

# Efeitos da depleção de nitrogênio sobre a biomassa e produção lipídica de três espécies de microalgas

Gustavo Benevides Martins & Valéria de Oliveira Fernandes

Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Av. Fernando Ferrari, 514, CCHN/Botânica, Goiabeiras, CEP 29075-910, Vitória, Espírito Santo, Brasil. martinsbenevides@gmail.com;valeriaufes@yahoo.com.br

Recebido em 04.IX.2014.

Aceito em 31.V.2016.

**RESUMO** – Para viabilizar a produção em larga escala de combustíveis a partir de microalgas, é necessário, no cenário atual, selecionar as espécies corretas, diminuir os custos e determinar as condições ideais de cultivo. As espécies *Chlorella vulgaris* Beijerinck, *Desmodesmus spinosus* (Chodat) E.Hegewald e *Ankistrodesmus fusiformis* Corda foram isoladas e cultivadas em laboratório, em condições controladas, sob duas concentrações estressantes de nitrato de sódio (10 g/L e 5 g/L). O crescimento foi monitorado por DO<sup>570</sup> e o conteúdo lipídico extraído pelo método de Bligh & Dyer (1959). O estresse em *D. spinosus* resultou em maior acúmulo lipídico, mas em drástica diminuição do crescimento. Tanto em *C. vulgaris* quanto em *A. fusiformis*, não foi verificada variação significativa no teor de lipídios totais ou no crescimento. Com respostas distintas aos tratamentos para cada espécie, evidencia-se a necessidade do conhecimento da fisiologia e autoecologia da cepa a ser cultivada em escala comercial.

**Palavras-chave:** cultivo, estresse, fitofisiologia, fitoplâncton

**ABSTRACT** – **Effects of nitrogen depletion on lipid and biomass production of three microalgae.** It is still necessary to select the correct species, reduce production costs and determine the optimal growth conditions, in order to make large-scale production of fuels derived from microalgae feasible. The species *Chlorella vulgaris* Beijerinck, *Desmodesmus spinosus* (Chodat) E.Hegewald and *Ankistrodesmus fusiformis* Corda were isolated and cultured in laboratory under controlled conditions under two stressful concentrations of sodium nitrate (10 g/L and 5 g/L). Growth was monitored by OD<sup>570</sup> and the lipid content extracted through Bligh & Dyer (1959) method. Stressing *D. spinosus* increased lipid accumulation, but also a dramatic decrease in growth. *C. vulgaris* did not show any significant change in total lipid content or growth. Both *C. vulgaris* and *A. fusiformis* showed no significant variation in total lipid content or growth, with only subtle changes. With different responses to the treatments for each species, it becomes clear the need for knowledge on the physiology and autoecology of the strain for commercial scale production.

**Keywords:** culturing, phytophysiology, phytoplankton, stress

## INTRODUÇÃO

Microalgas são micro-organismos fotossintetizantes que convertem luz, água, nutrientes e dióxido de carbono em biomassa, que pode ser empregada na obtenção de biocompostos, como suplemento alimentar humano, alimento animal ou fonte de óleo, que pode ser convertido em biodiesel com a utilização de tecnologias já existentes, como a transesterificação (Chisti 2007, Banerjee *et al.* 2002).

O cultivo de microalgas é um processo que se dá, após o isolamento da cepa, pela inoculação da espécie escolhida em meio aquoso contendo nutrientes. Em laboratório, tradicionalmente utilizam-se meios de cultura com concentrações de macro e micronutrientes pré-estabelecidas, e o cultivo é feito em ambiente fechado, com iluminação artificial e temperatura controlada. Tal procedimento permite não somente a produção de biomassa, mas também fornece informações básicas sobre as espécies cultivadas, úteis para o conhecimento de seu ciclo de vida, autoecologia e fisiologia. O estresse visando obter respostas fisiológicas das culturas se dá, em geral, pela manipulação das condições de cultivo, como: iluminação, aeração, pH, ou concentrações de nutrientes do meio de cultura (Lourenço 2006).

Pode-se, basicamente, cultivar qualquer espécie de alga em laboratório; entretanto, as que apresentam rápido crescimento, altas taxas de produção de lipídios, alta resistência a contaminação por fungos e bactérias, e alta competitividade com outras espécies de algas são preferidas quando se objetiva a produção de biomassa (Lourenço 2006). Duas das três espécies cultivadas no presente estudo pertencem à classe *Chlorophyceae*, cujos representantes usualmente apresentam rápido crescimento e tolerância às condições de cultivo, com espécies já amplamente estudadas em cultivo e produzidas para alimentar organismos aquáticos, extração de carotenoides ou mesmo na alimentação e suplementação humana (Lourenço 2006).

O gênero *Chlorella* Beijerinck pertence à classe *Trebouxiophyceae*, possui cerca de 14 espécies (Bicudo & Menezes 2005) e é amplamente estudado em cultivo, tendo sido um dos primeiros com registro de cultivo em laboratório, com o trabalho de Beijerinck (1890). Essas algas são conhecidas pelo fato de sob condições desfavoráveis e variáveis, como por exemplo, luz ou estresse de temperatura, serem altamente produtivas, e por conta disso, já vem tendo seu potencial produtor de biodiesel pesquisado (Doebbe *et al.* 2007, Li *et al.* 2007, Demirbas 2008, Gouveia & Oliveira 2009, Mata *et al.* 2010, Yang *et al.* 2011), sendo que algumas espécies, como

*Chlorella emersonii*, possuem conteúdo lipídico que pode chegar até 63% em conjunto com uma alta produtividade (Mata *et al.* 2010).

