UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

GUSTAVO BENEVIDES MARTINS

EFEITOS DA DEPLEÇÃO DE NITROGÊNIO SOBRE A BIOMASSA E PRODUÇÃO LIPÍDICA DE TRÊS ESPÉCIES DE MICROALGAS FITOPLANCTÔNICAS

VITÓRIA
2014

GUSTAVO BENEVIDES MARTINS

EFEITOS DA DEPLEÇÃO DE NITROGÊNIO SOBRE A BIOMASSA E PRODUÇÃO LIPÍDICA DE TRÊS ESPÉCIES DE MICROALGAS FITOPLANCTÔNICAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal, na área de concentração Fisiologia Vegetal

Orientadota: Profª. Drª. Valéria de Oliveira Fernandes

VITÓRIA
2014

À minha família e amigos

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio e pela minha confecção;

À Profª Drª Valéria de Oliveira Fernandes pela orientação, confiança e amizade;

Ao LATEAC (Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Algas Continentais), sob a coordenação da Drª Valéria de Oliveira Fernandes, pelo fornecimento de toda a estrutura para o desenvolvimento do presente trabalho;

Ao Prof. Dr. Roberto Sassi e aos integrantes do Laboratório de Ambientes Recifais e Biotecnologia com Microalgas (LARBIM/UFPB) por me receberem com dedicada atenção em João Pessoa e me ensinarem tudo sobre cultivo;

À Dra. Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira do INT/RJ, por todas as valiosas contribuições na revisão da primeira versão deste trabalho e pela concessão da cepa de *Chlorella vulgaris*, proveniente originalmente da Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce da UFSCar;

À Banca Examinadora, composta pelos professores doutores Camilo Dias Junior, Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira e Roberto Sassi, por melhorarem a qualidade do presente trabalho com suas críticas e sugestões, além de terem aceito o convite para participar da mesma;

Aos integrantes do LATEAC, pelos ensinamentos, ajudas e (principalmente) pelas horas divertidas no famigerado laboratório;

À turma do PPGBV, pelas incontáveis horas memoráveis e (principalmente) pelas melhores festas e cervejadas;

A todos os professores e funcionários da Botânica, em especial à Beth, pelo cafezinho diário e extrema simpatia com todos;

À FAPES (Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo), pela concessão da bolsa de mestrado;

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O uso de lipídios obtidos a partir da biomassa de microalgas tem sido descrito como uma alternativa promissora para a indústria petro-diesel e envolve etapas como o cultivo de microalgas, separação da biomassa e extração de lipídios. Para viabilizar a produção em larga escala, é necessário selecionar as espécies mais produtivas, diminuir os custos de produção e determinar as condições ideais de cultivo. Os gêneros *Chlorella*, *Desmodesmus* e *Ankistrodesmus* apresentam características favoráveis à produção comercial, tendo sido então selecionada uma espécie de cada no presente trabalho. O objetivo do estudo foi avaliar diferentes condições de cultivo de *Ankistrodesmus fusiformis*, *Chlorella vulgaris* e *Desmodesmus spinosus* visando o aumento da produtividade em biomassa e lipídios totais. As algas foram identificadas e cultivadas em laboratório, em condições controladas de temperatura a 26ºC (±1), aeração por borbulhamento à pressão ambiente e luminosidade fornecida por lâmpadas fluorescentes, com intensidade de 47,25 µmol de fótons $m^{-2}.s^{-1}$ (3500 lux), fotoperiodo de 12h e pH 7, sob duas concentrações estressantes de nitrato de sódio (0,10 g/L e 0,05g/L). Os cultivos duraram em média 16 dias, sendo as curvas de crescimento construídas com dados de espectrofotometria óptica coletados a cada 48h, e a biomassa obtida ao final do cultivo por centrifugação e liofilização de cada unidade experimental. Para extração dos lipídios totais, foi utilizada a mistura de clorofórmio: metanol (1:2), segundo a metodologia de Bligh & Dyer (1959). Os tratamentos de estresse em *D. spinosus* resultaram em maior acúmulo lipídico, com aumento de até 149,7%, porém com drástica diminuição do crescimento e biomassa. Em *C. vulgaris*, nos tratamentos de estresse, verificou-se apenas ligeiro aumento do peso seco e teor de lipídios, não havendo diferença significativa entre os tratamentos e o controle. Da mesma forma, *A. fusiformis* não mostrou respostas significativas ao estresse pela redução de nitrato de sódio do meio, havendo ligeira diminuição do conteúdo lipídico e aumento do crescimento e biomassa. Com respostas diferentes para cada espécie estudada, evidencia-se a necessidade do conhecimento da fisiologia e autoecologia da cepa a ser cultivada em escala comercial visando à produção de ácidos graxos para fins de biodiesel.

