



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

YASMINE MARIA LIMA DE OLIVEIRA AQUINO

**ANÁLISE DO CRESCIMENTO DA MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS* EM
MEIOS DE CULTURA DISTINTOS**

FORTALEZA

2014

YASMINE MARIA LIMA DE OLIVEIRA AQUINO

**ANÁLISE DO CRESCIMENTO DA MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS* EM
MEIOS DE CULTURA DISTINTOS**

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. José Osvaldo Beserra Carioca.

Coorientador: Prof. Me. Eveline de Alencar Costa

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

A669a Aquino, Yasmine Maria Lima de Oliveira.
Análise do crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* em meios de cultura distintos /
Yasmine Maria Lima de Oliveira Aquino. -2014.
46 f. : il. color.

Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento
de Bioquímica e Biologia Molecular, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2014.

Orientação: Prof. Dr. José Osvaldo Beserra Carioca.

Coorientação: Profa. Me. Eveline de Alencar Costa.

1. Cultivo. 2. Microalga. 3. *Chlorella vulgaris*. I. Título.

CDD 660.6

YASMINE MARIA LIMA DE OLIVEIRA AQUINO

**ANÁLISE DO CRESCIMENTO DA MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS* EM
MEIOS DE CULTURA DISTINTOS**

Monografia apresentada ao curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: ___/___/___.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Osvaldo Beserra Carioca (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Me. Eveline de Alencar Costa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Me. Ana Erbênia Pereira Mendes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. José Osvaldo Beserra Carioca, por acompanhar meu amadurecimento, pelo conhecimento passado, pela solicitude e por me conceder a oportunidade de trabalhar em seu laboratório. .

À minha co-orientadora, Professora Me. Eveline Alencar, por acompanhar a pesquisa de perto, pelos ensinamentos, pela paciência e compreensão que sempre dispõe.

À Professora Me. Celma Oliveira, por sempre se mostrar solícita e contribuir com sugestões valiosas para minha pesquisa.

Aos colegas do Laboratório de Desenvolvimento de Produtos e Processos, em especial à Natália Aquino, pois foi de fundamental importância para a realização deste trabalho, além de proporcionar bons momentos durante o período de convivência.

À Professora Vera Lúcia, por todo o carinho e ensinamentos passados, desde o início no LDPP.

Aos membros da banca, composta pelos professores Osvaldo Carioca, Eveline Alencar e Ana Erbênia, por aceitarem colaborar com o aperfeiçoamento desse trabalho, dedicando seu tempo e conhecimento na leitura e críticas.

Ao meu grande amigo e colega de trabalho, Emanuel Francelino, por me auxiliar durante a pesquisa e pelos momentos de descontração.

Aos meus colegas da primeira turma do curso de Biotecnologia, a todas as amizades que fiz e que vou levar comigo. Obrigada pelos bons momentos proporcionados desde o primeiro ano de curso, nos cafés e por enriquecer meus dias.

Aos meus amigos pessoais Aline Gurgel, Israel Carneiro, Lucas Sousa e Igor Ibiapina, por toda a alegria, carinho e paciência.

Aos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

“Happiness is not something ready made. It comes from your own actions.” (Dalai Lama)

RESUMO

As microalgas, organismos microscópicos fotossintetizantes, têm atraído bastante atenção de pesquisadores devido seu potencial biotecnológico, pois sua biomassa pode ser explorada como fonte de biocombustíveis, além de compostos com alto valor nutricional e comercial, como proteínas, ácidos graxos e vitaminas. No presente estudo, foi utilizada a microalga *Chlorella vulgaris*, sendo feito um ensaio em cultivo não-aerado, comparando-se três diferentes formulações de fertilizante inorgânico NPK (nitrogênio:fósforo:potássio) 19:19:19, 16:08:32 e 12:43:12, como teste preliminar ao cultivo aerado. O cultivo em meio NPK 16:08:32 obteve melhor desempenho no teste preliminar, sendo escolhido para comparação com meio sintético WC no cultivo com uso de aeração. Assim, foi comparado o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* em meio de cultura sintético WC e em fertilizante inorgânico NPK 16:08:32, em escala de bancada e utilizando aeração. Observou-se, portanto, um melhor crescimento microalgal neste último. Além disso, foi analisado o crescimento da microalga em cultivo aberto, também utilizando fertilizante inorgânico (NPK 19:19:19), o qual apresentou um bom crescimento durante o tempo de cultivo, viabilizando o uso da biomassa tanto para inóculo de cultivos maiores, quanto para obtenção de compostos de alto valor produzidos por esta microalga.

Palavras-chave: *Chlorella vulgaris*. Microalga. Cultivo.

ABSTRACT

Microalgae, photosynthetic microscopic organisms, have attracted much attention from scientists due to its biotechnological potential, because its biomass can be explored as source of biofuels, and also, substances with high nutritional and commercial value, like proteins, fatty acids and vitamins. On this study, the microalgae *Chlorella vulgaris* was utilized. A preliminary assay was performed on non-aerated conditions, where three different formulations of the inorganic fertilizer NPK (nitrogen:phosphorus:potassium) 19:19:19, 16:08:32 and 12:43:12 were compared. The culture which grew in NPK 16:08:32 medium showed the best results (higher cellular densities), being chosen to be compared with WC synthetic medium on aerated conditions. When the cultures cultivated on aerated conditions, with the different medium (WC and NPK 16:08:32), were analyzed, a better microalgae growth was observed with the inorganic fertilizer. Moreover, the microalgae was also cultivated in an open system, with the utilization of inorganic fertilizer (NPK 19:19:19), which showed acceptable growth during the cultivation time, enabling the use of the obtained biomass as inoculum to higher scale cultivation, as well as extraction of high value compounds produced by this microalgae.

Keywords: *Chlorella vulgaris*. Microalgae. Cultivation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Curva de crescimento	3
Figura 2 – Cultivo preliminar não-aerado	12
Figura 3 – Cultivo aerado	13
Figura 4 – Vista parcial das cubas utilizadas para o crescimento de microalgas	14
Figura 5 – Câmara de Neubauer	15
Figura 6 – Quadrantes observados na câmara de Neubauer	15
Figura 7 – Padrão de contagem de células na câmara de Neubauer	16
Figura 8 – Curvas de crescimento de <i>Chlorella vulgaris</i> nos ensaios com meios NPK em diferentes razões de nutrientes (densidade celular)	19
Figura 9 – Curvas de crescimento de <i>Chlorella vulgaris</i> nos ensaios com meios NPK em diferentes razões de nutrientes (absorbância)	20
Figura 10 – Curvas de crescimento obtidas nos ensaios com meios WC e NPK (densidade celular)	21
Figura 11 – Curvas de crescimento obtidas nos ensaios com meios WC e NPK (absorbância)	22
Figura 12 – Curvas de crescimento obtidas nos cultivos em cubas (densidade celular)	26
Figura 13 – Curvas de crescimento obtidas nos cultivos em cubas (absorbância)	26
Figura 14 – Cubas utilizadas para o cultivo da microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	27

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Composição de diferentes fontes de alimento e microalgas, expressas em 6
porcentagem de matéria seca
- Tabela 2** – Meio de cultura WC 10
- Tabela 3** – Densidades de células de *Chlorella vulgaris* no tratamento com meio WC 22
- Tabela 4** – Parâmetros de crescimento em meio WC (taxa de crescimento - r, divisões 23
por dia - k e tempo de duplicação - T2)
- Tabela 5** – Densidades de células de *Chlorella vulgaris* no tratamento com meio NPK 23
- Tabela 6** – Parâmetros de crescimento em meio NPK 16:08:32 (taxa de crescimento - r, 23
divisões por dia - k e tempo de duplicação - T2)
- Tabela 7** – Médias de Densidades Celulares Máximas para o Meio WC e para o Meio 24
NPK 16:08:32
- Tabela 8** – Variação de pH nos meios WC e NPK entre o primeiro e último dia de 25
cultivo

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	graus centígrados
g	grama
h	hora
min	minuto
pH	potencial hidrogeniônico
mL	mililitros
DO	densidade óptica
g/L	gramas por litro
g/mL	gramas por mililitro
µm	micrômetro
nm	nanômetro
L	litros

LISTA DE SÍMBOLOS

% Porcentagem

® Marca Registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REFERENCIAL TEÓRICO	2
2.1	Aspectos gerais da <i>Chlorella vulgaris</i> e fotossíntese	2
2.2	Curva de crescimento	2
2.3	Condições de cultivo das microalgas	4
2.4	Aplicações	5
2.4.1	<i>Biocombustíveis</i>	5
2.4.2	<i>Nutrição humana</i>	5
2.4.3	<i>Ração animal</i>	7
2.4.4	<i>Tratamento de efluentes</i>	7
3	OBJETIVOS	9
3.1	OBJETIVO GERAL	9
3.2	Objetivos específicos	9
4	METODOLOGIA	10
4.1	Meios de cultura	10
4.2	Ensaio preliminar (cultivo não-aerado)	11
4.3	Cultivo aerado	12
4.4	Cultivo em sistema aberto por meio de cubas	13
4.5	Contagem de células	14
4.6	Parâmetros de crescimento	16
4.6.1	<i>Taxa instantânea de crescimento (ou taxa intrínseca de aumento)</i>	16
4.6.2	<i>Duplicações por dia</i>	17
4.6.3	<i>Tempo de duplicação</i>	17
4.6.4	<i>Análise Estatística</i>	18
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5.1	Bancada	19
5.1.1	<i>Ensaio preliminar</i>	19
5.1.2	<i>Cultivos aerados</i>	20
5.2	Cultivo em sistema aberto por meio de cubas	25
6	CONCLUSÕES	29

1. INTRODUÇÃO

Algas são organismos talófitos (plantas desprovidas de raízes, folhas e caule) que possuem clorofila *a* como seu pigmento fotossintético primário (LEE, 2008). As microalgas são um grupo em que estão contidas as bactérias fotossintéticas aeróbias, as cianobactérias (algas azuis) e as algas microscópicas (RICHMOND, 2004).