*Ankistrodesmus* Corda pertence à classe *Chlorophyceae*, abrange cerca de 11 espécies e consta entre os gêneros mais comuns em coletas de plâncton (Bicudo & Menezes 2005). Em cultivo, foi registrado um conteúdo lipídico de 24 a 31 % da massa seca algácea (Mata *et al.* 2010).

Tendo de 100 a 120 espécies (Bicudo & Menezes 2005), o gênero *Desmodesmus* An, Friedl & Hegewald pertence à classe *Chlorophyceae* e abrange espécies reconhecidamente resistentes a variações ambientais e competição com outras espécies de algas, sendo dessa forma, um gênero potencialmente interessante para o cultivo em larga escala, onde esses fatores tem maior interferência (Pan *et al.* 2011). Sua resistência torna possível uma boa produtividade de biomassa em meio de cultura produzido com efluentes, apesar do baixo conteúdo lipídico (Samori *et al.* 2013). Entretanto, Hu *et al.* (2013) verificaram produção lipídica de 50% da massa seca algácea em uma cepa de *Desmodesmus* sp. em condições de alta luminosidade e baixa concentração de nitrogênio.

Apesar do biodiesel a partir de microalgas apresentar possibilidade de produção em escala comercial, algumas barreiras precisam ainda ser transpostas para que essa produção possa ser economicamente e ambientalmente viável. Isso inclui o aumento da produtividade em larga escala pela maximização do acúmulo lipídico e produção de biomassa, diminuição da energia utilizada para manter as culturas, e coleta de biomassa, extração de óleo por métodos mais simples e baratos que os disponíveis atualmente (Chisti 2007, Lardon *et al.* 2009, Mata *et al.* 2010, Rodolfi *et al.* 2009).

Assim sendo, o estresse por limitação de nitrogênio se mostra uma forma potencial de aumentar o conteúdo lipídico das microalgas e conseqüentemente a produção de óleo. Entretanto, não existe ainda um consenso sobre o assunto. Ao passo que autores como Tornabene *et al.* (1983), Macedo & Alegre (2001), Hu *et al.* (2008) sugeriram que menores concentrações de nitrogênio no meio de cultura acarretam em maior acúmulo lipídico, outros como Thomas *et al.* (1984) e Feng *et al.* (2011) afirmaram justamente o contrário. E ainda Griffiths & Harrison (2009) e Lardon *et al.* (2009) verificaram que condições de estresse por nitrogênio aumentam o conteúdo lipídico em detrimento do crescimento, podendo não aumentar a produção lipídica de fato.

Por não haver um consenso em relação aos efeitos da privação de nitrogênio sobre as culturas, o presente trabalho objetivou verificar quais as influências no crescimento e no acúmulo de lipídios totais de três espécies de microalgas *Chlorophyceae* com potencial para a produção de biodiesel em escala comercial.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Isolamento e cultivo

Foi realizada coleta do fitoplâncton em uma lagoa artificial urbana na cidade de Vitória, Espírito do Santo, no Campus Alvor de Queiroz Araújo da Universidade Federal do Espírito Santo, com auxílio de rede de plâncton com malha de 20  $\mu\text{m}$ . Dessa amostra, foram isoladas as cepas *D. spinosus* e *A. fusiformis* por pipetagem e diluições sucessivas (Lourenço 2006) e deposição no banco de cepas do Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Algas Continentais (LATEAC); a cepa de *C. vulgaris* foi cedida pela Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce da UFSCar. As cepas de *D. spinosus* e *A. fusiformis* foram identificadas de acordo com Sant'Anna (1984) e Godinho (2009).

Após isolamento, foi feito o cultivo de 500mL das cepas de *D. spinosus* e *A. fusiformis* em Erlenmeyer de 1 L em meio BBM para servirem como inóculo para o experimento. De acordo com a resposta em testes piloto, padronizou-se o inóculo inicial para conter um milhão de células, uma vez que esse número permitiu uma dominância das algas em relação a possíveis bactérias existentes no meio, para atingir mais rapidamente a fase estacionária de crescimento e, conseqüentemente, acúmulo máximo de lipídios. As células foram contadas em câmara de Fuchs-Rosenthal e em réplicas.

O experimento foi realizado em Erlenmeyer de 1 L contendo 500 mL de meio de cultura BBM em incubadora sob condições controladas de temperatura a 26 °C ( $\pm 1$ ), aeração por borbulhamento a pressão ambiente e luminosidade fornecida por lâmpadas fluorescentes, com intensidade de 108 mmol de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (8000 LUX), fotoperíodo de 12 h e pH 7.

