

ADIÇÃO DE NaNO_3 EM ETAPAS NO CULTIVO DA MICROALGA *Chlorella* sp.

A. JARENKOW¹, E. V. STECKERT², G. ROMAN², A.L. CHAGAS², R. RECH², N.R. MARCÍLIO¹

¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Engenharia Química

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência de Tecnologia de Alimentos

E-mail para contato: andre.jarenkow@gmail.com; rech@ufrgs.br; nilson@enq.ufrgs.br

RESUMO – Microalgas são organismos unicelulares com a capacidade de transformar gás carbônico e luz em matéria orgânica como pigmentos e lipídeos. Dentre os macronutrientes necessários para o crescimento das microalgas, está o nitrato, o qual está diretamente associado à produção de biomassa e de lipídeos. Neste trabalho foi estudado o efeito da adição de NaNO_3 em etapas no cultivo da microalga *Chlorella* sp. Os cultivos foram realizados em fotobiorreatores de placa tipo airlift, tendo como meio de cultivo base Guillard f/2, com uma quantidade predefinida de 300 mg L^{-1} de NaNO_3 , adicionados em etapas (1 x 300, 2 x 150, 3 x 100 ou 5 x 60). A maior concentração de biomassa final foi obtida na adição em três etapas ($1,86 \text{ g L}^{-1}$) e o maior conteúdo de lipídeos na biomassa seca foi obtido adição de NaNO_3 em uma etapa (6,02 %). A produtividade de lipídeos, porém, foi maior no experimento em que a adição de NaNO_3 ocorreu em duas etapas ($10,9 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$).

1 INTRODUÇÃO

Hoje em dia é sabido que ao passo que a humanidade evolui, as emissões de gases e poluentes na atmosfera aumentam na mesma medida. Novas tecnologias estão sendo testadas para tentar diminuir o impacto ambiental da nossa extração de bens da Terra, uma delas é a utilização de microalgas como mecanismo de sequestro de CO_2 da atmosfera, redução de poluentes de efluentes industriais e produção de biodiesel.

As microalgas têm alta capacidade de absorção de CO_2 e de nitrogênio e fosfato dissolvidos em água, tornando-as ideais para tratamento biológico de efluentes industriais. Elas podem se tornar bastante rentáveis, pois algumas espécies produzem compostos de alto valor agregado, como pigmentos, lipídeos, vitaminas e minerais. Muitas já são comercializadas como suplemento alimentar, sendo produzidas em larga escala em reatores abertos. O uso de sistemas fechados, como fotobiorreatores, tem uma maior produtividade e controle de parâmetros, porém, são inviáveis economicamente por enquanto. Muitos trabalhos estão focados em tornar este tipo de cultivo rentável, procurando melhores espécies e parâmetros otimizados de crescimento.

No presente trabalho, foi utilizado um fotobiorreator fechado do tipo *airlift* para estudar as diferentes condições de cultivo em relação ao macronutriente nitrogênio e sua influência no metabolismo da microalga *Chlorella* sp., caracterizando suas mudanças em relação à biomassa produzida e ao acúmulo de lipídeos totais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microalga e meio de cultivo

Neste trabalho, foi utilizada a microalga *Chlorella* sp, cuja cepa foi cedida pelo professor Sérgio Lourenço do Laboratório de Fisiologia e Cultivo de Algas do Departamento de Biologia Marinha da Universidade Federal Fluminense.

O meio de cultivo base utilizado é o meio Guillard - “f1/2” (LOURENÇO, 2006) modificado, utilizando água do mar artificial contendo (por litro): 34 g de sal marinho (Red Sea), 1 mL de solução de de fosfato de sódio (5 g L^{-1}), 1 mL de solução padrão de silicato de sódio (30 g L^{-1}), 1 mL de solução de metais-traço, 1 mL de solução de vitaminas e 1 mL de solução-tampão de pH. A solução de metais-traço contém (por litro): 9,8 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 22 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 180 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 6,3 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4,36 g de Na_2EDTA e 3,15 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. A solução de vitaminas contém (por litro): 100 mg de tiamina, 0,5 mg de cianocobalamina e 0,5 mg de biotina. Em cada cultivo adicionou-se NaNO_3 conforme a quantidade definida para cada experimento. A solução tampão, utilizada para manter o pH entre 7,5 e 8,5, foi feita com 50 g de TRIS, aproximadamente 30 mL de ácido clorídrico para ajustar o pH em valor de 7,1 a 7,3 e água destilada, sendo o volume total da solução de 200 mL.