Estes microrganismos representam uma enorme biodiversidade da qual cerca de 40.000 já foram descritas ou analisadas. As espécies do gênero *Chlorella* possuem grande importância a nível econômico e comercial devido a facilidade em seu cultivo e seu alto valor nutricional. Além disso, estas microalgas têm amplos intervalos de tolerância em relação a valores de pH, temperatura, níveis de salinidade, e luminosidade (YAMAMOTO *et al.*; MORONTA, MORA e MORALES, 2006). Uma das microalgas mais utilizadas é a *Chlorella vulgaris*. Esta é classificada taxonomicamente da seguinte forma (GUIRY e GUIRY, 2014):

Reino: Plantae

Filo: Chlorophyta

Classe: Trebouxiophyceae

Ordem: Chlorellales

Família: Chlorellaceae

Gênero: *Chlorella*

Espécie: *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris é uma microalga unicelular que cresce em água doce e está presente na Terra desde o período pré-Cambriano (2.5 bilhões de anos atrás) e desde então, sua integridade genética se manteve constante (DITFURTH, 1972).

No começo do século passado, o conteúdo de proteína de *Chlorella* (>55% do peso seco) atraiu a atenção de cientistas alemães como uma fonte de alimento não-convencional. Hoje em dia, o Japão é o líder mundial em consumo de *Chlorella* e a utiliza para tratamento médico, pois esta mostrou ter propriedades imunomoduladoras e anti-câncer. Além disso, *C. vulgaris* é capaz de acumular quantidades significativa de lipídios, especialmente quando o suprimento de nitrogênio é interrompido, tendo um perfil de ácidos graxos adequado para a produção de biodiesel (ZHENG *et al.*, 2011; KITADA *et al.*, 2009).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aspectos gerais da *Chlorella vulgaris* e fotossíntese

A microalga *Chlorella vulgaris* é uma célula microscópica, esférica, a qual tem tamanho que varia de 2-10 μm . É formada por parede celular, citoplasma contendo núcleo, vacúolos, mitocôndria, cloroplasto e complexo de Golgi. Pode acumular pigmentos como clorofila *a* e *b*, β -caroteno e xantofilas. O seu produto de reserva de carbono intracelular é o amido. *C. vulgaris* se reproduz assexuadamente por autoesporulação. Assim, cada célula-mãe é capaz de gerar quatro novas células (YAMAMOTO *et al.*, 2004).

Pelo fato destes organismos realizarem fotossíntese, estes têm um papel ecológico importante na reciclagem de nutrientes, produção de O_2 e fixação de CO_2 . O mecanismo pelo qual as microalgas realizam fotossíntese pode ser comparado ao das plantas superiores, porém, devido à sua estrutura (mais simples) e ao meio em que vivem (líquido), as microalgas apresentam trocas mais eficientes de água, nutrientes e CO_2 do que as plantas, algo que favorece maiores taxas de conversão de energia solar em biomassa (SALISBURY e ROSS, 1985; CARLSSON *et al.*, 2007). A produtividade marinha de fotossíntese (micro e macroalgas) contribui com 50% da produtividade primária total do planeta, sendo responsável por metade da fixação de carbono e ajudando a reduzir as consequências da acumulação de CO_2 na atmosfera e o aquecimento global (CHUNG *et al.*, 2011).

2.2 Curva de crescimento

Considere-se um cultivo estanque (no qual, após o inóculo no meio, não há adição de qualquer outro nutriente durante o desenvolvimento do microrganismo), em que um meio de cultura é iluminado com fonte de energia adequada, contendo nutrientes necessários, condições químicas e físicas favoráveis. Se, nesse meio, for inoculada uma população de organismos conhecida e seu crescimento for acompanhado ao longo do tempo, é possível obter uma curva que mostra as várias fases características do crescimento de populações de microrganismos (RICHMOND, 2004). Dessa forma, uma curva de crescimento teórica tem a seguinte forma (Figura 1):

Figura 1 - Curva de crescimento



Fonte: (FEUP)

1. Fase de adaptação (Fase Lag) - Período de adaptação das células extraídas de uma cultura para um meio novo. A fase de adaptação pode durar apenas algumas horas, ou mesmo dias, dependendo das diferenças entre o cultivo preexistente e o novo (quanto mais diferentes, teoricamente, mais tempo essa fase irá durar). Esta fase também pode ser extensa na presença de compostos tóxicos, nutrientes dificilmente metabolizáveis ou se inóculo for de reduzida dimensão ou inadequado (inóculo em fase de morte, por exemplo).

2. Fase de crescimento exponencial (Fase log) - Fase de crescimento acelerado, quando a taxa de crescimento torna-se maior. Geralmente sucede a fase de adaptação, mas pode ser iniciada logo após o inóculo, em determinadas situações. Ao término dessa fase, a biomassa tende a ser maior que no início dos cultivos. Deve-se utilizar inóculos que estejam, preferencialmente, nesta fase, pois as células apresentam melhor estado fisiológico, contribuindo para uma adaptação mais rápida ao novo meio de cultura.

3. Fase estacionária – As populações raramente conseguem manter um crescimento exponencial a altas velocidades durante um largo período de tempo, visto que o crescimento está limitado pelo esgotamento dos nutrientes ou pela acumulação de produtos inibitórios do metabolismo. Consequentemente, a taxa de crescimento diminui e se iguala a taxa de morte (caracterizando a fase estacionária).

4. Fase de morte – Nessa fase, há o esgotamento de nutrientes da cultura de microrganismos. Essa fase é marcada pela morte e lise de muitas células, além da presença de substâncias autoinibidoras de crescimento, como metabólitos. A taxa de crescimento é negativa, pois na população pouquíssimas células ainda podem crescer e um número maior de indivíduos morre (LOURENÇO, 2006).

2.3 Condições de cultivo das microalgas

O crescimento das microalgas depende de diversos fatores, os quais devem ser observados antes de se começar o cultivo, sendo os mais importantes: temperatura, pH, luminosidade, nutrientes, condições fisiológicas da microalga e concentração de CO₂ e O₂ disponíveis para cada microalga. Para que haja crescimento microalgal, é necessário que alguns nutrientes estejam presentes no meio, pois são essenciais para o crescimento e manutenção da cultura. São necessários macronutrientes (nitrogênio, carbono, fósforo, oxigênio, cálcio, magnésio, enxofre e potássio) e micronutrientes (manganês, cobre, molibdênio, cobalto e zinco), entre outras substâncias, dependendo da espécie a ser cultivada (GRAHAM, GRAHAM e WILCOX, 2009; GUILLARD, 1975).

O nitrogênio é essencial pois é componente fundamental de proteínas, ácidos nucléicos e pigmentos fotossintetizantes. Dessa forma, por fazer parte da estrutura de substâncias do metabolismo primário da microalga, o nitrogênio tem importância acentuada para estas. Em relação ao fósforo, sua importância se deve a sua participação em processos que envolvem trocas energéticas nas células, bem como estruturação da membrana celular, por compor os fosfolipídios. O potássio, apesar de não ser um nutriente limitante para as microalgas, tem funções relacionadas à regulação osmótica, controle de pH interno e à conformação e estabilidade de proteínas (LOURENÇO, 2006).

2.4 Aplicações

2.4.1 *Biocombustíveis*

A dependência de fontes de energia está crescendo rapidamente, principalmente devido ao aumento da demanda, o que acarreta em consequências dramáticas para o ambiente. O biocombustível obtido de algas ou microalgas é considerado como uma das alternativas às culturas de biocombustíveis atuais, tais como soja, milho e matérias-primas lignocelulósicas, pois não compete com comida e não requer terras aráveis para crescer (SINGH, NIGAM e MURPHY, 2011).

