

## TEOR LIPÍDICO DE DUAS ESPÉCIES DE MICROALGAS CULTIVADAS EM RESÍDUO SUÍNO BIODIGERIDO

### **Iara Cintra de Arruda Gatti<sup>(1)</sup>**

Pesquisadora do Projeto Microalgas (Convênio IAPAR/FAPEAGRO/COPEL), Bacharel em Química pela Universidade Estadual de Londrina, Mestre e Doutora em Agronomia pela Universidade Estadual de Londrina.

### **Patrícia Cristina Gomes**

Bióloga, Dr<sup>a</sup>. em Zootecnia

### **Graziela Moraes de Cesare Barbosa**

Engenheira Agrícola, Dr<sup>a</sup>. em Agronomia

### **Mario Miyazawa**

Químico, Dr. em Química Analítica

### **Antonio Costa**

Engenheira Agrônomo, Dr. em Agronomia

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Rodovia Celso Garcia Cid, Km 375, Bairro Três Marcos, Londrina/Paraná, CEP 86.047-912. Fone: (43) 3376-2000. e-mail: [iaracgatti@iapar.br](mailto:iaracgatti@iapar.br)

### **RESUMO**

As microalgas tem sido tema de vários estudos devido sua importância nutricional, econômica e ecológica. Apresentam alto conteúdo lipídico em suas células podendo ser de grande importância no mercado de biocombustíveis. O custo de sua produção quando cultivada em meios comerciais oneram sua produção. A utilização de resíduos agroindustriais seria uma opção barata e ecologicamente viável. Este trabalho teve como objetivo Determinar a concentração de lipídios em duas microalgas: *Chlorella minutissima* e BIOD A (microalga isolada do próprio dejetos) cultivadas em diferentes concentrações de dejetos suíno biodigerido. O experimento foi desenvolvido em Laboratório de Microbiologia do Solo do Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR. Os microrganismos utilizados foram a microalga *Chlorella minutissima*, proveniente de uma coleção mantida na Universidade do Texas, EUA e outra isolada do resíduo suíno biodigerido mantidas em meio BBM, em pH 6,8. O resíduo suíno biodigerido (RSB) foi proveniente de uma granja de ciclo completo e armazenado em biodigestores. As condições de cultivo foram: temperatura constante de 27°C, com fotoperíodo 12 h/12 h (claro/escuro) e iluminação proveniente de quatro lâmpadas de 65 W. os meios de cultivo utilizados foram “meio BBM” ou a mistura “água autoclavada + RSB filtrado e autoclavado”, constituindo os seguintes tratamentos: N25 - RSB na concentração de 25% de N em relação ao meio BBM; N50 – RSB na concentração de 50% de N em relação ao meio BBM; N75 – RSB na concentração de 75% de N em relação ao meio BBM; N100 – RSB na concentração de 100% de N em relação ao meio BBM; BBM - meio *Bold Basal Medium*. A cada três dias foi retirado uma alíquota de 2 mL de cada amostra, a fim de verificar o pH e a contagem de células. Ao final do experimento foi determinado o lipídio total. O pH máximo foi obtido no nono dia para as duas microalgas. Para ambas as microalgas o maior número de células encontrado foi para o tratamento mais concentrado com dejetos suíno. A microalga BIOD A produziu maior concentração de lipídio no meio sintético BBM, e para *C. minutissima* a melhor concentração de lipídio foi obtida nos tratamentos N75, N50, N25 que não diferiram estatisticamente entre si. Sendo assim, este trabalho mostrou que o resíduo suíno biodigerido pode ser utilizado como fonte de nutriente para o cultivo de microalga em substituição ao meio comercial, minimizando os custos de cultivo sem interferir na produção de lipídios.

**PALAVRAS-CHAVE:** biocombustível, *Chorella minutissima*, fluorescência, Neubauer, nitrogênio

### **INTRODUÇÃO**

As microalgas têm sido estudadas em pesquisas biotecnológicas devido a sua importância nutricional, econômica e ecológica (COSTA et al., 2006).

Seu cultivo apresenta diversas vantagens, tais como, a simplicidade de nutrientes necessários para sua produção, a duplicação da biomassa em um curto período de tempo e a possibilidade de manipular suas condições de cultivo, de modo a aumentar a produção de um metabólito específico, como o lipídio (COSTA et al., 2006).

O conteúdo lipídico em microalgas pode ser influenciado por diversos fatores físico-químicos, como luz, temperatura, concentração da fonte de nitrogênio e concentração de dióxido de carbono. Segundo ILLMAN et al. (2000), baixas concentrações de nitrogênio são consideradas condições ótimas para o aumento da produção de lipídios nas cepas de *Chlorella*.

