

Avaliação do efeito da forma de alimentação de NaNO_3 aos meios de cultivo no crescimento populacional de *Chlorella homosphaera*

Tâmi Soares de Sá¹, Izabella Antonioli¹, André Von-Held Soares^{1,2}, Fabio Barboza Passos^{1*}

¹Universidade Federal Fluminense – UFF

²Instituto Federal do Rio de Janeiro – IFRJ

*fbpassos@vm.uff.br

1. Introdução

As microalgas são a forma mais primitiva das plantas unicelulares que se alimentam com dióxido do carbono, e com utilização da luz solar transformam o carbono em açúcares e posteriormente em óleo, com alta eficiência, durante a fotossíntese. O teor de óleo (ou lipídios) em microalgas pode exceder 80% de peso de biomassa seca dependendo da espécie (METTING, 1996; SPOLAORE et al, 2006).

A temperatura, quantidade de nutrientes, luz, salinidade e disponibilidade são os principais fatores químicos e físicos que afetam o desenvolvimento das microalgas (RICHMOND, 2004).

Nesse trabalho foi avaliada a influência da concentração e da forma de alimentação de nitrato de sódio no meio de cultivo da microalga *Chlorella homosphaera*, bem como é apresentado um modelo simplificado de crescimento populacional com base nos melhores resultados obtidos.

2. Experimental

As cepas de *Chlorella homosphaera* foram obtidas do Laboratório de Cultivo de Microalgas, pertencente ao Departamento de Biologia Marinha da UFF, onde foram mantidas a 20° C, em erlenmeyer, com iluminação artificial e fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h no escuro numa Câmara de Germinação e fotoperíodo e Alternância de Temperatura. As microalgas foram repicadas em outros 4 erlenmeyers num novo meio de cultivo. Esse novo meio de cultivo usado para a manutenção da microalga foi WC modificado sem cianocobalamina e $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$, pois em estudos preliminares se evidenciou que a ausência de tais substâncias não afeta o crescimento populacional.

A cultura das microalgas partiu de um erlenmeyer onde todas as microalgas foram cultivadas com meio WC modificado contendo $85 \cdot 10^{-4}$ g/L de nitrato de sódio.

A metodologia de alimentação de NaNO_3 foi feita de modo a se comparar a quantidade total de NaNO_3 , a forma de alimentação e o impacto da interrupção do fornecimento de nitrato. Foram preparadas sete soluções de 100 ml conforme a tabela 1, em que inicialmente foram adicionados 10 ml de um meio de cultivo com concentração inicial aproximada de $1,68 \cdot 10^6$ células/ml. Assim a concentração inicial em todas as soluções foi de $1,68 \cdot 10^5$ cel/ml.

Tabela 1: Soluções com concentração de NaNO_3

Solução	Massa final de NaNO_3 (g)/ 10^{-4}	Massa diária (g/dia)/ 10^{-4}	Dias de alimentação
1	85	85	1
2	85	12	7
3	85	8,5	10
4	59,5	8,5	7
5	48	12	4
6	29,75	4,25	7
7	42,5	42,5	1

A análise populacional foi feita por contagem diária, por 10 dias, em câmara de Neubauer após imobilização e tingimento dos micro-organismos com uso de uma solução de ácido acético e tintura de iodo a 2%.

3. Resultados e discussão

3.1. Desempenho das culturas

A partir da contagem do número de células na câmara de Neubauer através do microscópio e cálculo das concentrações foram traçadas as curvas de crescimento populacional das microalgas *Chlorella homosphaera*, cultivadas nas sete soluções contendo diferentes quantidades de NaNO_3 . O desenvolvimento das populações de cada solução pode ser visto na figura 1.