No entanto, o biocombustível de microalgas é promissor apenas a longo prazo, pois atualmente o custo de produção é alto e ainda não pode competir com combustível convencional. (DEMIRBAS, 2011).

Como mencionado anteriormente, *C. vulgaris* tem o potencial de acumular altas quantidades de lípidos, especialmente quando cultivadas em condições mixotróficas. O perfil de ácidos graxos dessa microalga se mostrou adequado para produção de biodiesel, com estabilidade oxidativa depois de transformado em biodiesel, e tem propriedades que obedecem o Padrão Americano (ASTM 6751), Padrão Europeu (EM 14214), Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP 255) e o Padrão Australiano para biodiesel (FRANCISCO *et al.*, 2012).

Além disso, *C. vulgaris* tem alto teor de amido, o qual se mostrou uma boa fonte para produção de bioetanol. Hirano *et al.* (1997) extraíram amido de *C. vulgaris* e obtiveram uma taxa de conversão de etanol de 65% depois da sacarificação e fermentação com levedura. Apesar disso, atualmente, o custo de produção de biocombustível algal ainda é alto, inviabilizando sua produção e tornando difícil a competição com combustíveis fósseis, além de levantar questionamentos quanto à sustentabilidade da sua produção, o que leva pesquisadores a estudar alternativas mais sustentáveis para o cultivo em massa de microalgas.

2.4.2 *Nutrição humana*

C. vulgaris é uma das poucas microalgas que podem ser encontradas no mercado como suplemento ou aditivo alimentar, corante (depois de carotenogênese) e emulsão alimentar (FERNANDES *et al.*, 2012). Esses produtos são vendidos de diferentes formas, como cápsulas, tabletes, extratos e pó (LIANG e LIU, 2004). A *Chlorella*, assim como a *Spirulina*, possui certificado GRAS (Generally Recognized As Safe) emitido pelo FDA (Food and Drug Administration) podendo ser utilizada como alimento sem apresentar risco à saúde. A biomassa microalgal produzida pode ser explorada como fonte de biocompostos com alto valor nutricional e comercial, como proteínas, ácidos graxos e vitaminas, ou na formulação de alimentos (ANDRADE e COSTA, 2008). As diversas classes de microalgas apresentam diferenças na composição de proteínas, carboidratos e lipídios. A Tabela 1 apresenta uma comparação da composição química de algumas microalgas (*C. vulgaris* destacada) com alimentos convencionais.

Tabela 1 - Composição de diferentes fontes de alimento e microalgas, expressas em porcentagem de matéria seca.

Fonte	Proteínas	Carboidratos	Lipídios
Fermento de padaria	39	38	1
Carne	43	1	34
Leite	26	38	28
Arroz	8	77	2
Soja	37	30	20
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7

Fonte: BECKER (2004)

Uma das substâncias presentes em *Chlorella* é o β -1,3-glucano, o qual atua como imunostimulador ativo, eliminador de radicais livres e redutor de lipídios no sangue. Além disso, vários outros efeitos promotores de saúde humana têm sido apontados: eficácia sobre úlceras, feridas e constipações gástricas; ação preventiva contra a arteriosclerose e hipercolesterolemia; ação antitumor (LOURENÇO, 2006).

Em experimentos com ratos, camundongos e coelhos, na qual estes foram alimentados com a alga em forma de pó, foi constatada proteção contra doenças relacionadas à idade, como doenças cardiovasculares, hipertensão e catarata (SANO *et al.*, 1988). Também há diminuição do risco de aterosclerose e estimulação da síntese de colágeno para a pele (SANO, 1987).

Apesar disso, mesmo com todos os benefícios à saúde que *C. vulgaris* e outras microalgas podem prover, devido à sua riqueza em proteínas, lipídios, polissacarídeos, pigmentos e vitaminas muitas vezes até presentes em maiores concentrações do que em alimentos convencionais, elas ainda são consideradas como suplemento alimentar ao invés de produtos devido à falta de legislações oficiais claras em termos de qualidade e requerimentos em relação a microalgas (GROBBELAAR, 2003).

2.4.3 Ração animal

As proteínas representam a principal fonte de nitrogênio e aminoácidos para animais cultivados. Elas tendem a ser a classe de substâncias mais abundante na maioria das espécies de microalgas utilizadas em alimento na aquicultura. Como as microalgas são capazes de sintetizar todos os aminoácidos, elas tornam-se boas fontes de aminoácidos essenciais para animais (SPOLAORE, 2006).

Em relação aos ácidos graxos em microalgas, os poliinsaturados, como o ácido eicosapentanóico (20:5 ω -3), araquidônico (20:4 ω -6) e docosahexaenóico (22:6 ω -3), são de grande importância, pois são essenciais para muitos animais marinhos e são necessários para o crescimento e a metamorfose de larvas de muitas espécies (BECKER, 2004).

2.4.4 Tratamento de efluentes

Muitos estudos demonstraram o potencial de *C. vulgaris* de fixar até 74% de dióxido de carbono quando cultivada em um fotobiorreator, e de absorver 45-97% de nitrogênio, 28-96% de fósforo e de reduzir a Demanda Química de Oxigênio (DQO) (quantidade de oxigênio necessária para oxidação da matéria orgânica de uma amostra por meio de um agente químico)

em 61-86% de diferentes tipos de efluentes, tais como têxteis, esgoto municipal, provenientes da agricultura e recalitrantes (KEFFER e KLEINHEINZ, 2002; ASLAN e KAPDAN, 2006).

Microalgas provêm uma via para a remoção de nutrientes vitais (nitrogênio e fósforo), dióxido de carbono, metais pesados e patógenos presentes em efluentes, os quais são necessários para seu crescimento. Além do mais, um dos principais fatores que comandam a produção de microalgas como parte do processo de tratamento de efluentes é a possibilidade de reduzir custos na produção de biomassa microalgal pela minimização do uso de água doce e meios de cultura sintéticos. Assim, uma maior taxa de crescimento microalgal acompanhada da eliminação dos níveis de contaminação na água é um processo vantajoso e promissor (BRENNAN e OWENDE, 2010).

Além disso, a produção de *Chlorella vulgaris* utilizando meios sintéticos é muito cara, o que se torna um entrave para produção em larga escala (OKAUCHI, 1991). Dessa forma, sempre deve haver a procura por fontes nutricionais mais baratas, sendo essas não apenas efluentes, mas também fertilizantes inorgânicos, por exemplo, os quais vêm sendo utilizados por alguns autores como alternativa aos meios tradicionais (ASHRAF *et al.*, 2011) (MUÑOZ-PEÑUELA *et al.*, 2012).

Como visto anteriormente, cultivos de microalgas têm sido realizados visando a produção de biomassa para obtenção de uma diversidade de produtos, como biocombustíveis e compostos naturais com alto valor no mercado mundial. Assim, as microalgas revelam um grande potencial de aplicação biotecnológico. Porém, é necessário que se explore meios de cultura de baixo custo, para que a obtenção destes produtos não se torne cara.

Desta forma, neste trabalho, se buscou analisar o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* em diferentes meios e sistemas de cultivo, de modo a se determinar alternativas mais baratas em relação aos meios de cultura sintéticos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* em meios de cultura distintos

3.2 Objetivos específicos

- Conhecer o crescimento da *Chlorella vulgaris* em diferentes composições do meio com fertilizante inorgânico NPK como teste pré-liminar em cultivo não-aerado;
- Comparar o crescimento da referida microalga em meio WC e no meio NPK contendo a razão de nutrientes que apresentar melhor resultado nos ensaios prévios;
- Conhecer o crescimento da microalga em estudo em sistema aberto utilizando meio de cultivo NPK 19:19:19;
- Obter as curvas de crescimento da *Chlorella vulgaris* em diferentes meios e sistema de cultivos;
- Realizar atividades de monitoramento de pH e densidade ótica, relacionados a curva de crescimento dos cultivos aerados de bancada;
- Obter os parâmetros de crescimento em relação a contagem de células nos cultivo aerados de bancada;

4 METODOLOGIA

O experimento desenvolveu-se no Laboratório de Desenvolvimento de Produtos e Processos (LDPP), situado no Parque de Desenvolvimento Tecnológico (PADETEC), na Universidade Federal do Ceará (UFC). Foi utilizada a microalga *Chlorella vulgaris*, a qual compõe o banco de cepas do laboratório. O estudo foi realizado entre os meses de agosto e outubro de 2014.

4.1 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados nesse estudo foram os meios WC (Guillard and Lorenzen 1972), e fertilizante inorgânico NPK nas razões 19:19:19, 16:08:32 e 12:43:12. Os meios NPK utilizados nos experimentos em bancada foram preparados na concentração de 0,7 g/L e no cultivo em cubas (NPK 19:19:19) na concentração de 1,4g/L. A composição do meio WC é mostrada na Tabela 2.

Tabela 2 - Meio de cultura WC.

