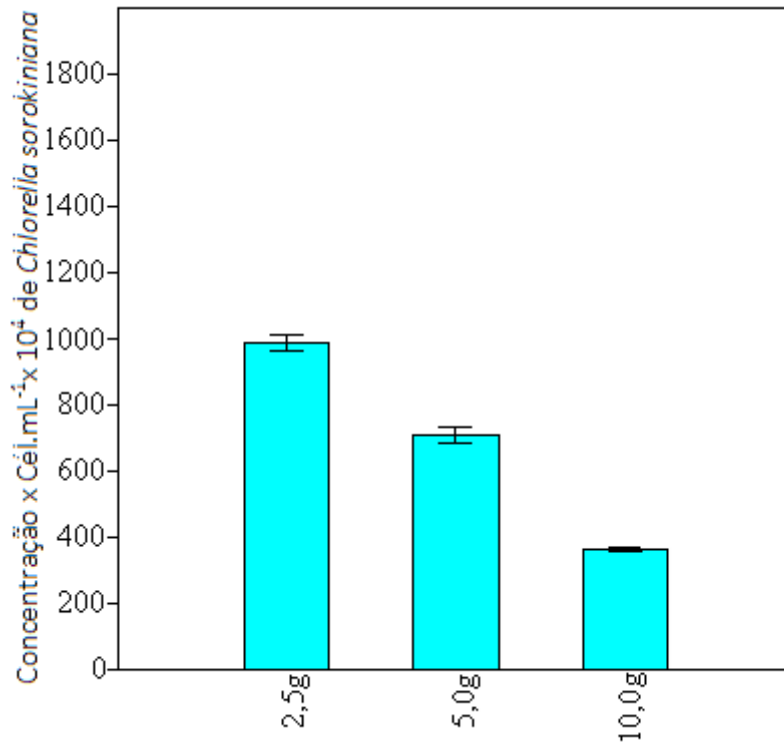


Figura 2 - Valores médios das concentrações no oitavo dia de crescimento algal, em três concentrações (2,5 g, 5,0 g, e 10,0 g) à temperatura de 20°C.

No oitavo dia do crescimento da alga, o resultado detectou que, houve diferença estatística significativa ($p < 0,01$) em todos os tratamentos, na temperatura de 30°C (Figura 3).

Quanto à concentração do substrato de macrófita, o extrato que proporcionou o melhor nível de crescimento para a *Chlorella sorokiniana* foi a de 2,5g de extrato de concentração, à temperatura de 30°C (Figura 4). Logo, quanto menor o substrato, maior foi o crescimento algal. Este extrato e temperatura, neste estudo, foram os mais indicados para cultivar a *Chlorella sorokiniana*, representando economia de recursos financeiros uma vez que esse meio representa um menor custo econômico, que o uso de reagentes, usado em outros meios, como por exemplo o tradicional meio de cultura f/2, descrito por Guillard (1975).

O cultivo da *Chlorella sorokiniana* apresentou uma curva exponencial de crescimento que é encontrada geralmente, para o crescimento, para este gênero. Este tipo de curva, da família das exponenciais que comumente ocorre em crescimento algal, também foi verificada pelos estudos realizados por Ansilago et al. (2016), Sipaíba-Tavares et al. (2018) e Brito (2020).