O nitrogênio do meio de cultura, sob a forma de nitrato de sódio, foi manipulado para testar duas concentrações estressantes de nitrogênio (40% e 20%), além do controle, sendo esta a padrão do meio de cultura. As condições foram obtidas com a produção de novas soluções estoque de nitrato de sódio com as concentrações desejadas de 25,0 g/L, 10 g/L e 5 g/L. Com o preparo de 1 L de solução, as soluções estoque foram diluídas, alcançando-se as concentrações finais no meio expressas na Tabela 1. Foram feitas três repetições de cada condição, totalizando nove cultivos por espécie estudada. Cada espécie (*D. spinosus*, *C. vulgaris* e *A. fusiformis*) recebeu um código de identificação (D, C e A respectivamente) que foi utilizado para gerar o código de cada unidade experimental.

**Tabela 1.** Concentrações e porcentagens de  $\text{NaNO}_3$  utilizadas no experimento.

Tratamentos	Concentração de $\text{NaNO}_3$ (g/L)	Porcentagem (%)
C	0,25	100
T1	0,10	40
T2	0,05	20

### Curva de crescimento e obtenção de biomassa

A cada 48 h foram retiradas alíquotas de 7 mL para determinação da densidade celular por análise em espectrofotometria óptica em 570 nm, sempre em duplicatas. As leituras foram iniciadas um dia após a inoculação das cepas no meio de cultura. No decorrer do experimento, foram observadas as fases de crescimento, sendo diariamente, os frascos foram observados a olho nu para a coleta de dados das características visuais das culturas, e comparados com os dados das fases de crescimento obtidos pela DO<sup>570</sup>.

Após atingirem a fase estacionária, os cultivos foram interrompidos. As culturas foram então centrifugadas a 4500 rpm até observar-se um sobrenadante incolor. A biomassa foi recolhida, liofilizada e pesada.

#### Determinação do conteúdo lipídico

Em estudos anteriores, como Lee *et al.* (1998) e Widjaja *et al.* (2009) foi observada maior eficácia de extração de lipídios totais com a combinação de clorofórmio e metanol na proporção 1:2 como solventes, sendo por isso o método de Bligh & Dyer (1959) o mais frequentemente utilizado e o selecionado para o presente estudo.

A biomassa seca foi colocada em béquer, onde foram adicionados 2 mL de água destilada para cada 0,5 g de biomassa seca. À biomassa úmida foram adicionados 7,5 mL de solução clorofórmio: metanol 1:2 seguido da agitação manual por 3 min. Em seguida foram adicionados 10 mL de solução de sulfato de sódio anidro 1,5% e 2,5 mL de água destilada, e novamente, feita agitação manual por 30 s. A biomassa foi então separada por centrifugação a 4500 rpm durante 10 min e filtrada em papel filtro. A fase orgânica foi transferida para béquer e seca em estufa a 60 °C até massa constante, restando somente os lipídios totais na forma sólida, que foram pesados em balança analítica.

Relacionando a DO<sup>570</sup> no último dia de cada cultura à pesagem de lipídios totais, foram obtidas as concentrações de biomassa correspondentes para cada dia de cultivo.

#### Análise dos dados

Os valores de absorvância, lipídios totais, concentração de lipídios (%) e biomassa final foram submetidos aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk no programa ASSISTAT Versão 7.7 beta, seguidos de ANOVA e teste de Tukey em nível de significância de 5 % para cada dia de análise, comparando os tratamentos entre si.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Características visuais das culturas

No decorrer do desenvolvimento das culturas, a principal alteração observada macroscopicamente foi a mudança de cor entre os tratamentos, onde *C. vulgaris* e *A. fusiformis* apresentaram respostas semelhantes. Na fase exponencial, ambas as culturas possuíam coloração verde-claro, sem grande distinção entre os tratamentos. Na fase estacionária, as culturas do controle apresentaram tom de verde ligeiramente mais claro e mais amarelado, ao passo que as dos tratamentos tendiam para um tom

de verde mais escuro. As culturas de *D. spinosus*, apesar de iniciarem com a mesma coloração verde-claro, já nos primeiros dias apresentavam distinção entre as do controle e as submetidas ao estresse, sendo as últimas, ligeiramente mais amareladas. Quando o crescimento atingiu a fase estacionária, as culturas sob estresse apresentaram tom ainda mais amarelado, enquanto as culturas do controle, uma coloração verde-escuro.

Efeitos da depleção de nitrogênio sobre a produtividade, crescimento, massa seca e teor de lipídios totais

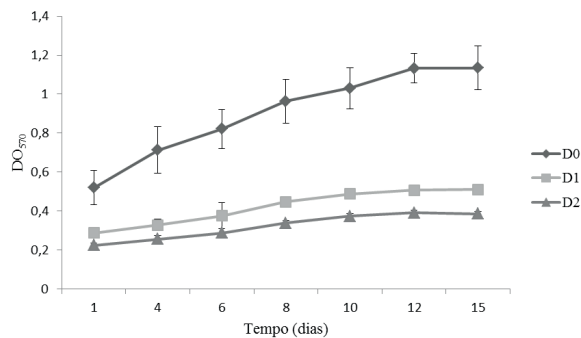
A figura 1 representa as curvas de crescimento das culturas de *Desmodosmus spinosus* submetidas a diferentes concentrações de nitrato de sódio. Nos tratamentos, foi observada menor densidade celular e crescimento mais lento, com entrada na fase estacionária por volta do dia 9. No controle, a fase estacionária foi iniciada no dia 12 e observou-se crescimento mais acentuado, se comparado com os tratamentos. Estatisticamente, desde o dia 1 (um dia após inoculação), o controle diferiu dos tratamentos, e estes não variaram entre si, tendo o controle alcançado valores de absorvância duas vezes maiores que o tratamento D1 e mais de três vezes maiores que os de D2, ao final do experimento.