Os óleos encontrados nas microalgas possuem características físico-químicas similares aos de óleos vegetais, evidenciando seu potencial para a produção de biodiesel. O cultivo de microalga pode ser realizado em terras desérticas, com baixo valor econômico para cultivo de espécies alimentares e com alta irradiação solar. A extração do óleo é simples e pode ser realizada com hexano, exatamente como em indústria alimentícia.

Para reduzir custos com meios de cultivo para desenvolvimento de microalgas, pesquisas têm sido conduzidas na tentativa de utilização de resíduos agroindustriais como meios de cultura alternativos. Dessa forma, a utilização de resíduo suíno biodigerido, abundante na agropecuária regional, de baixo valor econômico, para substituir os meios de cultivos artificiais de alto custo e ao mesmo tempo mantendo a linha da sustentabilidade.

## OBJETIVO

Determinar a concentração de lipídios em duas microalgas: *Chlorella minutissima* e BIOD A (microalga isolada do próprio dejetos) cultivadas em diferentes concentrações de dejetos suíno biodigerido.

## METODOLOGIA UTILIZADA

O experimento foi desenvolvido em câmara de crescimento, situada no Laboratório de Microbiologia do Solo do Instituto Agrônomo do Paraná – IAPAR, Londrina, PR, no período de 22 de março a 04 de abril de 2011.

Os microrganismos utilizados foram a microalga *Chlorella minutissima*, proveniente de uma coleção mantida na Universidade do Texas, EUA e outra isolada do resíduo suíno biodigerido, denominada nesse estudo de 'BIOD A'. As microalgas foram mantidas em meio BBM, em pH 6,8. O resíduo suíno biodigerido (RSB) foi proveniente de uma granja de ciclo completo e armazenado em biodigestores. As concentrações de nutrientes dos meios estão indicadas na tabela 1.

**Tabela 1. Concentração de nutrientes no meio *Bold Basal Medium* (BBM) e no resíduo suíno biodigerido (RSB).**

Composição Química dos Meios	BBM	RSB
	mg L <sup>-1</sup>	
Nitrogênio	46,00	283,75
Fósforo	53,25	23,36
Potássio	84,95	320,00
Enxofre	11,51	7,39
Magnésio	7,29	45,02
Cálcio	6,80	73,57
Manganês	0,40	0,31
Ferro	1,00	0,21
Zinco	2,00	0,03

Cobre 0,40 0,01

O inóculo foi preparado antes do início do experimento, o qual foi mantido durante 10 dias em câmara de crescimento com temperatura constante de 27°C, com fotoperíodo 12 h/12 h (claro/escuro) e iluminação proveniente de quatro lâmpadas de 65 W.

O volume inicial de cultivo foi de 70 ml de “meio BBM” ou a mistura “água autoclavada + RSB filtrado e autoclavado”. Sendo assim, os tratamentos foram conduzidos da seguinte forma: N25 - RSB na concentração de 25% de N em relação ao meio BBM; N50 - RSB na concentração de 50% de N em relação ao meio BBM; N75 - RSB na concentração de 75% de N em relação ao meio BBM; N100 - RSB na concentração de 100% de N em relação ao meio BBM; BBM - meio *Bold Basal Medium* preparado em laboratório. Todos os tratamentos que utilizaram o RSB foram diluídos em água destilada autoclavada. As condições experimentais foram as mesmas estabelecidas para o cultivo do inóculo.

O inóculo inicial de *C. minutissima* e da microalga BIOD A era da ordem de 10<sup>5</sup> cel.mL<sup>-1</sup>.

Sendo assim, o experimento foi composto por cinco tratamentos com três repetições para duas espécies de microalgas (*C. minutissima* e BIOD A).

A cada três dias foi retirado uma alíquota de 2 mL de cada amostra, a fim de verificar o pH e a contagem de células. Ao final do experimento foi determinado o lipídio total.

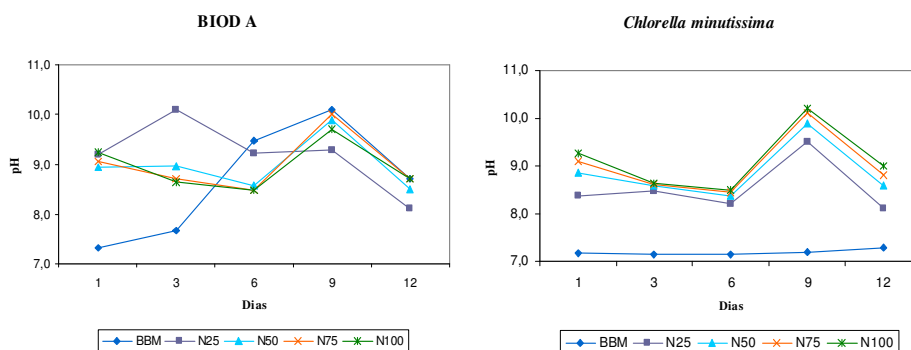
A determinação do pH das culturas foi realizada através de leitura direta da amostra em pHmetro digital (marca Quimis, modelo Q-400MT). Para a avaliação do crescimento celular das microalgas foi realizada a contagem de células em câmara de Neubauer.