O meio foi esterilizado em autoclave e as soluções estoque foram adicionadas depois para evitar precipitação ou degradação térmica.

2.2 Acompanhamento do crescimento das microalgas

O crescimento das algas foi monitorado através de medida de densidade ótica da cultura a 750 nm com espectrofotômetro (Amersham Biosciences modelo Ultrospec 3100 pro) e relacionada com biomassa por medida de peso-seco. A curva padrão da biomassa relacionada com a densidade ótica para *Chlorella* sp foi realizada previamente aos experimentos.

Alíquotas de aproximadamente 2 mL para a medida de crescimento eram coletadas duas a vezes ao dia, com intervalos de aproximadamente 6 h entre cada uma, totalizando 12 pontos. O volume total perdido nas coletas pode ser desconsiderado, uma que representa cerca de menos de 1,0 % do volume do reator.

2.3 Cultivo em fotobiorreator

Neste trabalho, foram realizados experimentos em fotobiorreatores do tipo *air-lift* com loop externo feitos de acrílico, cujo volume útil é de 2,50 L; também possuem uma camisa interna para a troca de calor com o banho termostático para o controle da temperatura do fotobiorreator, mantida a 28 °C para o cultivo. As dimensões úteis externas do reator são as seguintes: altura, 450 mm; largura, 150 mm; profundidade, 79 mm; como mostra a Figura 1.

A microalga foi pré-inoculada em frascos Erlenmeyer de 500 mL, sendo utilizados 10 mL de cultura estoque da microalga e 100 mL de meio de cultivo, e colocadas em estufa rotatória com agitação de 90 rpm e temperatura e 30 °C com iluminação constante por lâmpadas eletrônicas totalizando 64 W (aproximadamente 2,5 klx). Após 7 dias, foram adicionados mais 100 mL de meio de cultivo e o cultivo foi mantido por mais 7 dias. Para a inoculação dos biorreatores, o conteúdo dos frascos Erlenmeyer foi homogeneizado em um recipiente estéril, a fim de erradicar variações devido à diferença no crescimento entre as microalgas na estufa rotatória.

A assepsia dos biorreatores foi realizada com uma solução de 5 mL L⁻¹ de solução comercial de hipoclorito de sódio. Após 15 min, o cloro ativo foi neutralizado com 2,5 mL L⁻¹ de solução de tiosulfato de sódio 250 g L⁻¹. Essa água de lavagem foi descartada e os meios de cultivo foram colocados nos reatores.

Uma corrente de ar comprimido filtrado com membrana de 0,22 µm (Midisart®2000 da Sartorius Stedim Biotech) foi distribuída e medida por rotâmetros individuais para cada reator com vazão de 1,0 L min⁻¹. Os filtros de ar foram usados para que possíveis sujeiras presentes na tubulação não contaminassem o cultivo.

Todos os cultivos foram suplementados com 1,0 mL L⁻¹ de cada uma das soluções estoque de nutrientes (fosfato, solução de metais-traço e vitaminas) diariamente para garantir que não haveria limitação do crescimento devido à falta dos mesmos.