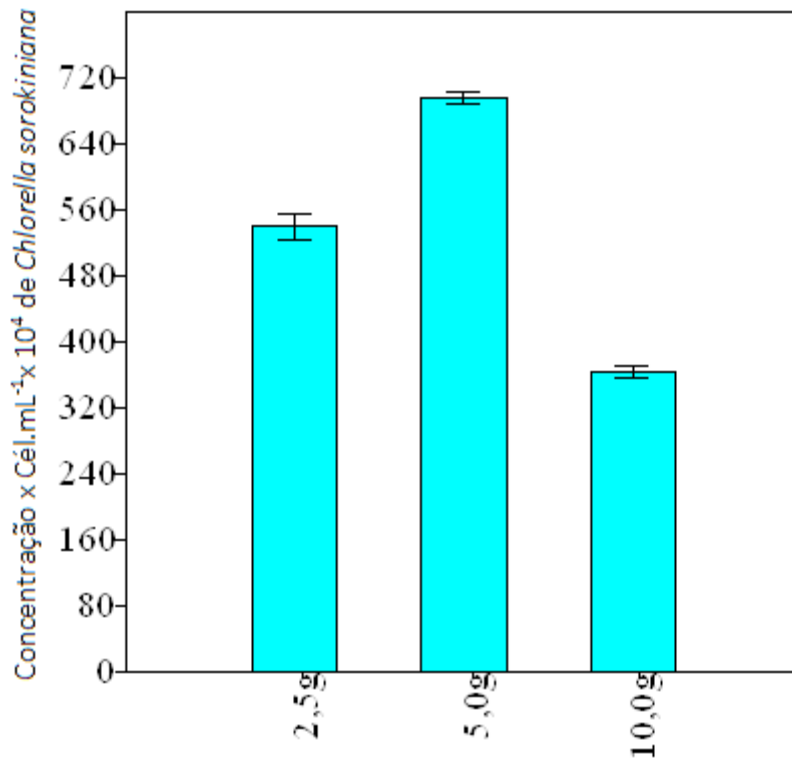


Figura 3 - Valores médios das concentrações no oitavo dia de crescimento algal, em três concentrações (2,5 g, 5,0 g e 10,0 g) à temperatura de 30°C.