No presente trabalho, foi possível aumentar o teor de lipídios de *D. spinosus* com menores concentrações de nitrato de sódio. Foram obtidos 13,25 mg de lipídios em 217,3 mg de biomassa no controle (6,09%), ao passo que em D1, foram 11,8 mg de lipídios em 90,4 mg de biomassa seca (13,05%), e em D2, 12,95 mg de lipídios para 85,1 mg de biomassa (15,21%). Apesar das menores quantidades de lipídios encontradas nos tratamentos, a porcentagem relativa à biomassa aumentou consideravelmente. Houve aumento de 114,2% do teor de lipídios totais em D1 e aumento de 149,7% em D2 (Tab. 2). Estatisticamente, no que diz respeito a massa e produtividade de lipídios totais, não houve variação entre o controle e os tratamentos (Tab. 3). Quanto a massa seca e sua produtividade, houve variação entre o controle e os tratamentos (GL=2; F=350,6003; p<0,001), sendo o controle 140% maior que D1, e 155,3% maior que D2. A massa seca ao longo dos dias para cada tratamento está representada na figura 2. Quanto à porcentagem de lipídios em relação a massa seca, houve variação significativa entre o controle e os dois tratamentos, e estes variaram entre si (GL=2; F=13,3496; p>0,0321), havendo acréscimo inversamente proporcional à concentração de nitrato de sódio.

*D. spinosus* apresentou menor crescimento e maior conteúdo lipídico em situações de privação de nitrogênio. Em condições de estresse, é comum observar-se alteração nas vias metabólicas das células, fazendo com que o metabolismo de carboidratos mude para a síntese de proteínas ou lipídios, sendo essa uma tentativa de adaptação ao meio em que as células se encontram, já que lipídios são mais ricos em energia do que carboidratos. É uma estratégia comum em diversos grupos, sendo já observada por outros autores, como Converti *et al.* (2009) e Feng *et al.* (2011). A privação de nitrogênio é considerada um estresse

pelas células; assim sendo o crescimento é suprimido e o acúmulo de lipídios é induzido.

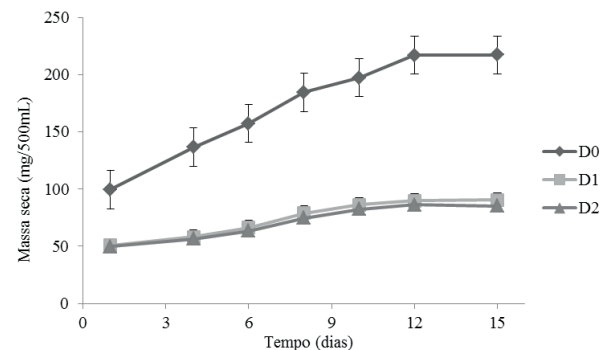
Hu *et al.* (2013) estudando os efeitos da alta luminosidade e baixa concentração de nitrato de sódio em *Desmodemus* sp. em meio BG-11, verificaram aumento do teor de lipídios de 55%, aliado a um maior crescimento. No presente trabalho, a condição de maior estresse apresentou um teor lipídico 149,7% maior do que no controle, mas com crescimento menor, como evidenciado na Figura



**Fig. 1.** Curvas de crescimento das culturas de *Desmodemus spinosus* submetidas a diferentes concentrações de nitrato de sódio (D0 = Controle; D1 = 40%; D2 = 20%).

1. Analisando-se as produtividades, evidencia-se que não houve alteração na produção de lipídios totais em baixas concentrações de nitrato de sódio, e diminuição da produção de biomassa. Dessa forma, sugere-se, para essa espécie, o uso de concentração entre 40% e 100% do total de nitrogênio do protocolo original do preparo do meio BBM, para obter maior produção de biomassa sem prejuízos à produção de lipídios totais.

Nenhum dos parâmetros analisados (biomassa, curva



**Fig. 2.** Massa seca das culturas de *Desmodemus spinosus* submetidas a diferentes concentrações de nitrato de sódio (D0 = Controle; D1 = 40%; D2 = 20%).

**Tabela 2.** Teores de lipídios totais e porcentagem de acordo com a massa seca obtida em cada espécie (D = *D. spinosus*; C = *C. vulgaris*; A = *A. fusiformis*) e cada tratamento com diferentes porcentagens de nitrato de sódio no meio de cultura (0 = Controle, 1 = 40%, 2 = 20%).

Tratamentos	Massa seca (mg/500mL)	Lipídios totais (mg)	Teor lipídios (%)
A0	174,20	41,80	23,90
A1	197,10	37,45	19,00
A2	194,50	36,45	18,70
C0	130,60	16,65	12,70
C1	134,80	17,25	12,70
C2	146,30	21,95	15,00
D0	217,30	13,25	6,09
D1	90,40	11,80	13,05
D2	85,10	12,95	15,21

**Tabela 3.** Produtividade de biomassa e lipídios em cada espécie (D = *D. spinosus*; C = *C. vulgaris*; A = *A. fusiformis*) e cada tratamento com diferentes porcentagens de nitrato de sódio no meio de cultura (0 = Controle, 1 = 40%, 2 = 20%).