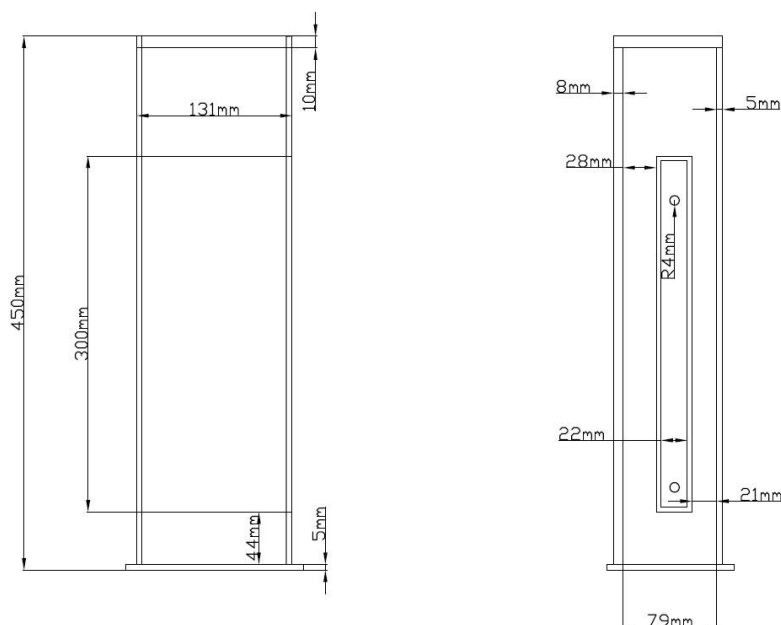


Figura 1 - Vista lateral do fotobiorreator utilizado (KOCHEM et al., 2014)

2.4 Influência da adição de NaNO_3 em etapas

Foram definidos quatro tempos diferentes de adição do sal NaNO_3 , de acordo com a Tabela 1. A adição de NaNO_3 foi realizada através da adição de um volume adequado de solução-padrão de NaNO_3 (75 g L^{-1})

Tabela 1 - Planejamento experimental para adição de NaNO_3 .

	Tempo (h)					Concentração adicionada de NaNO_3 (mg L^{-1})
	0	24	48	72	96	
$1 \times 300 \text{ mg L}^{-1}$	300	0	0	0	0	
$2 \times 150 \text{ mg L}^{-1}$	150	0	0	150	0	
$3 \times 100 \text{ mg L}^{-1}$	100	0	100	0	100	
$5 \times 60 \text{ mg L}^{-1}$	60	60	60	60	60	

2.5 Análises

Durante os cultivos, uma alíquota de aproximadamente 2 mL foi retirada diariamente de cada um dos reatores e centrifugada a aproximadamente $5\,000 \times g$ durante 5 min. O sobrenadante foi guardado e congelado, assim como o as microalgas precipitadas.

Extração de lipídeos via Bligh e Dyer (BLIGH; DYER, 1959)

A extração de lipídeos foi realizada pós-colheita, com a biomassa liofilizada. Para a quantificação de lipídeos, pesou-se aproximadamente 1,0 g de amostra liofilizada de microalga, e, em um vidro fechado, colocou-se também 20 mL de metanol, 10 mL de clorofórmio e 8 mL de água. A solução foi agitada por 20 min em agitador magnético. Após, mais 10 mL de metanol e uma solução 10 % em peso de sulfato de sódio e água e a agitação é continuada por mais 2 min. A solução é então vertida em um funil de separação, dentro do qual, as duas fases (clorofórmio contendo lipídeos e metanol e água) são separadas. A parte de baixo é o clorofórmio coletada e, a ela, são adicionados mais 1 g de sulfato de sódio anidro. A solução é então filtrada e 5 mL são colocados em um béquer previamente tarado e a solução é evaporada em estufa. As análises foram feitas em duplicata. Por diferença analítica é calculado o teor de lipídeos na amostra, como mostra a equação (1):

$$\% \text{ lipídeos} = 100 \frac{p \times 4}{g} \quad (1)$$

Onde: p é o peso dos lipídeos (g) contido em 5 mL e g é o peso da amostra (g).

Medida da concentração do íon nitrato

A análise de nitrogênio foi preparada conforme a metodologia desenvolvida por Cataldo *et al* (1975).

Uma alíquota de 0,25 mL de amostra do sobrenadante do fotobiorreator foi colocada em um frasco âmbar, junto com 0,8 mL de uma solução 5 % de ácido salicílico em ácido sulfúrico concentrado. Após 20 min, foram adicionados 19 mL de uma solução 2 mol L⁻¹ para elevar o pH acima de 12. Em temperatura ambiente, as amostras foram medidas em espectrofotômetro a 410 nm e comparadas a uma curva padrão realizada diariamente com uma solução de concentração conhecida do íon nitrato (N-NO₃).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Figura 2, são mostradas as curvas de crescimento para essas condições. Todas as curvas apresentaram comportamentos muito semelhantes, entrando em estado estacionário em aproximadamente 175 h, e com maior concentração final de biomassa naquelas condições em que o NaNO₃ foi adicionado em mais vezes. Porém, não houve diferença significativa entre eles segundo o teste das médias de Tukey (Tabela 2).