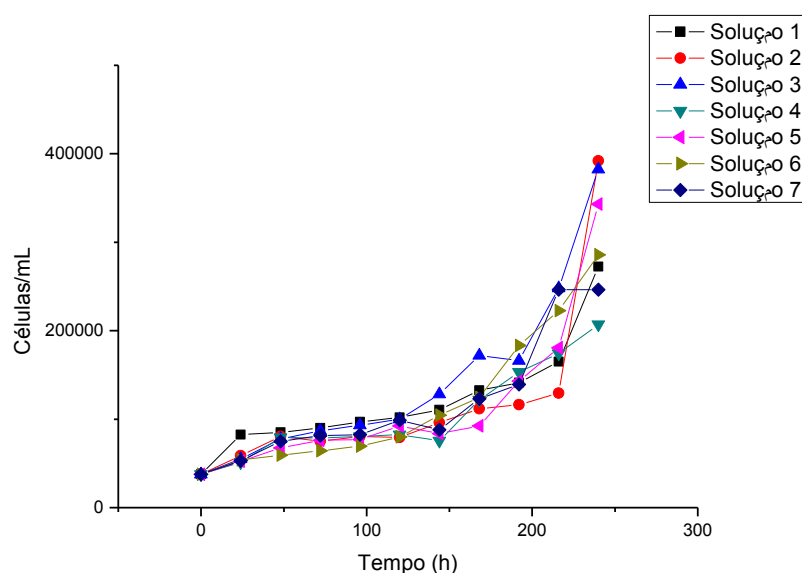


Figura 1: Crescimento populacional de *Chlorella homosphaera* em meios de cultivo de diferentes concentrações, de acordo com as soluções de 1 a 7.

Como esperado as microalgas apresentaram número de células finais diferentes em cada quantidade de nitrato de sódio utilizada em cada solução. Nos primeiros cinco dias o crescimento da *Chlorella homosphaera* em todas as soluções foi similar, independentemente da quantidade de nitrato, o que pode ser atribuído ao fato de que o número de células inicialmente no cultivo é pequeno o suficiente para não haver competição por nitrato.

De forma coerente com a esperada por uma competição por nutrientes, ao final de dez dias, a contagem celular revelou um menor número de indivíduos nas soluções com menores quantidades de nitrato de sódio, enquanto o número de células foi maior em maior quantidade de nitrato.

A figura 2 mostra com mais detalhe as soluções 1, 2 e 3, a fim de que as mesmas sejam comparadas. Ao final do período estabelecido para contagem, pôde-se observar que, apesar das quantidades finais de nitrato de sódio serem as mesmas para as soluções 1, 2 e 3, as mesmas apresentaram, ao longo do período e ao final da contagem, populações diferentes, devendo-se notar que a alimentação contínua ou em parcelas de NaNO_3 , ao invés de uma alimentação batelada, favorece a multiplicação celular mesmo na fase *lag*. Evidência clara disso é o fato de que as soluções 1 e 3, em que a alimentação de NaNO_3 foi feita de modo contínuo, mostraram um melhor desempenho em relação à solução 2, em que houve uma alimentação batelada.

O melhor desempenho observado ocorreu na solução 3 em que NaNO_3 foi alimentado ao sistema diariamente, demonstrando um incremento em torno de 500 % do número de células, em relação ao número inicial.