Tratamentos	Produtividade biomassa (mg.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )	Produtividade Lipídios (mg.L <sup>-1</sup> .d <sup>-1</sup> )
A0	18,31	4,40
A1	20,74	3,94
A2	20,47	3,82
C0	16,32	2,08
C1	16,84	2,15
C2	18,28	2,74
D0	28,96	1,76
D1	12,04	1,57
D2	11,34	1,72

de crescimento e teor de lipídios totais) foi afetado com a privação de nitrogênio em *C. vulgaris*. Foram obtidos 16,65 mg de lipídios em 130,6 mg de biomassa no controle (12,7%), 17,25 mg de lipídios em 134,8 mg de biomassa seca (12,7%) em C1, e 21,95 mg de lipídios para 146,3 mg de biomassa (15,0%) em C2 (Tab. 2). As produtividades de lipídios totais e biomassa, evidenciadas na Tabela 2, mostraram-se também inalteradas. Em relação às curvas de crescimento, *C. vulgaris* não apresentou diferença significativa entre o controle e os tratamentos, todos apresentando curvas semelhantes, com a fase estacionária sendo iniciada por volta do dia 13 e fase *lag* durando até o dia 4 (Fig. 3). Os resultados da ANOVA não revelaram diferenças significativas para as porcentagens de lipídios (GL=2; F=0,0516; p<0,05), massa de lipídios (GL=2; F=0,6639; p<0,05), ou de biomassa (GL=2; F=6,799; p=0,0768). As curvas de massa seca ao longo dos dias de cultivo mostram o mesmo (Fig. 4).

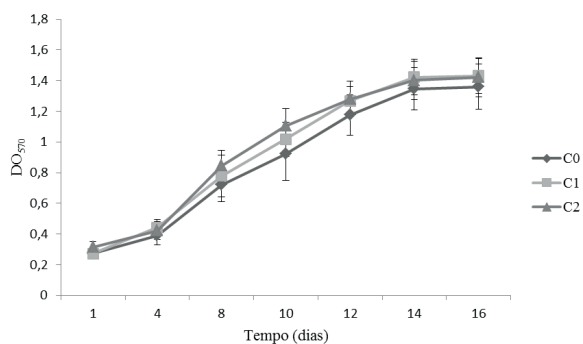
Apesar da depleção de nitrogênio costumeiramente resultar em maior acúmulo lipídico em detrimento da multiplicação celular, as *Chlorophyta* de modo geral mostram grande variedade de respostas à deficiência de nitrogênio, e a resposta da produtividade de biomassa à limitação de nutrientes pode variar bastante entre os táxons, estando essa ligada à fisiologia e à autoecologia da espécie (Borowitzka & Borowitzka 1988, Rodolfi *et al.* 2009). Além disso, a depleção de nitrogênio pode nem sempre resultar em aumento do conteúdo lipídico total, mas sim na alteração da composição lipídica (Borowitzka & Borowitzka, 1988, Hu *et al.* 2008). Dentro do gênero *Chlorella*, foram registradas algumas espécies que acumulavam amido na carência de nitrogênio, enquanto outras acumulavam lipídios neutros (Hu *et al.* 2013).

Ainda que sejam encontrados muitos relatos sobre a produtividade de *Chlorella vulgaris*, muitas vezes torna-se difícil a comparação entre os dados obtidos em função das diferentes condições descritas, como intensidade de luz e aeração. Liang *et al.* (2009) compararam a produtividade em biomassa para *C. vulgaris* quando mantida sob diversas

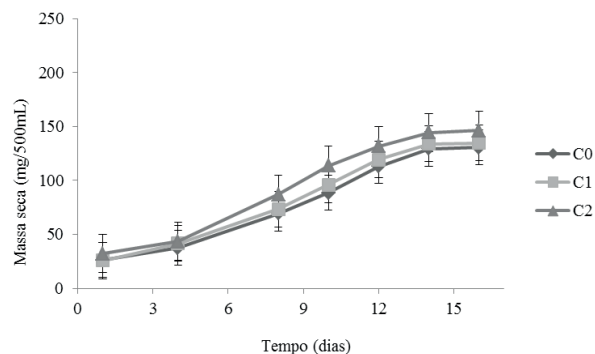
condições de cultivo. Em cultivo autotrófico, as células foram cultivadas nas seguintes condições: 0,18 g/L de íon nitrato; 0,16 g/L de íon fosfato; vazão de ar de 200 mL/min e iluminação constante por lâmpadas fluorescentes. Após 23 dias de crescimento celular, foi obtida produtividade em biomassa de 10,0 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> e teor lipídico de 22%, com produtividade lipídica de 22,0 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. No presente estudo, a maior produtividade de lipídios (2,74 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>) e de biomassa (18,28 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>), ainda que estatisticamente igual aos outros tratamentos, foi obtida em C2 (Tab. 3) ao final de 16 dias de cultivo.