Reagentes	Solução-estoque (g 100 mL ⁻¹)	Meio de cultura
CaCl ₂ .2H ₂ O	36,8	1mL
MgSO ₄ .7H ₂ O	37,0	1mL
Na ₂ HCO ₃	12,6	1mL
K ₂ HPO ₄ .3H ₂ O	11,4	1mL
NaNO ₃	85,0	1mL
Na ₂ SiO ₃ .5H ₂ O	21,2	1mL
Solução de Ferro	(g 1000 mL ⁻¹ de água destilada); Na ₂ EDTA = 4,36; FeCl ₃ .H ₂ O = 3,15	1mL
Solução de micronutrientes	(g 1000 mL ⁻¹ de água destilada) CuSO ₄ .5H ₂ O = 0,01; ZnSO ₄ .7H ₂ O = 0,022; CoCl ₂ .H ₂ O = 0,01; MnCl ₂ .4H ₂ O = 0,18; Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O = 0,006; H ₃ BO ₃ = 1,0	1mL
Solução de vitaminas	(g 1000 mL ⁻¹ de água destilada) Tiamina HCl= 0,1; Biotina= 0,0005	1mL
Água destilada		1000mL

* Modificado de Guillard e Lorenzen (1972). Fonte: (OHSE, DERNER, *et al.*, 2008)

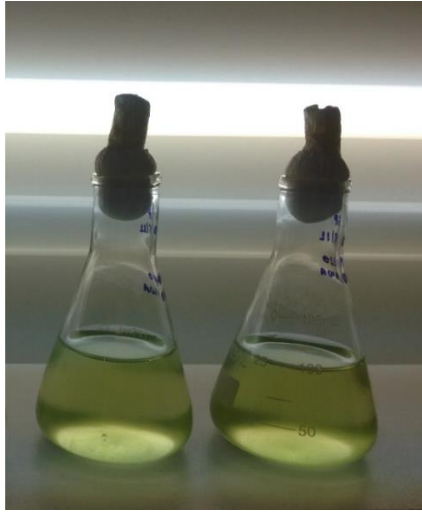
Após a preparação, todos os meios utilizados para a escala de bancada foram autoclavados. Já para o cultivo de 75 L em cubas, foram preparados e autoclavados 1 L de um

meio concentrado de NPK 19:19:19, os quais foram posteriormente adicionados às cubas já contendo 74 litros de água, assim obtendo a concentração de 1,4 g/L. A água utilizada nas cubas passa por um filtro de carvão ativado antes de ser utilizada para o cultivo, pois o tratamento de grandes volumes de água em autoclave torna o processo caro e dispendioso.

4.2 Ensaio preliminar (cultivo não-aerado)

O ensaio preliminar foi realizado com o objetivo de se determinar qual dos meios NPK (19:19:19, 16:08:32 ou 12:43:12) seria utilizada para comparação com o meio definido WC em posterior cultivo aerado. Assim, o cultivo foi iniciado com uma concentração de 1×10^5 células.ml⁻¹ em 100 mL de meio, contido em frascos Erlenmeyer de 250 mL. Os frascos não foram providos de aeração nem agitação. O cultivo (Figura 2), feito em duplicatas, foi mantido em bancadas adaptadas com lâmpadas fluorescentes de 40 W, reguladas para um fotoperíodo de 12h claro/12h escuro, com iluminância de 7000 Lux sobre os frascos. A temperatura do ambiente durante os cultivos foi mantida entre 25 e 30 °C. O pH foi ajustado para 7 após a preparação dos meios. Em dias alternados (durante 9 dias), foram retiradas alíquotas de 5 ml para posterior contagem de células e leituras de absorbância. As leituras de absorbância foram feitas utilizando DO de 680 nm, em espectrofotômetro SPECTRONIC 20 (GENESIS). Este comprimento de onda é utilizado recorrentemente por pesquisadores para avaliação do crescimento desta microalga (GRIFFITHS *et al.*, 2011).

Figura 2 - Cultivo preliminar não-aerado



Fonte: o autor.

4.3 Cultivo aerado

O meio com fertilizante o qual apresentou o melhor resultado no ensaio preliminar (NPK 16:08:32) foi utilizado para o cultivo com aeração. Também foi utilizado meio sintético WC, para efeito de comparação. As culturas foram iniciadas com densidade celular de 1×10^5 células. ml^{-1} em frascos Erlenmeyer de 1 L contendo, inicialmente, 600 mL de meio. O pH foi ajustado para 7 após a preparação dos meios. Foram mantidos os mesmos parâmetros de fotoperíodo, iluminância e temperatura do ensaio preliminar. Os frascos foram providos de aeração através de bombas de ar mantidas em bancadas adaptadas. O experimento foi realizado em triplicata, como pode ser visto na Figura 3.

Figura 3 - Cultivo aerado



Fonte: o autor

Em dias úteis (durante 11 dias), foram retiradas alíquotas de 15 mL, a fim de se realizar leituras de absorbância a 680 nm (GRIFFITHS et al., 2011), contagem de células e monitoramento do pH.

4.4 Cultivo em sistema aberto por meio de cubas

O objetivo de se crescer microalgas em cubas ou tanques é utilizar o conteúdo como inóculo para cultivos em maior quantidade, no caso para produção em piscina com volume útil de 4.700 L, bem como utilizar a biomassa de acordo com a finalidade do cultivo (extração de substâncias, alimentação de animais, etc) (LOURENÇO, 2006). O experimento, realizado em duplicata, foi conduzido em uma planta externa ao Laboratório de Desenvolvimento de Produtos e Processos (Figura 4).

Figura 4 - Vista parcial das cubas utilizadas para o crescimento de microalgas



Fonte: o autor.

Primeiramente as cubas foram higienizadas com sabão e lâ de aço e lavadas com água filtrada em filtro de carvão ativado. Após esse procedimento, houve a desinfecção com adição de solução de hipoclorito de sódio 2-2,5%, e, novamente, lavagem com água filtrada. Para obter concentração de 1,4g/L de meio nas cubas, foram pesados 105 g de meio NPK 19:19:19, o qual foi solubilizado em 1L de água destilada para posterior autoclavagem em frascos Erlenmeyer. Após o esfriamento dos meios concentrados, estes foram adicionados a 74 L de água filtrada já contidos em cada uma das duas cubas (com volume útil de 140 L), para posterior inóculo da microalga. As cubas têm formato esférico, o qual garante ocupação ótima do espaço e maior aproveitamento da radiação luminosa (LOURENÇO, 2006).

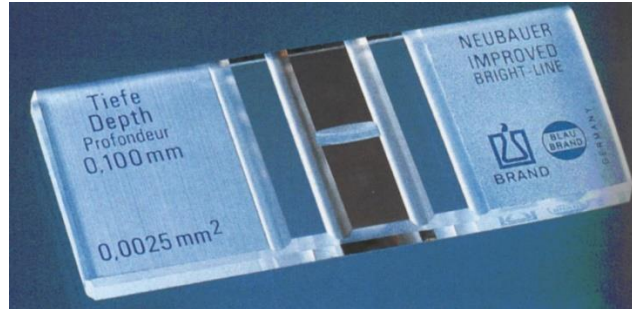
O cultivo foi iniciado com uma densidade celular de 1×10^5 células.ml⁻¹, sob luminosidade natural. Não houve fornecimento de dióxido de carbono nem controle do pH. Em dias úteis (durante 14 dias), foram retiradas alíquotas de 20 mL para realização de leituras de absorvância a 680 nm e contagem de células.

4.5 Contagem de células

Para se determinar a densidade celular dos cultivos foram feitas contagens de células em câmara de Neubauer. A câmara de Neubauer (Figura 5) consiste de uma lâmina de

microscopia, mais alta do que uma lâmina normal, com marcações em quadrantes de medidas conhecidas.

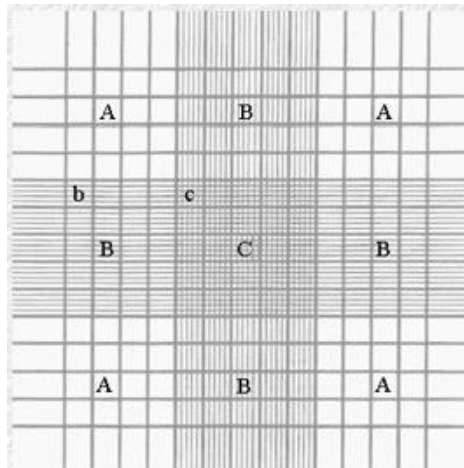
Figura 5 - Câmara de Neubauer



Fonte: (DIGILAB, 2012)

Ao observá-la no microscópio, é possível perceber que existem três tipos de quadrantes denominados A, B e C, que juntos formam um quadrado maior, como mostrado na Figura 6.

Figura 6 - Quadrantes observados na câmara de Neubauer.