A Figura 3 mostra as curvas de consumo do nitrato para o experimento. As curvas possuem um comportamento semelhante, com algumas alterações devido à adição de NaNO₃, que eleva a concentração, durante o cultivo. Os valores de concentração de nitrato são próximos no final, estabilizando na fase estacionária de crescimento da microalga.

A Figura 4 apresenta os valores de quantidade de lipídeos em biomassa seca dos diferentes cultivos do experimento. Embora não haja diferença significativa entre os resultados (Tabela 2), nota-se uma tendência a diminuir a quantidade de lipídeos quando o NaNO₃ é adicionado em um maior número de etapas. Este comportamento pode ser explicado pela mesma razão do acúmulo de lipídeos no experimento anterior; a microalga tende a produzir substâncias de

armazenamento de energia, como lipídeos. Quando o NaNO_3 é adicionado em várias vezes, a taxa de absorção de nitrato permanece constante, não alterando o metabolismo da microalga, porém, quando o nutriente é totalmente consumido e não há reposição, o acúmulo de lipídeos ocorre.

Feng *et al* (2011) realizaram um trabalho no qual NaNO_3 era repostado em intervalos diferentes ao cultivo de *Isochrysis zhangjiangensis*, a fim de avaliar como isso afetaria o crescimento e a produção de lipídeos na microalga. Seus resultados foram diferentes dos obtidos nesse trabalho, uma vez que a quantidade de lipídeos aumentava à medida que aumentava a frequência de adição de NaNO_3 . Os autores concluíram que a microalga em questão é uma exceção à regra. No mesmo trabalho, foi realizado um experimento com a microalga *Chlorella pyrenoidosa*, nas mesmas condições, e o resultado foi similar ao obtido neste experimento.

A Tabela 2 mostra os valores de produtividade lipídica das condições de cultivo utilizadas no experimento. Percebe-se que existe um equilíbrio nas proporções de concentração de biomassa e quantidade de lipídeos, uma relação inversamente proporcional, conforme a literatura.

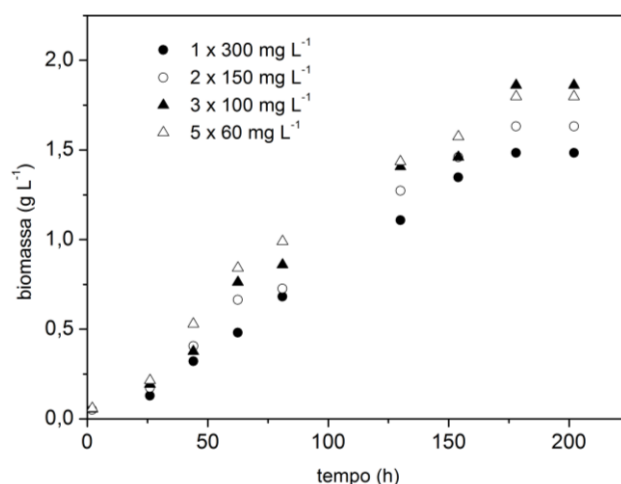


Figura 2 - Curva de crescimento da *Chlorella* sp. com adição de NaNO_3 em etapas.

Tabela 2 - Produtividade de lipídeos e biomassa de *Chlorella* sp. com adição de NaNO_3 em etapas.