Palavras-Chave: *Desmodesmus*, *Chlorella*, *Ankistrodesmus*, cultivo, estresse.

ABSTRACT

The use of lipids from microalgae biomass has been described as a promising alternative to the petro-diesel industry and involves steps such as microalgae cultivation, biomass separation and lipid extraction. To facilitate the large-scale production, it is necessary to select the most productive species, reduce production costs and determine optimal growing conditions. *Chlorella*, *Desmodesmus* and *Ankistrodemsus* are genus with favorable characteristics for commercial production, being selected then, one species from each one in the present work. The aim of the study was to evaluate different growth conditions in *Ankistrodemsus fusiformis*, *Chlorella vulgaris* and *Desmodesmus spinosus* aiming to enhance the biomass production and total lipid content. The algae were identified and grown in the laboratory under controlled temperature conditions of 26 ºC (±1), aeration by bubbling at ambient pressure and light provided by fluorescent lamps at an intensity of 47,25 µmol photons $m^{-2}.s^{-1}$ (3500 lux), 12 hours photoperiod and pH 7, under two stressful concentrations of sodium nitrate (0.10 g/L and 0.05 g/L). The cultures lasted an average of 16 days, with growth curves constructed with optical spectrophotometry data collected every 48 hours, and the biomass was obtained at the end of the cultures by centrifugation and lyophilisation of each experimental unit. For extraction of total lipids, were used the mixture chloroform: methanol (1:2) according to Bligh & Dyer (1959) method. The stress treatments in *D. spinosus* resulted in increased lipid accumulation, an increase of up to 149.7%, although with a drastic decrease in growth and biomass. In *C. vulgaris*, the stress treatments were found to only slightly increase the dry weight and lipid content, with no significant difference between the treatments and the control. Similarly, *A. fusiformis* showed no significant responses to stress by reduction of sodium nitrate in the medium, with a slight decrease of lipid content and increased growth and biomass. With different answers for each studied species, we highlight the need for knowledge of both the physiology and autecology of the strain to be grown on a commercial scale aimed at the production of fatty acids for biodiesel purposes.

Keywords: *Desmodesmus, Chlorella, Ankistrodesmus,* cultivation, stress.

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO GERAL 13

2 - OBJETIVO 28

2.1 - Objetivo Geral 28

2.2 - Objetivos Específicos 28

3 - HIPÓTESE DA PESQUISA 28

4 - METODOLOGIA GERAL 29

4.1 - Isolamento e cultivo 29

4.2 - Curva de crescimento e obtenção de biomassa 32

4.3 - Determinação do conteúdo lipídico 33

4.4 - Análise dos dados 34

5 - REFERÊNCIAS 34

Artigo: EFEITOS DA DEPLEÇÃO DE NITROGÊNIO SOBRE A FISIOLOGIA DE TRÊS ESPÉCIES DE MICROALGAS 41

RESUMO 42

ABSTRACT 42

INTRODUÇÃO 43

MATERIAL E MÉTODOS 45

Isolamento e cultivo 45

Curva de crescimento e obtenção de biomassa 47

Determinação do conteúdo lipídico 47

Análise dos dados 47

RESULTADOS E DISCUSSÃO 48

Detalhamento taxonômico das espécies estudadas 48

Características visuais das culturas 50

Efeitos da depleção de nitrogênio sobre o crescimento, peso seco e teor de lipídios totais. 50

CONCLUSÕES 57

AGRADECIMENTOS 57

REFERÊNCIAS 57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Curvas de crescimento das culturas de *Desmodesmus spinosus* submetidas a diferentes concentrações de nitrato de sódio 51

Figura 2 - Curvas de crescimento das culturas de *Chlorella vulgaris* submetidas a diferentes concentrações de nitrato de sódio 53

Figura 3 - Curvas de crescimento das culturas de *Ankistrodesmus fusiformis* submetidas a diferentes concentrações de nitrato de sódio 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações e porcentagens de $NaNO_3$ utilizadas no experimento..... 32