Fonte: (CLÍNICA, 2011)

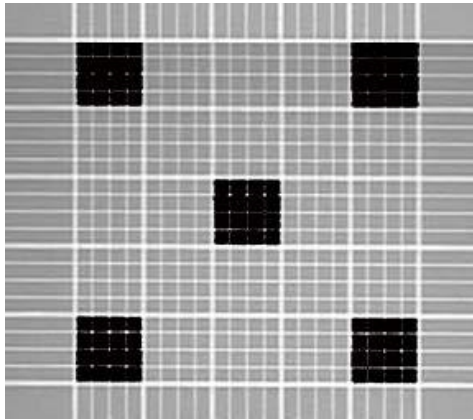
Nota-se que cada quadrante (A, B e C) tem sub-divisões diferentes, fazendo com que o critério para escolha do quadrante onde serão contadas as células seja o tamanho das células a serem quantificadas. Assim, células muito pequenas são contadas no quadrante C, as de tamanho intermediário no quadrante B, enquanto células grandes são contadas no quadrante A.

A área total compreendida pelos 9 quadrantes é de 9 mm^2 sendo que cada quadrante (A, B e C) são quadrados de $1 \times 1 \text{ mm}$. Ao ser colocada a lamínula (especial para ser usada na

câmara de Neubauer) a distância da lamínula até a lâmina (profundidade) mede 0,1 mm, o que permite se obter um volume de 0,1 mm³ em cada quadrante.

Pelo fato de *C. vulgaris* ter tamanho pequeno (2–10 µm), foi utilizado o quadrante C para contagem de células, sendo adotado o padrão de contagem mostrado na Figura 7 a seguir:

Figura 7 - Padrão de contagem de células na câmara de Neubauer.



Fonte: (ROUGE, 2012)

Sendo feitas as contagens de 5 quadrantes, foi utilizado um fator de multiplicação de 50.000 para se determinar a densidade celular (número de células por ml) dos cultivos (LOURENÇO, 2006). As contagens foram feitas com o microscópio óptico Modelo MA 107 (MARCONI).

4.6 Parâmetros de crescimento

4.6.1 Taxa instantânea de crescimento (ou taxa intrínseca de aumento)

A taxa instantânea de crescimento se aplica a culturas que apresentam variações numéricas relevantes ao longo do tempo, fornecendo uma expressão instantânea da mudança numérica a partir de um dado ponto (LOURENÇO, 2006). Pode ser calculada a partir da Equação 1:

$$r = \ln(N_t/N_0)/(t_2-t_1), \quad (1)$$

onde:

r = taxa instantânea de crescimento

\ln = logaritmo natural

N_t = número de células no final do intervalo de tempo

N_0 = número de células no início do intervalo de tempo

(t_2-t_1) = intervalo de tempo em dias

4.6.2 Duplicações por dia

A taxa de crescimento instantâneo pode ser convertida em duplicações por dia (ou velocidade de crescimento), representada por k . Assim, a velocidade de crescimento k foi determinada através da Equação 2 citada por Stein (1973):

$$k = (3,322/(T_2 - T_1)) \cdot (\text{Log } N_2/N_1), \quad (2)$$

onde:

k = velocidade de crescimento;

3.322 = fator de conversão do logaritmo base 2 a base 10;

$(T_2 - T_1)$ = intervalo de tempo em dias;

N_1 = densidade celular inicial;

N_2 = densidade celular final;

Log = Logaritmo em base 10.

4.6.3 Tempo de duplicação

O tempo de duplicação (T_2), ou tempo de geração, nos permite calcular o tempo necessário para a duplicação da cultura, ou seja, para que ocorra a formação de uma geração inteira de células no cultivo. É calculado através da divisão da constante $\ln 2$ (0,6931) pela taxa instantânea de crescimento r (LOURENÇO, 2006). É expresso pela Equação 3:

$$T_2 = 0,6931/r, \quad (3)$$

4.6.4 Análise Estatística

Para comparação das médias aritméticas das DCMs, empregou-se análise de variância (ANOVA) e o teste Tukey, usando o Minitab 17 Statistical Software, adotando-se o nível de significância de 5% de probabilidade.

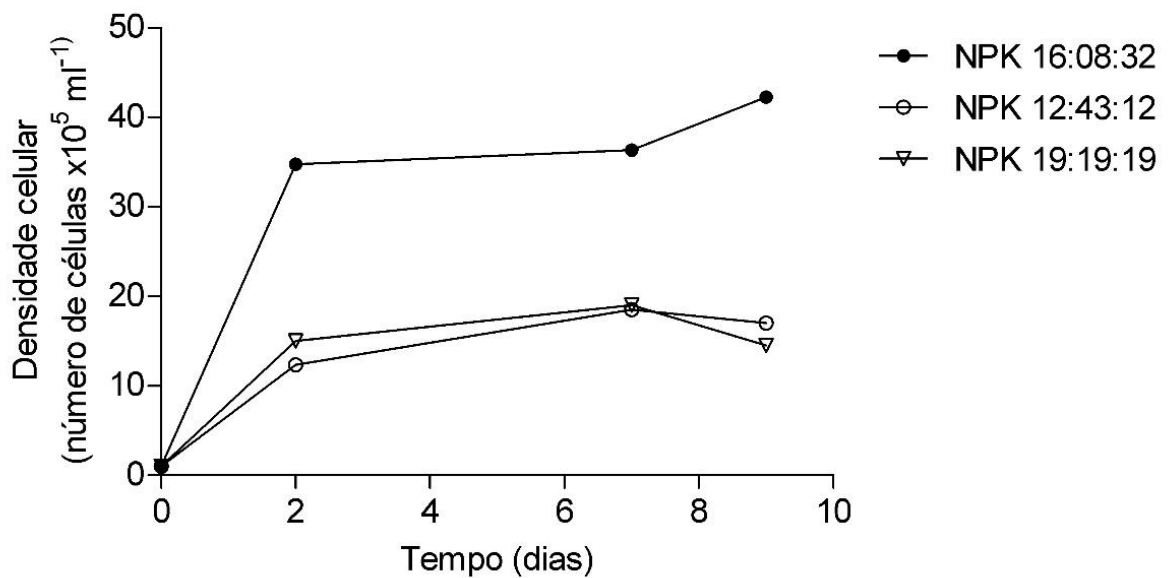
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Bancada

5.1.1 Ensaio preliminar

Nas Figuras 8 e 9 estão representadas as curvas de crescimento obtidas a partir das contagens de células em câmara de Neubauer, bem como das leituras de absorvância dos cultivos a 680 nm.

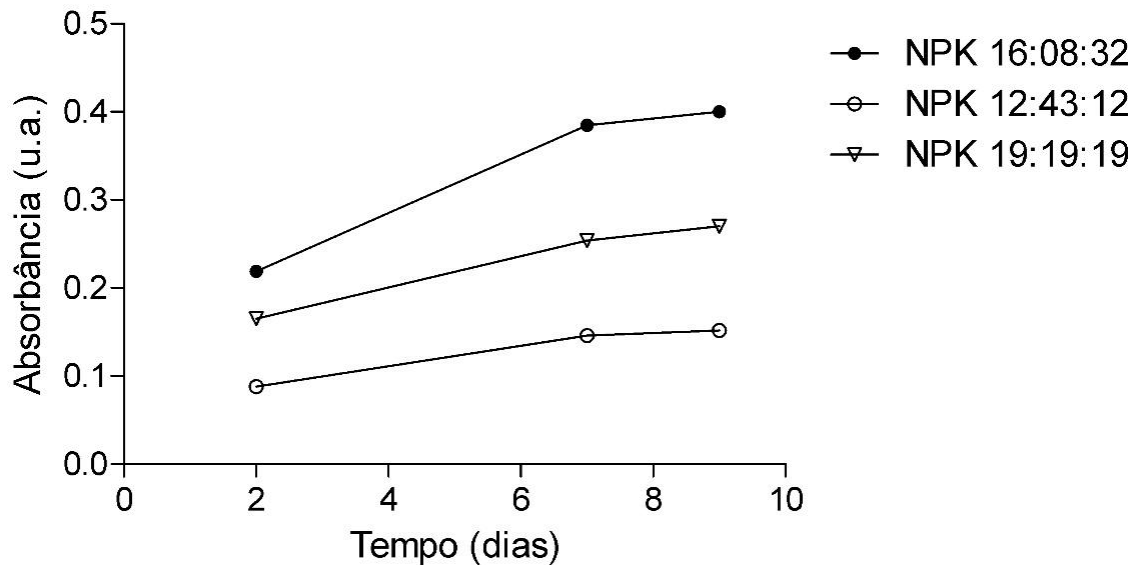
Figura 8 - Curvas de crescimento de *Chlorella vulgaris* nos ensaios com meios NPK em diferentes razões de nutrientes (densidade celular).



Fonte: o autor.

* Os valores de densidade celular representam a média de duas réplicas.