Adição de nitrato	Biomassa final (g L^{-1})	Lipídeos (%)	Produtividade de lipídeos ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$)	Produtividade biomassa ($\text{mg L}^{-1} \text{d}^{-1}$)
1 x 300 mg L^{-1}	1,53 ^a	6,02 ± 0,52 ^a	11,0 ± 0,9 ^a	182 ± 24,8 ^a
2 x 150 mg L^{-1}	1,68 ^a	5,61 ± 1,47 ^a	11,2 ± 2,9 ^a	200 ± 61,2 ^a
3 x 100 mg L^{-1}	1,92 ^a	4,18 ± 0,94 ^a	9,6 ± 2,1 ^a	228 ± 34,8 ^a
5 x 60 mg L^{-1}	1,86 ^a	4,80 ± 0,47 ^a	10,6 ± 1,0 ^a	220 ± 31,2 ^a

* Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

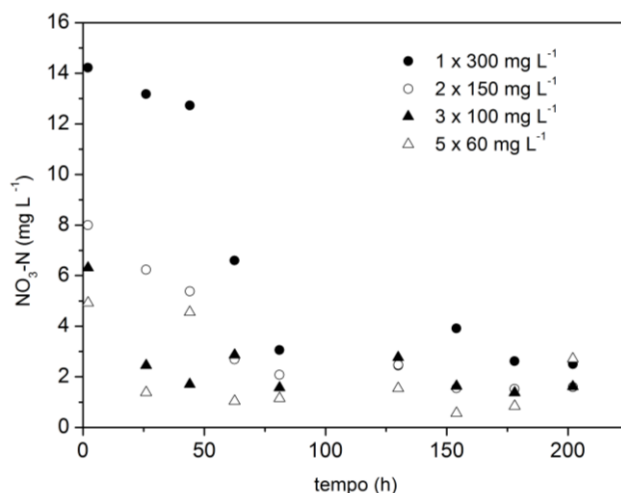


Figura 3 - Curva de consumo do íon nitrato em *Chlorella* sp. com adição de NaNO₃ em etapas.

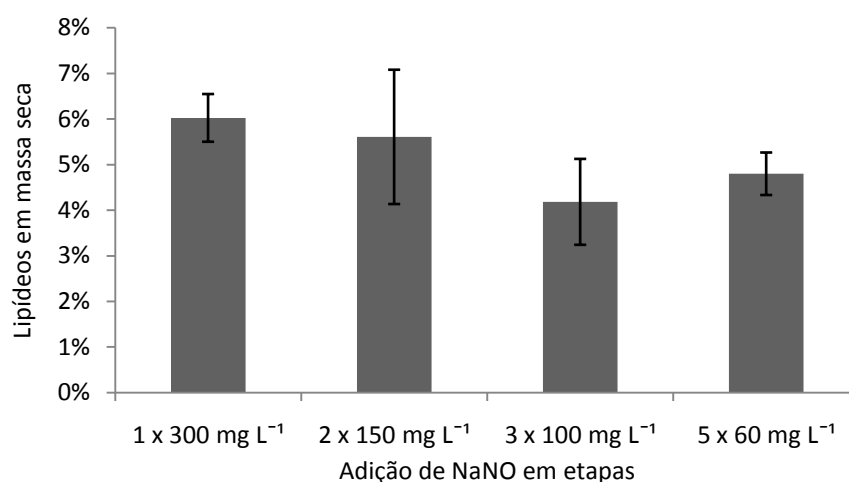


Figura 4 - Quantidade de lipídeos em biomassa seca de *Chlorella* sp. com adição de NaNO₃ em etapas.

4 CONCLUSÃO

Após a realização do trabalho, pode-se concluir que, ao adicionar NaNO₃ em etapas, os melhores resultados obtidos para o acúmulo de lipídeos foram para adição em uma vez, visto que a concentração de biomassa final foi de 1,53 g L⁻¹, concentração de lipídeos em biomassa seca de 6,02 % e produtividade lipídica de 11,0 mg L⁻¹. Porém, não havendo diferença significativa entre os parâmetros testados.

5 REFERÊNCIAS

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37, p. 911–917, 1959.

CATALDO, D. A. et al. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v. 6, n. 1, p. 71–80, jan. 1975.

FENG, D. et al. Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyta) by nitrogen supplement. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 12, p. 6710–6716, jun. 2011.

KOCHEM, L. H. et al. Characterization of a Novel Flat-Panel Airlift Photobioreactor With an Internal Heat Exchanger. *Chemical Engineering & Technology*, v. 37, n. 1, p. 59–64, 2014.

LOURENÇO, S. O. *Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações*. São Carlos, SP: RiMa, 2006.