Artigo: Efeitos da depleção de nitrogênio sobre a fisiologia de três espécies de microalgas..... 41

Tabela 1. Concentrações e porcentagens de $NaNO_3$ utilizadas no experimento..... 46

Tabela 2. Teores de lipídios totais e porcentagem de acordo com o peso seco obtidos em cada espécie e cada tratamento..... 56

1. INTRODUÇÃO GERAL

Alga é um termo utilizado para agrupar diversos grupos taxonômicos de organismos fotossintetizantes presentes em sistemas aquáticos. Apresentam uma estrutura vegetativa conhecida como talo, cuja diferenciação celular é pequena ou nula. Assim, esse termo é completamente desprovido de valor taxonômico, pois designa organismos muito distintos entre si quanto à origem, composição química e morfologia. Abrange seres unicelulares e pluricelulares, com hábitos planctônicos e bentônicos dos mais variados tipos. A partir dessas características, derivam-se os termos Microalgas e Macroalgas. Embora macroalgas sejam majoritariamente bentônicas, a maioria das microalgas é planctônica, embora sejam observados organismos bentônicos, perifíticos e terrestres, vivendo em ambientes úmidos. As microalgas planctônicas constituem o fitoplâncton, ou seja, são os organismos fotossintetizantes microscópicos que vivem em suspensão na coluna d'água. Os diversos grupos componentes do fitoplâncton podem apresentar-se como células isoladas, agrupadas formando colônias, ou encadeadas formando filamentos lineares de células. Em todos os casos, ocorre pouca ou nenhuma diferenciação das funções ou especialização das células, ou seja, cada célula realiza todas as funções vitais (Lourenço, 2006; Pedrini, 2010; Esteves, 2011).

Lee (2008) organizou a sistemática dos grupos algais de forma prática e seguindo os critérios filogenéticos mais avançados, com ênfase nos processos de endossimbiose. Assim, as algas se distribuem entre quatro grandes grupos, que englobam as seguintes divisões: (I) Algas procariontes (Cyanophyta), (II) Algas eucariontes com cloroplastos rodeados por duas membranas do envelope cloroplástico (Glaucophyta, Rhodophyta, Chlorophyta), (III) Algas eucariontes com o cloroplasto rodeado por uma membrana de retículo endoplasmático cloroplástico (Euglenophyta, Dinophyta, Apicomplexa), (IV)

Algas eucariontes com o cloroplasto rodeado por duas membranas de retículo endoplasmático cloroplástico (Cryptophyta, Ochrophyta, Prymnesiophyta). Microalgas se distribuem entre as Divisões Cyanophyta, Chlorophyta, Euglenophyta, Dinophyta, Rhodophyta, Cryptophyta, Prymnesiophyta e Ochrophyta.

No mar, a atividade fotossintética é realizada por vários tipos de organismos, detacando-se, dentre eles, o fitoplâncton, o microfitobentos, as algas macroscópicas, as plantas vasculares e as associações simbióticas envolvendo algas, como as zooxantelas, zooclorelas e cianelas. Esse conjunto de organismos fotossintetizantes apresenta papel ecológico equivalente ao das plantas terrestres em ecossistemas continentais. São responsáveis por grande parte da produção do oxigênio utilizado na respiração dos seres vivos, inclusive elas mesmas, que consomem menos oxigênio do que produzem.

Destaca-se, nos oceanos, a presença e a contribuição do fitoplâncton, que se distribui por todo o espaço onde há penetração de luz solar, que pode corresponder a mais de 200m de profundidade. Calcula-se que pelo menos 90% da produção primária marinha global seja derivada da atividade do fitoplâncton. Assim, todos os demais grupos de produtores primários marinhos reunidos contribuem com fração menor da produção primária dos oceanos mundiais (Lourenço, 2006; Pedrini, 2010). Segundo Norton *et al.* (1996), foi graças à fotossíntese de cianobactérias e depois das algas eucariontes que se produziu o oxigênio na atmosfera, necessário à povoação do planeta. No trabalho dos referidos autores, consta que 40% do carbono existente na terra, atualmente, são sequestrados pela fotossíntese das algas. Recentemente, Ohse *et al.* (2007) realizaram uma síntese da contribuição do sequestro de carbono realizado pelas microalgas, face a sua grande capacidade de produção de lipídios.