Figura 9 - Curvas de crescimento de *Chlorella vulgaris* nos ensaios com meios NPK em diferentes razões de nutrientes (absorbância).



Fonte: o autor.

*Os valores de absorbância representam a média de duas réplicas.

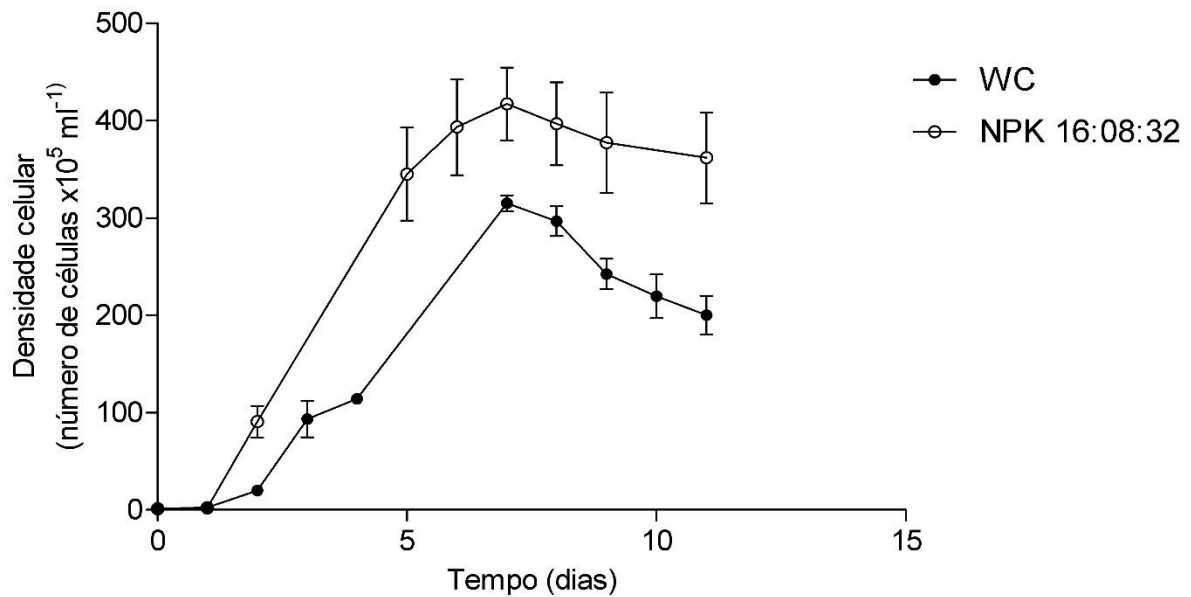
Diante das Figuras 8 e 9, é possível notar maiores valores de densidade celular e absorbância para o meio NPK com razão entre os nutrientes de 16:08:32, em um período de tempo comum aos outros meios. Portanto, foi o meio escolhido para comparação com o meio definido WC em cultivo aerado.

Em estudo no qual foi feita a comparação do efeito das razões entre os nutrientes do fertilizante NPK na densidade celular da microalga *C. vulgaris*, pôde-se perceber que as combinações que continham 50% de fósforo em relação a nitrogênio (8:4:2, 8:4:4, 12:6:4, 16:8:6 e 12:6:4), apresentavam maiores densidades de microalgas do que os outros grupos (18:8:4, 6:8:4, 8:8:4 e 12:8:4). Além disso, quando a concentração de fósforo é equivalente a de nitrogênio, houve supressão do crescimento (ASHRAF *et al.*, 2011).

5.1.2 Cultivos aerados

Nas Figuras 10 e 11 estão representadas as curvas de crescimento obtidas a partir da contagem de células e leituras de absorbância, respectivamente, dos cultivos com meios WC e NPK 16:08:32, o qual apresentou melhores resultados nos ensaios prévios.

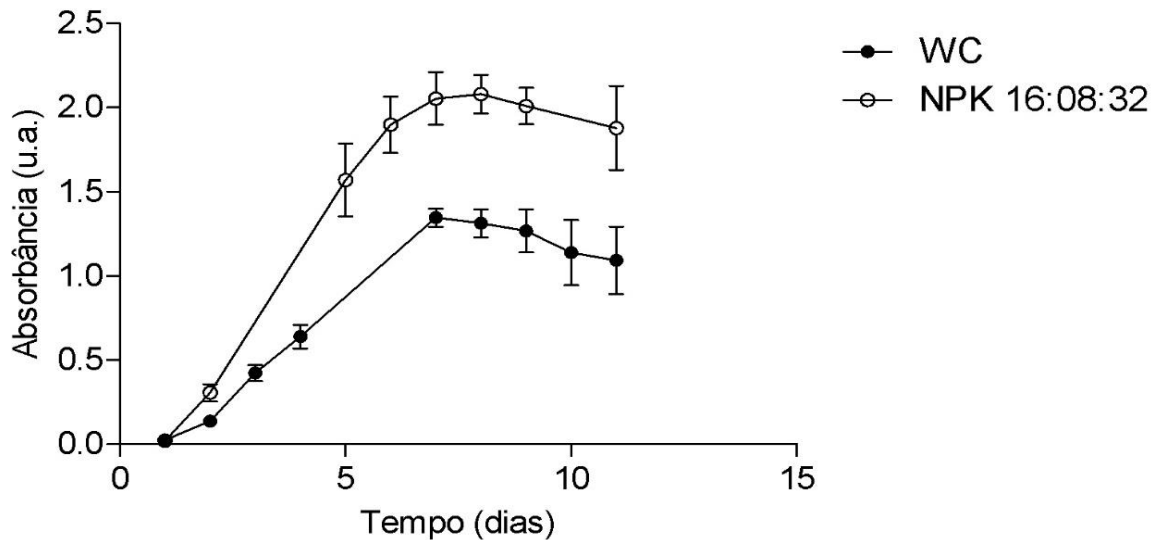
Figura 10 - Curvas de crescimento obtidas nos ensaios com meios WC e NPK 16:08:32 (densidade celular).



Fonte: o autor

* Os valores de densidade celular representam a média de três réplicas e o desvio padrão.

Figura 11 - Curvas de crescimento obtidas nos ensaios com meios WC e NPK 16:08:32 (absorbância).



Fonte: o autor.

*Os valores de absorbância representam a média de três réplicas e o desvio padrão.

É possível notar que o meio WC apresentou uma fase lag de dois dias (Figura 10), atingindo a fase de crescimento exponencial no terceiro dia. Já o meio NPK apresentou uma fase lag mais rápida, de apenas um dia, entrando na fase de crescimento exponencial no segundo dia. Percebe-se também que, a partir do sétimo dia de cultivo, ambos os meios entraram em fase de morte.

Nas Tabelas 3 e 4, estão presentes os dados de densidade celular e os parâmetros de crescimento do meio WC calculados a partir das Equações 1, 2 e 3.

Tabela 3 - Densidades de células de *Chlorella vulgaris* no tratamento com meio WC.

Meio WC										
Dia	0	1	2	3	4	7	8	9	10	11
Número de células ($\times 10^5$)*	1	2.33	20	93.33	114	315	296.66	242.33	219.66	200

Fonte: o autor.

*média de três réplicas.

Tabela 4 - Parâmetros de crescimento em meio WC (taxa de crescimento - r , divisões por dia - k e tempo de duplicação - T_2).

Intervalo de tempo (dias)	0 - 1	1 - 2	2 - 3	3 - 4	4 - 7	7 - 8	8 - 9	9 - 10	10 - 11	11-0
r	0.84	2.15	1.54	0.2	0.33	-0.05	-0.2	-0.09	-0.09	0.481
k	1.211	3.102	2.221	0.288	0.476	-0.072	-0.288	-0.129	-0.129	0.693
T₂	0.825	0.322	0.450	3.465	2.100	-13.86	-3.465	-7.701	-7.701	1.440

Fonte: o autor

*Parâmetros calculados com base nas medidas de densidade das células apresentadas na Tabela 3.

A partir dos dados da Tabela 4 é possível perceber que a microalga realizou mais de uma duplicação por dia nos 3 primeiros dias de cultivo, precisando de menos de um dia para completar uma duplicação. A partir do sétimo dia se inicia a fase de morte, quando os valores dos parâmetros se tornam negativos. Os valores de r e k obtidos ao final dos onze dias de cultivo foram 0,481 e 0,693, respectivamente. No sétimo dia de cultivo a população algal atingiu sua densidade celular máxima, de 315×10^5 células/ml (Tabela 3).

Nas Tabelas 5 e 6, estão presentes os dados de densidade celular e os parâmetros de crescimento do meio NPK calculados a partir das Equações 1, 2 e 3.

Tabela 5 - Densidades de células de *Chlorella vulgaris* no tratamento com meio NPK 16:08:32.

Meio NPK									
Dia	0	1	2	5	6	7	8	9	11
Número de células ($\times 10^5$)*	1	2	90.66	345	393.33	417	396.66	377.33	361.66

Fonte: o autor.