Para a determinação de lipídio foi utilizada a técnica de fluorescência de lipídios com Nile Red, adaptada no Laboratório de Fluorescência e Ressonância Paramagnética Eletrônica (LAFLURPE) do Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina, PR.

**RESULTADOS OBTIDOS**

A figura 1 indica os valores de pH para as microalgas BIOD A e *Chlorella minutissima* no período de avaliação do experimento.

Para a microalga BIOD A o pH do tratamento N25 teve seu pico máximo no 3º dia de experimento com o pH aumentando de 9,2 para 10,1. Já para as maiores concentrações de N (tratamentos N50, N75 e N100), o pico máximo do pH foi no 9º dia com o pH variando de 8,9 para 9,9; 9,1 para 10,0; 9,2 para 9,7, respectivamente. O tratamento que utilizou o meio de cultivo BBM, também apresentou seu pico máximo no 9º dia, variando de 7,3 para 10,1.



**Figura 1. Determinação do pH para *C. minutissima* e BIOD A cultivadas em meio BBM e resíduo suíno biodigerido.**

O pH da *Chlorella minutissima* cultivada em meio BBM aumentou 0,1 unidade durante o período experimental (7,2 no 1º dia; 7,2 no 3º; 7,2 no 6º; 7,2 no 9º e 7,3 no 12º dia). Os tratamentos que receberam RSB na concentração de 25, 50, 75 e 100% de N em relação ao meio BBM tiveram o mesmo comportamento; decaindo do primeiro ao sexto dia e aumentando de aproximadamente duas unidades no 9º dia avaliado.

Os picos de crescimento no 9º dia de experimento para ambas microalgas cultivadas em RBS, pode ser explicado por Silva (1996), onde, o aumento do pH em função do aumento do oxigênio decorre de que a intensidade fotossintética pode remover CO<sub>2</sub> mais rapidamente pela dissociação do que a sua reposição pela atividade bacteriana. Isto é determinado pela dissociação do íon bicarbonato, que libera além do CO<sub>2</sub> necessário as algas, como subproduto, também o íon hidroxila responsável pela alcalinização do meio.

Observou-se nesse trabalho que as microalgas (*C. minutissima* e BIOD A) apresentaram um padrão de crescimento celular diferenciado (Figura 2).

A microalga *C. minutissima* cultivada em meio BBM apresentou um crescimento inferior aos cultivos em RSB, tendo seu pico máximo no final do experimento (12º dia) com uma densidade de  $78,5 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup>. A densidade celular para os tratamentos com diferentes concentrações de nitrogênio foi crescente durante todo o período experimental apresentando seu pico máximo no final, sendo superior para os tratamentos N100, N75 e N50 respectivamente ( $573$ ;  $556$  e  $527 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>), quando comparados ao N25 ( $380 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>).

Para a microalga BIOD A o meio padrão de cultivo (BBM) apresentou valores crescente de densidade celular, apresentando seu pico máximo no 12º dia ( $253 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>), sendo superior aos cultivos N75, N50 e N25 ( $248$ ;  $191$  e  $117 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup> respectivamente, porém, tais tratamentos apresentaram oscilações durante o período experimental. O cultivo N100 apresentou valores crescentes durante todo o período, apresentando seu pico máximo no final com  $304 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>.

Para ambas as microalgas o maior número de células encontrado foi para o tratamento mais concentrado com dejetos suíno (N100). Isto pode ser explicado devido ao fato deste meio de cultura oferecer nutrientes necessários para o crescimento ótimo destas espécies de microalgas.

Ressalte-se, a importância desses resíduos terem substituído o meio padrão (BBM), proporcionando ganhos de produtividade corroborando com Vendruscolo (2009), onde cultivou a microalga *Scenedesmus quadriculata* em efluentes de biodigestão de aves e suínos em comparação ao meio padrão CHU concluindo que estes meios podem substituir o tradicional.