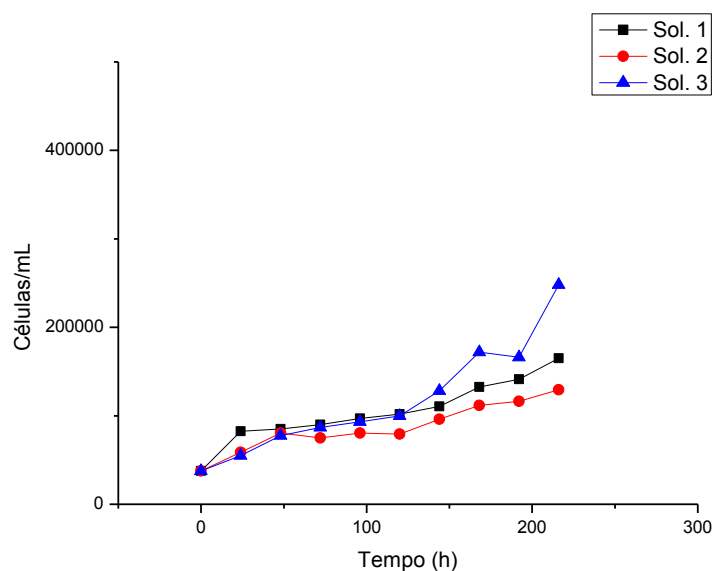


Figura 2: comparação entre o desempenho do crescimento de *Chlorella homosphaera* nas soluções 1, 2 e 3.

3.2. Modelagem simplificada do crescimento de *Chlorella homosphaera*

De acordo com os dados obtidos para o crescimento populacional da solução 3, foi possível propor um modelo simplificado de crescimento populacional para *Chlorella homosphaera*.

Como pode ser visto da figura 1, o impacto da concentração de NO_3^- disponível sobre o crescimento do número de células só pode ser constatado a partir do sexto dia de alimentação.

Tomando os resultados da solução 3 como os mais favoráveis, é possível propor um modelo cinético simplificado para o crescimento da população de algas, com base numa relação proporcional entre a taxa de crescimento e o número de células (LIN et al, 2000). Assim:

$$\frac{dx}{dt} = \mu \cdot x \quad (1)$$

Para que μ descreva de maneira apropriada o comportamento da cultura, deve-se incluir como uma de suas variáveis o tempo da fase *lag*, t_L , após o qual o crescimento exponencial predomina, decaindo, no entanto, após o crescimento linear. Uma forma adequada para μ pode ser:

$$\mu = \mu_{\max} (1 - e^{-t/t_L}) \quad (2)$$

onde μ_{\max} é a taxa de crescimento máximo. O tempo da fase *lag* pode ser determinado pela intersecção entre a fase linear e a abscissa. De acordo com os dados obtidos para a Solução 1, $t_L = 157$ h.

Após substituição da expressão (2) em (1) e integração a partir de $t = 0$ a expressão geral do modelo pode ser dada por:

$$\ln(x/x_0) = \mu_{\max} (t - t_L + t_L e^{-t/t_L}) \quad (3)$$

Aplicando o método de mínimos quadrados com as manipulações algébricas adequadas, encontra-se $\mu_{\max} = 0,0144 \text{ h}^{-1}$, com $R^2 = 0,963$, para a solução 3, o que indica boa concordância entre modelo e os dados experimentais.

4. Conclusão

Com a realização desse trabalho foi possível verificar que a alimentação fracionada de NaNO_3 à microalga *Chlorella homosphaera* é preferencial em relação a preparação de um meio já contendo a quantidade total de NaNO_3 .

O modelo matemático descreve de modo consistente o crescimento populacional e é possível que um modelo mais completo seja proposto que leve em conta a dependência da concentração de nitrato no crescimento, considerando concentrações maiores de NaNO_3 .

Não existe efeito significativo da concentração de NaNO_3 no crescimento populacional antes de 6 dias de cultivo, o que pode ser atribuído à existência de um número muito baixo de células sem que haja competição por nutrientes.

5. Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao Prof. Sérgio Lourenço do Laboratório de Cultivo de Microalgas, da UFF, e à CAPES pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

6. Referências

LIN, J.; LEE, S.M.; LEE, H.J.; KOO, Y.M. Modeling of Typical Microbial Cell Growth in Batch Culture. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 5: 382-385 (2000).

METTING F.B. Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology* 17:477-89 (1996).

RICHMOND, A. *Handbook of microalgal mass culture*. Boston: CRC Press (2004).

SPOLAORE P, JOANNIS-CASSAN C, DURAN E, ISAMBERT A. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101:87-96 (2006).