Converti *et al.* (2009) avaliaram a influência de diferentes concentrações de nitrato de sódio no teor lipídico das microalgas *Nannochloropsis oculata* e *Chlorella vulgaris* cultivadas a 70 μmol de fótons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. A microalga marinha *N. oculata* foi avaliada em concentrações de 0,075 g/L, 0,15 g/L e 0,30 g/L de NaNO<sub>3</sub> no meio de cultura; enquanto que a espécie dulcícola, *C. vulgaris*, foi cultivada em 0,375 g/L, 0,75 g/L e 1,5 g/L. Para *C. vulgaris*, foi observado aumento na produtividade em lipídios de 8,16 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para 20,30 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> ao reduzir a concentração de 1,5 g/L para 0,375 g/L de NaNO<sub>3</sub>. Já no caso de *N. oculata*, a redução de 0,30 g/L para 0,075 g/L de NaNO<sub>3</sub> no meio de cultura aumentou a produtividade de lipídios de 10,01 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup> para 16,41 mg.L<sup>-1</sup>.d<sup>-1</sup>. Contudo, nesse último caso também foi observada redução da taxa de crescimento celular.

O estudo de Tam & Wong (1996) com *C. vulgaris* demonstrou que em tratamentos de estresse por nitrogênio, tanto com elevadas concentrações de amônia (750 e 1000 mg/L), quanto com baixas (10 mg/L), acabaram por inibir o crescimento da microalga. Da mesma forma, Widjaja *et al.* (2009), testando a resposta da mesma espécie à privação de nitrogênio (0,02 mg/L, 0,028% do controle), obtiveram drástica diminuição do crescimento, acompanhada, entretanto, de aumento na produção lipídica. O fato de no presente estudo não terem sido observadas alterações no crescimento ou acúmulo de lipídios pode ser uma característica intrínseca da cepa, que se adaptou



**Fig. 3.** Curvas de crescimento das culturas de *Chlorella vulgaris* submetidas a diferentes concentrações de nitrato de sódio (C0 = Controle; C1 = 40%; C2 = 20%).



**Fig. 4.** Massa seca das culturas de *Chlorella vulgaris* submetidas a diferentes concentrações de nitrato de sódio (C0 = Controle; C1 = 40%; C2 = 20%).

rapidamente às condições de estresse impostas.

Morgan-Kiss *et al.* (2008) obtiveram um espécime com alta versatilidade em mudanças ambientais, podendo crescer sem problemas em ambientes com grandes variações de temperatura e luminosidade, inclusive em ausência desta. Conclui-se que para a cepa de *C. vulgaris* isolada, o meio BBM pode ser produzido com uma quantidade reduzida de nitrato de sódio em até 80% sem causar alterações significativas na produção, representando assim, uma diminuição do uso de um dos principais reagentes para a produção do meio, e consequente redução do custo.

Assim como em *C. vulgaris*, não foi obtida variação significativa entre as curvas de crescimento do controle e dos tratamentos em *A. fusiformis* para nenhum dia de experimento. Obteve-se uma fase *lag* durando até o dia 8 e estacionária tendo início no dia 16 (Fig. 5). Foram obtidos 41,80 mg de lipídios em 174,2 mg de biomassa no controle (23,9%), 37,45 mg de lipídios em 197,1 mg de biomassa seca (19%) em A1, e 36,45 mg de lipídios para 194,5 mg de biomassa (18,7%) em A2 (Tab. 2). As produtividades de lipídios e de biomassa se mantiveram estáveis em todos os tratamentos durante o curso do experimento (Fig. 6). Os resultados da ANOVA não revelaram diferenças significativas para as porcentagens (GL=2; F=0,9686;  $p < 0,05$ ), massa de lipídios (GL=2; F=0,9015;  $p < 0,05$ ), ou de massa seca (GL=2; F=7,991;  $p = 0,0628$ ).

Ao estressar culturas de *A. falcatus*, Kalita *et al.* (2011) obtiveram 43%, 48%, 56,1% e 51,2% de lipídios totais em relação a massa seca em diferentes concentrações de cloreto de sódio (0,04 M, 0,08 M, 0,17 M e 0,34 M, respectivamente), em meios BBM e BG-11, temperatura a 25°C e fotoperíodo 16:8. Carolino (2011) encontrou para *A. fusiformis*, conteúdo lipídico de 17,1% em condições normais de nutrientes em meio BBM, temperatura de aproximadamente 22°C e fotoperíodo de 14:10.

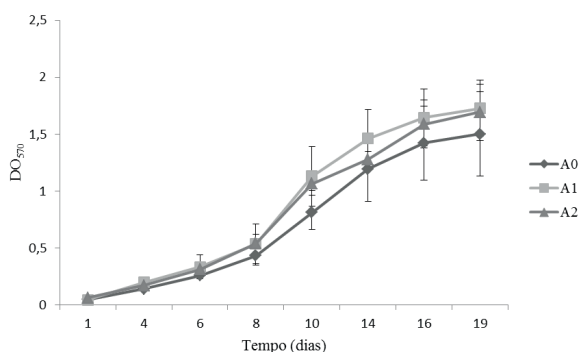
O presente estudo avaliou o desempenho de *A. fusiformis* em condições distintas (25 °C, fotoperíodo 12:12), resultando em maior concentração de lipídios totais em relação a massa seca no controle e nos dois tratamentos

em relação ao estudo supracitado. A espécie é ainda pouco estudada e a disponibilidade de nutrientes é apenas um entre vários fatores que influenciam o metabolismo de lipídios e afetam o crescimento algal, como a temperatura e a luminosidade (Verma *et al.* 2010).