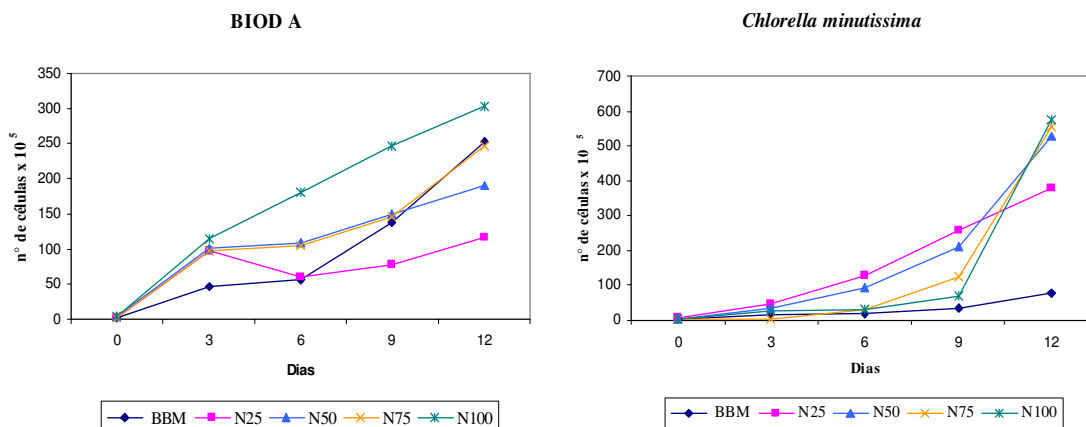


Figura 2. Desenvolvimento celular para *C. minutissima* e BIOD A cultivadas em meio BBM e resíduo suíno biodigerido.

A concentração de lipídio determinada por fluorescência apresentou diferença significativa entre os tratamentos, bem como entre as microalgas utilizadas (Tabela 2).

**Tabela 2: Concentração de lipídio determinada por espectrofluorimetria em duas espécies de microalgas.**

TRATAMENTOS	Concentração de lipídio (g.L <sup>-1</sup> )	
	BIOD A	<i>Chlorella minutissima</i>
BBM	0,34 A <sup>1</sup> a <sup>2</sup>	0,08Bb
N25	0,14 Ca	0,24 Aa
N50	0,16 Cb	0,22 Aa
N75	0,28 Ba	0,27 Aa
N100	0,06 Da	0,07 Ba

<sup>1</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste *t* comparativo entre tratamentos, ao nível de 5% de significância.

<sup>2</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras na linha não diferem entre si pelo teste *t* comparativo entre microalgas, ao nível de 5% de significância.

Quando comparado entre tratamentos, a microalga BIOD A produziu maior concentração de lipídio no meio sintético BBM, diferindo estatisticamente do tratamento N75 onde obteve-se a segunda melhor produção. Entre os tratamentos N25 e N50 não houve diferença, e N100 produziu lipídio em menor quantidade.

Para a *C. minutissima* a melhor concentração de lipídio foi obtida nos tratamentos N75, N50, N25 que não diferiram estatisticamente entre si. A menor produção foi obtida nos tratamentos BBM e N100, os quais não diferiram entre si.

Ao ser comparadas as espécies de microalgas observou-se que nos tratamentos N25, N75 e N100 não houve diferença na produção de lipídios. BIOD A foi superior á *C. minutissima* quando cultivada em meio BBM. *C. minutissima* teve produção de lipídio superior a BIOD A em N50.

COSTA et al. (2006) avaliaram o conteúdo lipídico de duas espécies de microalgas expostas a diferentes condições de cultivo e obtiveram maiores teores lipídicos pra a microalga *Chlorella minutissima*, corroborando com o presente estudo.

A BIOD A será identificada para posteriormente para ser inserida na Coleção de Microalgas do IAPAR, portanto ainda não há estudo do seu comportamento fisiológico que propiciou melhores teores lipídicos em meio BBM. Segundo Illman et al. (2000), baixas concentrações de nitrogênio são consideradas condições ótimas para o aumento da produção de lipídios nas cepas de *Chlorella*, o que foi evidenciado para a *Chlorella minutissima* (RSB-N50).

## CONCLUSÕES

O resíduo suíno biodigerido pode ser utilizado como fonte de nutriente para o cultivo de microalga em substituição ao meio comercial, minimizando os custos de cultivo sem interferir na produção de lipídios.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Costa, J.A.V.; Radmann, E.M.; Cerqueira, V.S.; Santos, G.C.; Calheiros, M.N. Perfil de ácidos graxos das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Chlorella minutissima* cultivadas em diferentes condições. *Alimentos e Nutrição*, Araraquara, v.17, n.4, p.429-436, 2006.
2. Illman, A.M.; Scragg, A.H.; Shales, S.W. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grow in low nitrogen medium. *Enzyme Microb. Technol.*, v.27, p.631-635, 2000.
3. Silva, F.C.M. 1996. Tratamento dos dejetos suínos utilizando lagoa de alta taxa de degradação em batelada. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 115 pp.
4. Vendruscolo, J.B.G. Cultivo da microalga *Scenedesmus quadriculata* em efluentes de biodigestão de aves e suínos. 2009. 44p. (Dissertação - Universidade Católica de Goiás).