*média de três réplicas.

Tabela 6 - Parâmetros de crescimento em meio NPK 16:08:32 (taxa de crescimento - r , divisões por dia - k e tempo de duplicação - T_2).

Intervalo de tempo (dias)	0 - 1	1 - 2	2 - 5	5 - 6	6 - 7	7 - 8	8 - 9	9 - 11	11-0
r	0.7	3.81	0.445	0.13	0.05	-0.05	-0.05	-0.02	0.535
k	1.009	5.497	0.642	0.187	0.072	-0.072	-0.072	-0.028	0.771
T₂	0.990	0.181	1.557	5.331	13.862	-13.862	-13.862	-34.655	1.295

Fonte: o autor

*Parâmetros calculados com base nas medidas de densidade das células apresentadas na Tabela 5.

Na Tabela 6, nota-se que, do primeiro para o segundo dia de cultivo, a cultura crescendo em meio NPK 16:08:32 realizou mais de 5 duplicações, resultado superior a qualquer dos valores de k obtidos com o meio WC. Também é possível perceber que a fase de morte se inicia a partir do sétimo dia, como também aconteceu com o cultivo em meio WC. Os valores de r e k obtidos ao final dos onze dias de cultivo foram 0,535 e 0,771, respectivamente, os quais foram superiores aos valores obtidos no cultivo com meio WC durante o mesmo período de cultivo. Nota-se, também, que o valor de tempo de geração (T_2) no cultivo com meio NPK (1,295) é menor que o do meio WC (1,440), o que indica que, no primeiro, as microalgas necessitam de menos tempo para formação de novas gerações. Também no meio NPK, no sétimo dia de cultivo a população algal atingiu sua densidade celular máxima, de 417×10^5 células/ml.

Realizou-se a comparação entre as médias das densidades celulares máximas (DCM) para os meios WC e NPK 16:08:32 e avaliou-se se as médias foram ou não significativamente diferentes.

Tabela 7 – Médias de Densidades Celulares Máximas para o Meio WC e para o Meio NPK 16:08:32.

Parâmetro	Meio WC	Meio NPK 16:08:32
Densidades celulares máximas (DCM)	315×10^5 a	417×10^5 b

*Médias que não compartilham uma mesma letra são significativamente diferentes.

Percebe-se, pela tabela, que cada o cultivo com o meio NPK 16:08:32 apresenta, no sétimo dia de cultivo, densidade celular máxima significativamente superior ao meio WC.

O maior crescimento de *C. vulgaris* no meio NPK 16:08:32 pode ser explicado pelo fato de que há maiores concentrações de nitrogênio disponível para o consumo da microalga neste meio (0,112 g/L) em relação ao meio sintético WC (0,085 g/L).

Muñoz-Peñuela *et al.* (2012) quando comparando o crescimento de *C. vulgaris* entre cultivos em meio com o fertilizante NPK e o meio sintético chu₁₀, obteve valores de DCMs de $10.9 \pm 1.6 \times 10^6$ cel/mL e $2.2 \pm 0.6 \times 10^6$ cel/mL, respectivamente, também obtendo melhor crescimento em meio com fertilizante em relação a meio sintético.

Na Tabela 8, estão contidos os valores médios de pH para ambos os cultivos, em relação ao primeiro (1) e último dia (11):

Tabela 8 - Variação de pH nos meios WC e NPK entre o primeiro e último dia de cultivo

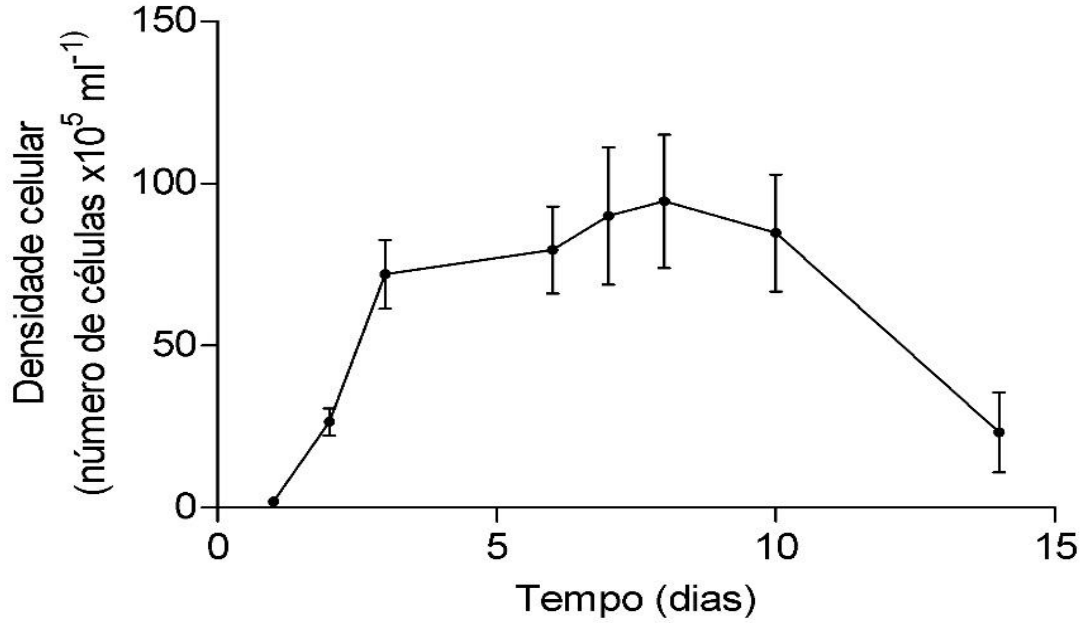
Dias	Meio WC	Meio NPK
1°	6.9	7
11 °	7.6	8

Nota-se que houve um aumento nos valores de pH em relação ao primeiro e último dia, o qual está relacionado com o consumo de CO₂ dissolvido no meio pelas microalgas através da fotossíntese (ROCHA, GARCIA e HENRIQUES, 2003). Em estudo sobre o efeito do pH no crescimento da *C. vulgaris* foi constatado que a microalga apresenta melhor crescimento na faixa de pH entre 5,5 a 8,0, na qual os cultivos desse estudo se mantiveram (MAYO e NOIKE, 1994).

5.2 Cultivo em sistema aberto por meio de cubas

Nas Figuras 12 e 13 estão representadas as curvas de crescimento obtidas a partir da contagem de células e leituras de absorvância, respectivamente.

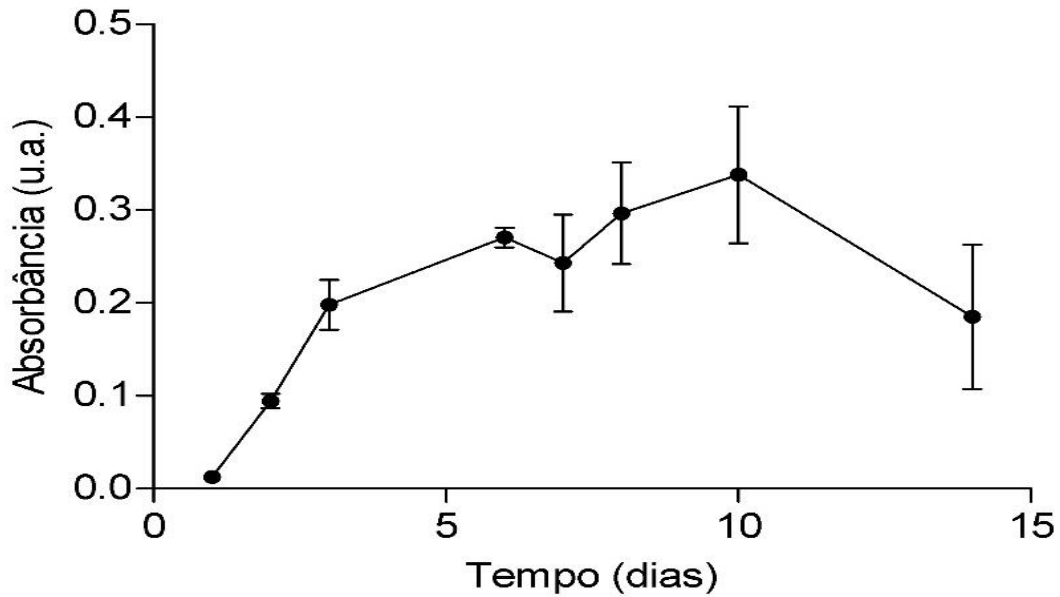
Figura 12 - Curva de crescimento de *Chlorella vulgaris* obtida no cultivo aberto em cubas (densidade celular).



Fonte: o autor.

*Os valores de densidade celular representam a média de duas réplicas e o desvio padrão.

Figura 13 - Curva de crescimento de *Chlorella vulgaris* obtida no cultivo aberto em cubas (absorbância).



Fonte: o autor

* Os valores de absorbância representam a média de duas réplicas e o desvio padrão.