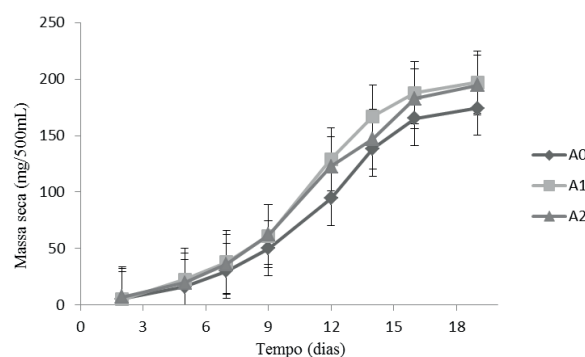
De forma a melhor compreender o metabolismo e a autoecologia em *A. fusiformis*, seria importante num trabalho futuro, avaliar o efeito destas variáveis no conteúdo lipídico, a composição química das células ao longo do crescimento, bem como o conhecimento da quantidade de carbono fixado e as quantidades de nutrientes, em especial o nitrogênio e fósforo, presentes no meio de cultura.

A composição bioquímica e a fisiologia das microalgas não é totalmente conhecida mediante a infinidade de espécies ainda não estudadas sob este foco, o que faz delas uma fonte ilimitada de diversos produtos de interesse biotecnológico (Baumgartner *et al.* 2013), muito embora o interesse comercial que pode ser obtido delas seja algo imprevisível. Muitos trabalhos têm sido realizados visando a procura por espécies que não somente sejam promissoras para a produção em larga escala de biodiesel, mas que também possuam elevado potencial em produtividade de biomassa e seus subprodutos (Richmond 2004). Entretanto, ainda são necessários mais esforços para a busca por espécies e por condições de cultivo que permitam o acúmulo dos compostos de interesse, bem como a busca por medidas que visem à redução dos custos de sua produção com aumento de produtividade em lipídios ou biomassa.

A taxa de crescimento e o conteúdo lipídico são dois parâmetros essenciais quando se pretende fazer uma seleção de microalgas com elevada produção de lipídios. As respostas ao estresse por nitrogênio podem variar de acordo com o táxon e a cepa isolada, apresentando respostas distintas, fazendo com que a eficiência de produção seja maior ou menor. Evidencia-se, portanto, a importância do conhecimento das características fisiológicas da espécie a ser cultivada, e de estudos preliminares das condições ótimas para a cepa isolada, visando a produção de biodiesel em escala comercial.



**Fig. 5.** Curvas de crescimento das culturas de *Ankistrodesmus fusiformis* submetidas a diferentes concentrações de nitrato de sódio (A0 = Controle; A1 = 40%; A2 = 20%).



**Fig. 6.** Massa seca das culturas de *Chlorella vulgaris* submetidas a diferentes concentrações de nitrato de sódio (A0 = Controle; A1 = 40%; A2 = 20%).

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo pelo auxílio financeiro através da concessão da bolsa de mestrado; à Dra. Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira do Instituto Nacional de Tecnologia-RJ (INT/RJ), pela concessão da cepa de *Chlorella vulgaris*, proveniente da Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce da UFSCar.