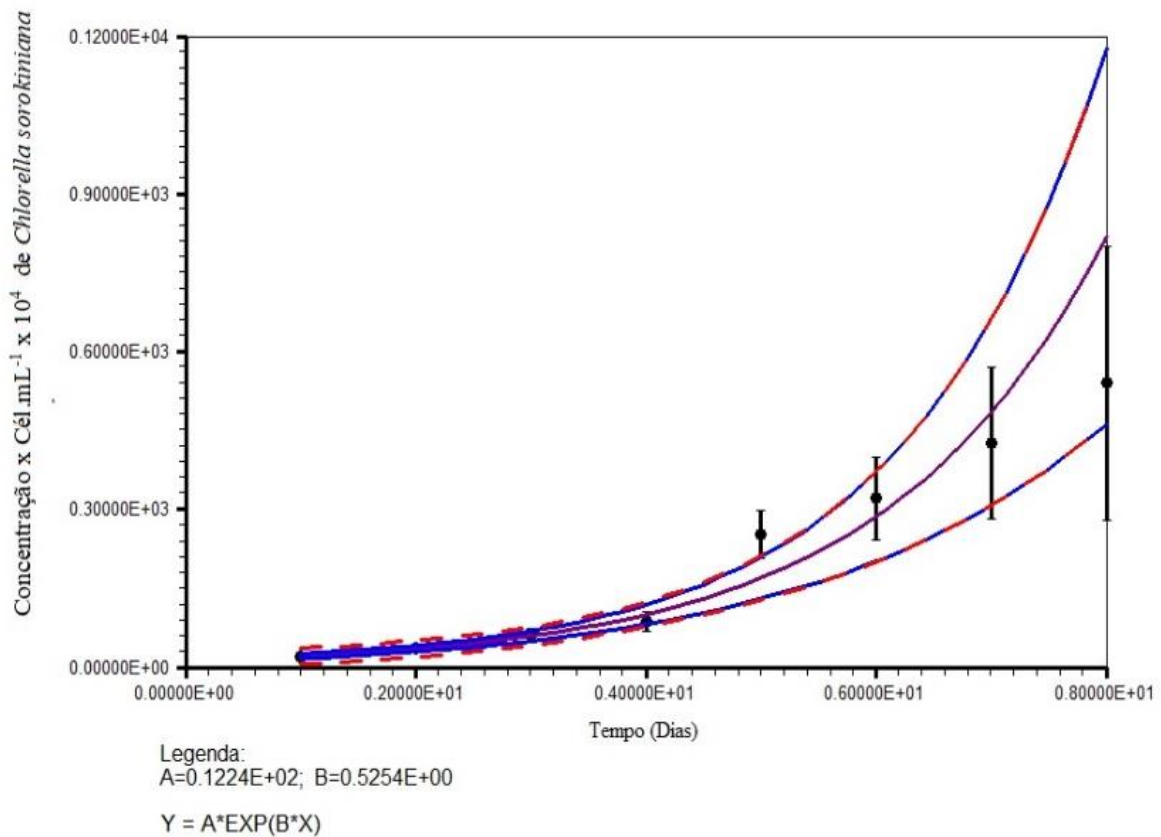


Figura 4 - Gráfico com barra de erros relativo ao ajuste de Levenberg-Marquardt, para a curva de crescimento do extrato de 2,5 g, à temperatura de 30°C. A linha central é a função ajustada, as linhas externas contínuas definem a faixa com 95,4% de confiança e as linhas externas tracejadas definem a faixa de predição dos pontos experimentais (com 95,4% de confiança).

Conclusão

Os dados da presente pesquisa permitiram concluir que, o substrato da macrófita aquática foi eficiente para o cultivo, representando um meio de baixo custo para manutenção do cultivo e para a produção de *Chlorella sorokiniana*, por serem vegetais que estão presentes em todos os tipos de corpos d'água.

Em geral, os resultados demonstraram o potencial que, recursos naturais, como macrófitas aquáticas, como fonte principal de matéria prima que pode ser manipulada para possibilitar o crescimento, especialmente quantidades de substrato e temperatura. Essa pesquisa, por fim, demonstrou alta eficiência no cultivo com substrato de macrófita aquática + NPK, sendo infinitamente as hipóteses existentes de recursos naturais que podem também servir para o crescimento de algas deste gênero.

Agradecimentos

À UFAC/PROPEG pela concessão da bolsa de Iniciação Científica anual, que contribuiu para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Centro Multidisciplinar pela estrutura básica laboratorial oferecida aos bolsistas de Iniciação Científica.

Conflitos de interesse

Não houve conflito de interesses dos autores.

Contribuição dos autores

Jocilene Braga dos Santos - experimento no laboratório e redação; Erlei Cassiano Keppeler - análise estatística, correção, revisão e padronização.

Referências bibliográficas

ANDERSEN, R. The Microalgal Cell. In: AMOS, R.; HU, Q. (Ed.). **Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology**. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, p. 3-20, 2013.

ANDRADE, M. da R.; COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 32, n. 5, p. 1551-1556, 2008.

<https://www.scielo.br/j/cagro/a/CgCHqnQbzbQ73KDZDdgjvhP/?lang=pt>

ANSILAGO, M.; OTTONELLI, F.; CARVALHO, E. M. de. Cultivo da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* em escala de bancada utilizando meio contaminado com metais pesados. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 21, n. 3, p. 603-608, 2016.

<https://www.scielo.br/j/esa/a/Kqb9cvRbzTcH59MFq7YCWfk/?lang=pt>

ARAÚJO, G. S.; LOPES, D. N. M.; SANTIAGO, C. da S.; SILVA, J. W. A. da; FERNANDES, F. A. N. Influence of nutrients on biomass and oil yield from microalgae *Chlorella vulgaris* for biodiesel production.

Revista Ciência Agronômica, v. 51, n. 1, e20165285, 2020.