É possível observar que, durante os três primeiros dias de cultivo, houve um rápido crescimento da microalga (crescimento exponencial), não havendo um aumento de células significativo nos dias posteriores, período em que se caracteriza a fase estacionária. A fase de morte se inicia no décimo dia. É importante ressaltar que ocorreu contaminação por rotíferos (animais aquáticos e microscópicos que consomem a microalga) (PEREDO-ALVAREZ *et al.*, 2003) em uma das cubas, a qual foi detectada no décimo dia de contagem.

A falta de cobertura nas cubas (mostradas na Figura 14), torna os cultivos alvos fáceis de pequenos insetos, os quais, assim como os rotíferos encontrados, podem prejudicar o crescimento algal. Portanto, deve-se considerar o uso de cobertura para se diminuir a probabilidade de contaminações, de forma que tal cobertura não prejudique a incidência de raios solares sobre o cultivo, o que prejudicaria a realização de fotossíntese pela microalga e, conseqüentemente, a produção de biomassa.

Figura 14 - Cubas utilizadas para o cultivo da microalga *Chlorella vulgaris*.



Fonte: o autor.

Ressalta-se ainda, que, se o objetivo do crescimento da microalga em cubas for a inoculação em cultivos maiores, as células deverão estar na fase exponencial do crescimento (no caso, entre o segundo e terceiro dias de cultivo), pelo fato de esta fase apresentar células em melhor estado fisiológico, facilitando, assim, sua aclimação no novo meio. Se o objetivo for aproveitamento de biomassa, o dia para coleta de células pode ocorrer depois da fase

exponencial, para que ocorra maior densidade de células e maior obtenção de biomassa, devendo-se porém, atentar para o fato de que, quanto mais tempo se leva para a coleta, mais tempo o cultivo está exposto ao meio ambiente, podendo haver contaminações indesejadas (LOURENÇO, 2006).

6 CONCLUSÕES

No presente estudo, ao se comparar o crescimento da microalga *Chlorella vulgaris* em meio de cultura sintético com fertilizante inorgânico de baixo custo em escala de bancada, observou-se um melhor crescimento microalgal neste último. Além disso, foi analisado o crescimento da microalga em cultivo aberto, também utilizando fertilizante inorgânico, o qual apresentou crescimento durante o tempo de cultivo, viabilizando o uso da biomassa tanto para inóculo de cultivos maiores, quanto para obtenção de compostos produzidos por estas microalgas.

REFERÊNCIAS

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

ASHRAF, M. et al. Replacement of Expensive Pure Nutritive Media with Low Cost Commercial Fertilizers for Mass Culture of Freshwater Algae, *Chlorella vulgaris*. **INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURE & BIOLOGY**, v. 13, p. 484-490, 2011.

ASLAN, S.; KAPDAN, I. K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. **Ecological Engineering**, v. 28, n. 1, p. 64–70, 2006.

BECKER, W. **Handbook of microalgal culture**. [S.l.]: [s.n.], 2004. 312– 351 p.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557–577, Fevereiro 2010.

CARLSSON, A.; BEILEN, J.; MOLLER, R.; CLAYTON, D. Micro and Macro-Algae: Utility for industrial applications. 2007.

CHUNG, I. K.; BEARDALL, J.; MEHTA, S.; SAHOO, D.; STOJKOVIC, S. Using marine macroalgae for carbon sequestration: a critical appraisal. **Journal of Applied Phycology**. 23. 877–886 p. 2011.

CLÍNICA, C. Câmaras de contagem. **Citologia Biomedicina**, 2011. Disponível em: <<http://citologia-biomedicina.blogspot.com.br/2011/03/camaras-de-contagem.html>>.

DEMIRBAS, M. F. Biofuels from algae for sustainable development. **Applied Energy**, v. 88, p. 3473–3480, 2011.

DIGILAB. Câmara de Neubauer. **Digilab website**, 2012. Disponível em: <http://www.digilablaboratorio.com.br/detail_produto.php?codprod=85>.

DITFURTH, H. **Im Anfang war der Wasserstoff**. 2. ed. Hamburgo: Hoffmann und Campe, 1972.

FERNANDES, B. et al. Starch determination in *Chlorella vulgaris*-a comparison between acid and enzymatic methods. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 5, p. 1203-1208, 2012.

FEUP. Crescimento bacteriano em sistema fechado – batch. **Universidade do Porto Faculdade de Engenharia**. Disponível em: <http://paginas.fe.up.pt/~ega12037/index_files/Page299.htm>. Acesso em: 2014.

FRANCISCO, E. C. et al. Microalgae as feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 85, n. 3, p. 395–403, 2012.

GRAHAM, L. E.; GRAHAM, J. M.; WILCOX, L. W. **Algae**. San Francisco: [s.n.], 2009.

GRIFFITHS, M. J. et al. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by. **Journal of Microbiological Methods**, p. 119-123, 2011.

GROBBELAAR, J. U. Quality Control and Assurance: crucial for the sustainability of the applied phycology industry. **Journal of Applied Phycology**, v. 15, p. 209-215, 2003.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. **Culture of Marine Invertebrate Animals**, p. 29-60, 1975.

GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. AlgaeBase. **Chlorella vulgaris Beyerinck [Beijerinck]**, 2014. Disponível em: <http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=gd1da6b97f340f66e&sk=0&from=results>. Acesso em: 10 Novembro 2014.

HIRANO, A. et al. CO₂ fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intracellular anaerobic fermentation. **Energy**, v. 22, n. 2-3, p. 137–142, 1997.

KEFFER, J. E.; KLEINHEINZ, G. T. Use of *Chlorella vulgaris* for CO₂ mitigation in a photobioreactor. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 5, p. 275-280, 2002.

KITADA, K. et al. Supercritical CO₂ extraction of pigment components with pharmaceutical importance from *Chlorella vulgaris*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 84, n. 5, p. 657-661, Maio 2009.

LEE, R. E. **Phycology**. 4th. ed. [S.l.]: Cambridge University Press, 2008.

LIANG, S.; LIU, X. Current microalgal health food R & D activities in China. **Developments in Hydrobiology**, v. 173, p. 45-48, 2004.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas - princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.

MAYO, A. W.; NOIKE, T. Response of mixed cultures of *Chlorella vulgaris* and heterotrophic bacteria to variations of pH. **Water Science and Technology**, v. 30, p. 285–294, 1994.

MORONTA, R.; MORA, R.; MORALES, E. Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 23, p. 27-41, 2006.

MUÑOZ-PEÑUELA, M. et al. Efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento y el contenido proteico de *Chlorella vulgaris*. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 25, n. 3, p. 438-449, 2012.

OHSE, S. et al. Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. **Biotemas**, v. 21, n. 2, p. 7-18, junho 2008.

OKAUCHI, M. The status of phytoplankton production in Japan. **Rotifer and microalgae culture systems**, Honolulu, p. 257-273, 1991.

PEREDO-ALVAREZ, V. M.; SARMA, S.S.S.; NANDINI, S. Combined effect of concentrations of algal food (*Chlorella vulgaris*) and salt (sodium chloride) on the population growth of *Brachionus calyciflorus* and *Brachionus patulus* (Rotifera). *Revista de Biología Tropical*. San José. v. 51, n. 2. Junho 2003.

RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology**. [S.l.]: [s.n.], 2004.

ROCHA, M. S. J.; GARCIA, J. E. C.; HENRIQUES, M. H. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. **Biomolecular Engineering**, v. 20, n. 4-6, p. 237-242, 2003.

ROUGE, M. Counting cells with a hemacytometer, 2012. Disponível em: <<http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/pathphys/reprod/semeneval/hemacytometer.html>>.

SANO, T. Effect of dried, powdered *Chlorella vulgaris* on experimental atherosclerosis and alimentary hypercholesterolemia in cholesterol-fed rabbits. **Artery**, v. 14, n. 2, p. 76-84, 1987.

SANO, T. et al. Effect of lipophilic extract of *Chlorella vulgaris* on alimentary hyperlipidemia in cholesterol-fed rats. **Artery**, v. 15, n. 4, p. 217-224, 1988.

SALISBURY, F.; ROSS, C. *Plant Physiology*. 3ª edição. 1985.

SINGH, A.; NIGAM, P. S.; MURPHY, J. D. Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 10–16, 2011.

SPOLAORE, P. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, p. 87-96, 2006.

STEIN, J. *Handbook of phycological methods; Culture methods and growth measurements*, Cambridge: University Press. 1973.

YAMAMOTO, M. et al. Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). **Journal of Plant Research**, v. 117, n. 4, p. 257-264, 2004.

ZHENG, H. et al. Disruption of *Chlorella vulgaris* Cells for the Release of Biodiesel-Producing Lipids: A Comparison of Grinding, Ultrasonication, Bead Milling, Enzymatic Lysis, and Microwaves. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 164, n. 7, August 2011.