## REFERÊNCIAS

- Baumgartner, T.R.S., Burak, J.A.M., Kogikoski, M.E., Sebastien, N.Y. & Arroyo, P.A. 2013. Avaliação da produtividade da microalga *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat em diferentes meios de cultivo. *Revista Brasileira de Biociência* 11(2):250-255.
- Banerjee, A., Sharma, R., Chisti, Y. & Banerjee, U.C. 2002. *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. *Critical Review Biotechnology* 22:245-279.
- Beijerinck, M.W. 1890. Culturversuche mit zoochlorellen, lichengonidien und anderen niederen algaen. *Botanische Zeitung*, 48:725-785.
- Bicudo, C.E.M. & Menezes, M. 2005. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil (chave para identificação e descrições). RiMa, São Carlos. 508 p.
- Bligh, E.G. & Dyer, W.J. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37:911-917
- Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. 1988 *Microalgal biotechnology*. Cambridge university press, Cambridge. 477 p.
- Carolino, L.R.V. 2011 Cultivo de microalgas unicelulares para determinação da produção lipídica e sequestro de carbono. Tese 80 f., Universidade de Lisboa, Faculdade de ciências, Lisboa.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25(3):294-306.
- Converti, A., Casazza, A. A., Ortiz, E. Y., Perego, P. & Del Borghi, M. 2009. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing* 48:1146-1151.
- Demirbas, A. 2008. Energy sources, part a: recovery, utilization, and environmental effects. *Energy Sources* 31:163-168.
- Doebbe, A., Rupprecht, J. & Beckmann, J. 2007. Functional integration of the hup1 hexose symporter gene into the genome of *C. reinhardtii*: Impacts on biological h<sub>2</sub> production. *Journal of Biotechnology* 131:27-33.
- Feng, D., Chen, Z., Xue, S. & Zhang, W. 2011. Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (chrysochyta) by nitrogen supplement. *Bioresource Technology* 102:6710-6716.
- Godinho, L.R. 2009. Família Scenedesmaceae no Estado de São Paulo: Levantamento Florístico. Tese 204 f., Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.
- Gouveia, L. & Oliveira, A.C. 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production. *Biotechnology* 36:269-274.
- Griffiths, M.J. & Harrison, S.T.L. 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*. 21:493-507.
- Hu, G., Fan, Y., Zhang, L., Yuan, C. & Wang, J. 2013. Enhanced lipid productivity and photosynthesis efficiency in a *Desmodesmus* sp. mutant induced by heavy carbon ions. *Plos One*. 8(4). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3621885/>. Acessado em 06.12.2013.
- Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. & Darzins, A. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The plant journal* 54:621-639.
- Kalita, N., Baruah, G., Goswami, R.C.D., Talukdar, J. & Kalita, M.C. 2011. *Ankistrodesmus falcatus*: A promising candidate for lipid production, its biochemical analysis and strategies to enhance lipid productivity. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. 1(4):148-157.
- Kormakova-Legnerova, J. 1969. The genera *Ankistrodesmus* Corda and *Raphidium* Kützing and their position in the family *Ankistrodesmaceae*. *Preslia* 37: 1-8.
- Lardon, L., Hélias, A., Sialve, B., Steyer, J.P. & Bernard, O. 2009. Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae. *Environmental Science & Technology* 43(17):6475-6481.
- Lee, S.J., Yoon, B.D.M. & Oh, H.M. 1998. Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*. *Biotechnology* 12:553-556.
- Li, X., Xu, H. & Wu, Q. 2007. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnology and bioengineering* 98(4):764-771.
- Liang, Y., Sarkany, N. & Cui, Y. 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters* 31:1043-1049.
- Lourenço, S.O. 2006. Cultivo de microalgas marinhas – Princípios e aplicações. RiMa, São Carlos. 588 p.
- Macedo, R.V.T. & Alegre, R.M. 2001. Influência do teor de nitrogênio no cultivo de *Spirulina maxima* em dois níveis de temperatura – Parte II. Produção de lipídios. *Campinas, Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 21(2):183-196.
- Mata, T.M., Martins, A.A. & Caetano, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and sustainable energy reviews* 14:217-232.
- Mendes, M.C.Q., Gonzalez, A.A.C., Menezes, M., Nunes, J.M.C., Pereira, S., Nascimento, I.A. 2012. Coleção de microalgas de ambientes dulciaquícolas naturais da Bahia, Brasil, como potencial fonte para a produção de biocombustíveis: uma abordagem taxonômica. *Acta Botanica Brasilica*. 26(3):691-696.
- Morgan-Kiss, R.M., Ivanov, A.G., Modla, S., Czymmek, K., Hüner, N.P., Priscu, J.C., Lisle, J.T. & Hanson, T.E. 2008. Identity and physiology of a new psychrophilic eukaryotic green alga, *Chlorella* sp., strain bi, isolated from a transitory pond near Bratina Island, Antarctica. *Extremophiles* 12(5):701-711.
- Pan Y-Y., Wang, S-T., Chuang, L-T., Chang, Y-W. & Chen, C-N.N. 2011. Isolation of thermo-tolerant and high lipid content green microalgae: Oil accumulation is predominantly controlled by photosystem efficiency during stress treatments in *Desmodesmus*. *Bioresource technology* 102:10510-10517.
- Richmond, A. 2004. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science. 588p.
- Rodolfi, L., Zittelli, G.C., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N. & Bonini, G. 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 102(1):100-120.
- Samori, G. Samori, C., Guerrini, F. & Pistocchi, R. 2013. Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: Part I. *Water research* 47(2):791-801.
- Sant'Anna, C.L. 1984. Chlorococcales (Chlorophyceae) do Estado de São Paulo, Brasil. *J. Cramer*. 348p.
- Tam, N.F.Y. & Wong, T.S. 1996. Effect of ammonia concentrations on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media. *Bioresource technology*, Hong Kong 57:45-50.
- Tornabene, T.G., Holzer, G., Lien, S. & Burris, N. 1983. Lipid composition of the nitrogen starved green alga *Neochloris oleabundans*. *Enzyme Microbiology technology* 5:435-440.
- Thomas, W.H., Tornabene, T.G. & Weissman J. 1984. Screening for lipid yielding microalgae: activities for 1983. *Solar Energy Research Institute*. Disponível em: <http://www.nrel.gov/docs/legosti/old/2207.pdf>. Acessado em 06.12.2013.
- Verma, N.M., Mehrotra, S., Shukla, A. & Mishra, B.N. 2010. Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: A comprehensive discussion. *African journal of biotechnology* 9(10):1402-1411.
- Widjaja, A., Chien, C.C. & Ju, Y.H. 2009. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan institute of chemical engineers* 40:13-20.
- Yang, J., Xu, M., Zhang, X., Hu, Q., Sommerfeld, M. & Chen, Y. 2011. Life-cycle analysis on biodiesel production from microalgae: Water footprint and nutrients balance. *Bioresource technology* 102:159-165.