A maioria do carbono na Terra é inorgânica e encontra-se na forma de dióxido de carbono (CO_2), ou nos seus equivalentes iônicos ou hidratados: bicarbonato (HCO^{3-}) e carbonato (CO_3^{2-}). As microalgas contem cerca de 50% de carbono em sua biomassa seca, e na maioria dos casos, todo este carbono é obtido a partir do dióxido de carbono atmosférico (Chisti, 2007; Mata *et al.*, 2010), e na produção de 100 toneladas de biomassa algal, são assimiladas cerca de 183 toneladas de dióxido de carbono (Chisti, 2007). A conversão do carbono inorgânico em compostos orgânicos é conseguida através da fotossíntesse, processo biológico em que se pode distinguir duas fases: luminosa (dependente da luz) e escura (independente da luz), e cuja essência pode ser representada na seguinte equação:

$$CO_2 + 2H_2O \rightarrow (CH_2O) + H_2O + O_2$$

A nível global, aproximadamente 45 pentagramas de carbono ao ano (Pg C/ano) são fixados através da fotossíntese fitoplanctônica (Falkowski *et al.*, 2000). A fotossíntese possibilita a conversão da luz em energia química, conduzindo à produção de matérias-primas requeridas para a síntese de diversos combustíveis: prótons e elétrons (para biohidrogénio), açúcares e amido (para bioetanol e bioquerosene), óleos (para biodiesel) e biomassa (para biometano), entre outros produtos químicos (Schenk *et al.*, 2008; Singh & Gu, 2010).

As algas produzem diversos tipos de lipídios, os quais podem corresponder a biomoléculas constituintes das células que funcionam como fontes de energia, metabólitos ou produtos de armazenamento. É difícil definir grandes classes de lipídios nas algas, visto que na literatura, a nomenclatura dos lipídios é muito heterogênea. Sabe-se que na sua maioria, esses lipídios são tipicamente compostos de glicerol,

açucares ou bases esterificadas a ácidos gordos possuindo números de carbono variando de 12 a 22 (Becker, 2004).

As microalgas, através da fotossíntese, podem sintetizar ácidos graxos a partir de fontes de carbono, como o CO_2, e também diretamente a partir de fontes de carbono orgânicos (glicose, acetato, etc.). A composição e a quantidade de lipídios dependem da espécie de microalgas e das condições autotrófica ou heterotrófica de crescimento (Chisti, 2007; Huang *et al*, 2010; Pereira *et al.*, 2012). Esses organismos 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). Além do biodiesel produzido a partir do óleo microalgal, esses organismos podem ainda produzir outros diferentes tipos de biocombustíveis renováveis, incluindo biohidrogênio produzido fotobiologicamente (Kapdan & Kargi, 2006) e metano produzido por digestão anaeróbica da biomassa algácea (Spolaore *et al.*, 2006). A biomassa de microalgas contém três componentes principais: carboidratos, proteínas e lipídios. Sabendo-se que para constituir uma matéria-prima de biodiesel, esta deve ser rica em ácido graxo, uma microalga com um teor de proteínas muito alto e baixo teor de lipídios não seria útil como matéria-prima para biocombustíveis (Pereira *et al.*, 2012).

O cultivo de microalgas é uma ferramenta essencial para a produção de biomassa, além de, se desejado, prover informações básicas sobre as espécies cultivadas, úteis para o conhecimento de seus ciclos de vida, sua autoecologia e fisiologia (Lourenço, 2006). É um processo que se dá, após o isolamento da cepa, pela inoculação da espécie escolhida em um meio aquoso contendo nutrientes essenciais. Em laboratório, tradicionalmente utiliza-se meios de cultura com concentrações de macro e micronutrientes já pré-

estabelecidas, e o cultivo é feito em ambiente fechado, com iluminação artificial e temperatura controlada. Pode-se cultivar basicamente qualquer microalga existente, mas várias espécies de Chlorophyta apresentam crescimento rápido e tolerância às condições de cultivo, sendo já produzidas para alimentar organismos aquáticos, extração de carotenoides ou mesmo na alimentação e suplementação humana (Lourenço, 2006).