<https://www.scielo.br/j/rca/a/yfrQKgsVJjKfdnbBY7BFP6g/abstract/?lang=en>

BHATNAGAR, A.; BHATNAGAR, M.; CHINNASAMY, S.; DAS, K. C. *Chlorella minutissima* - a promising fuel alga for cultivation in municipal wastewaters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1-8, p. 523-536, 2010. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19882116/>

BICUDO, C. E. de M.; MENEZES, M. **Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil: Chave para Identificação e Descrições**. Rima, 2ª ed. São Carlos: [s.n.], 2006, 554p.

BRITO, Y. J. V. de; LOPES, T. S. de A.; SANTOS, W. B.; TORQUATO, A. L.; LIMA, V. L. A. de; FERREIRA, W. B. The *Scenedesmus acuminatus* microalgae in culture media aiming at the production of biodiesel. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 15, n. 2, p. 202-207, 2020. <https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/view/6484>

CHIA, M. A.; LOMBARDI, A. T.; MELÃO, M. da G. Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, n. 4, p. 1427-1438, 2013. <https://www.scielo.br/j/aabc/a/4CsBSxtGVx7gfdvbW4jfvhQ/?lang=en>

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0734975007000262>

CORDERO, B. F.; OBRAZTSOVA, I.; COUSO, I.; LEON, R.; VARGAS, M. A.; RODRIGUEZ, H. Enhancement of lutein production in *Chlorella sorokiniana* (chlorophyta) by improvement of culture conditions and random mutagenesis. **Marine Drugs**, v. 9, n. 9, p. 1607-1624, 2011. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3225938/>

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, V. S. M.; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959-1967, 2006. <https://www.scielo.br/j/cr/a/PYnJkJOqkcTfNqmrCTthMdS/abstract/?lang=pt>

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L.; CHANLEY, M. H. (eds.). **Culture of marine invertebrate animal**. New York: Plenum Publishing, p. 29-60, 1975.

HAMMER, O. **PAleontological STatistics Version 3.15. Reference manual**. Natural History Museum. University of Oslo, 2017, 253p. <https://www.nhm.uio.no/english/research/infrastructure/past/>

LI, T.; ZHENG, Y.; YU, L.; CHEN, S. Mixotrophic cultivation of a *Chlorella sorokiniana* strain for enhanced biomass and lipid production. **Biomass and Bioenergy**, v. 66, p. 204-213, 2014. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0961953414002049?via%3Dihub>

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. Rima, São Carlos, 2019, 606p.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, n. 4-6, p. 459-466, 2003. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12919832/>

QIAO, H.; WANG, G.; ZHANG, X. Isolation and characterization of *Chlorella sorokiniana* GXNN01 (Chlorophyta) with the properties of heterotrophic and microaerobic growth. **Journal of Phycology**, v. 45, n. 5, p. 1153-1162, 2009. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1529-8817.2009.00736.x>

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; BARRA, L. C. C. I.; FIORESI, T. B. Laboratório de *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) cultivado em CHU12 e macrófita com meio NPK. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 1, p. 111-118, 2018. <https://www.pesca.sp.gov.br/boletim/index.php/bip/article/view/842>

SILVA, W. P. da; SILVA, C. P. da. **LAB Fit Curve Fitting Software**, 2002.

<http://www.labfit.net/index.htm>

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 5th Edition, Prentice-Hall/Pearson, Upper Saddle River, xiii, 2010.

ZORN, S. M. F. E.; GONÇALVES, B. C. M.; CANILHA, L.; GUIMARÃES, D. H. P.; SILVA, M. P.

Extração de óleo microalgal por solventes orgânicos: uma alternativa para a produção de biodiesel. **Revista de Pesquisa Científica** - UNIFATEA, v. 13, n. 24, p. 35-49, 2016.

<http://publicacoes.unifatea.edu.br/index.php/Janus/article/view/128>

Recebido em 31 de dezembro de 2021

Retornado para ajustes em 22 de fevereiro de 2022

Recebido com ajustes em 23 de fevereiro de 2022

Aceito em 24 de fevereiro de 2022