Algas da divisão Chlorophyta são chamadas de algas verdes e correspondem a um amplo grupo de organismos cosmopolitas que apresenta grande diversidade morfológica. Esse grupo possui seres com formas unicelulares e coloniais que podem ser flageladas ou imóveis. Seus pigmentos principais são as clorofilas *a* e *b*, e carotenóides como acessórios (Richmond, 2004). É um grupo amplamente explorado em cultivo, por compreender táxons facilmente encontrados em diversos ambientes aquáticos continentais, como a classe Chlorophyceae, a mais frequente no fitoplâncton de água doce (Esteves, 2011) e a classe Trebouxiophyceae, a qual pertence o gênero *Chlorella* Beijerinck. A divisão Chlorophyta possui aproximadamente 17000 espécies conhecidas (Lourenço, 2006), sendo 90% de ambientes dulciaquícolas, mas também com representantes em ambientes salobros e marinhos e outros como neve, troncos de árvores, folhas de plantas terrestres, pelos de animais, salinas, desertos secos, ou cinzas vulcânicas (Esteves, 2011, Lourenço, 2006).

A classe Chlorophyceae é a mais frequente no fitoplâncton de água doce, habitanto, em sua grande maioria, lagos mesotróficos ou eutróficos, e são cosmopolitas. Os principais representantes das Chlorophyceae lacustres são as ordens Chlorococcales (*Scenedesmus*, *Ankistrodesmus*, *Monoraphidium*, *Pediastrum*) e Volvocales (*Chlamydomonas*, *Eudorina*, *Volvox*) (Bicudo & Menezes, 2005).

A classe Trebouxiophyceae possui atualmente cerca de 650 espécies, engloba cinco ordens: Chlorellales, Microthamniales, Phyllosiphonales, Prasiolales e Trebouxiales (Guiry & Guiry, 2014) e contêm algas unicelulares, filamentosas ou em forma de pequenas lâminas, unicamente dulciaquícolas, subaéreas ou simbiontes de liquens (Reviers, 2010). Segundo Krienitz *et al.* (2004), todas as análises filogenéticas até o momento mostram que Chlorellaceae forma um clado com Trebouxiophyceae. Entretanto, verificaram que os critérios morfológicos geralmente utilizados para classificação, conferem um alto grau de plasticidade fenotípica, representando adaptações a fatores ambientais. A filogenia dos gêneros e espécies de *Chlorellaceae* são ainda provisórios, já que na maioria dos casos, faltam abordagens moleculares para identificar claramente as linhagens filogenéticas.

O gênero *Chlorella* Beijerinck pertence à classe *Trebouxiophyceae* e se caracteriza como pequenos cocóides de vida livre e ocorrência cosmopolita. É um gênero com cerca de 14 espécies (Bicudo & Menezes, 2005; Krienitz *et al.*, 2004) e amplamente estudado em cultivo, tendo sido um dos primeiros com registro de cultivo em laboratório, com o trabalho de Beijerinck (1890). Células da espécie *Chlorella vulgaris* possuem coloração verde devido à presença dos pigmentos clorofila a e b em seu cloroplasto. Além da clorofila, apresentam ainda β-caroteno e várias xantofilas como a luteína, violaxantina, zeaxantina, anteraxantina, neoxantina, astaxantina e cantaxantina. Em relação ao metabolismo, essas células são capazes de suplementar a quantidade de carbono pela utilização de matéria orgânica dissolvida na forma de açúcares, ácidos aminados e outras moléculas pequenas, caracterizando um metabolismo mixotrófico (Lourenço, 2006). 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 (Illman *et al.*, 2000, Wilson & Huner, 2000, Bashan *et al.*, 2005, Doebbe *et al.*, 2007, Li *et al.*, 2007, Demirbas, 2008, Gouveia & Oliveira, 2009, Mata *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011). Diferentes espécies já foram descritas apresentando diferentes teores de lipídio em relação ao peso seco, como é o caso de *C. sorokiniana*, com 19 a 22% de lipídio, *C. ellipsoidea*, com cerca de 4,5%, *C. pyrenoidosa*, com 2 a 12%, *C. protothecoides*, com aproximadamente 14,6 a 57,8% e *C. emersonii*, com 25 a 63% em lipídios (Mata *et al.* 2010). Para *Chlorella vulgaris*, uma das espécies mais estudadas devido à alta taxa de crescimento, fácil cultivo e difícil contaminação mesmo em sistemas abertos (Huntley & Redalje, 2006), Mata *et al.* (2010), em uma revisão, concluíram que o teor lipídico pode variar de 5 a 58% da biomassa seca final.

Liang *et al.* (2009) compararam a produtividade em biomassa e lipídios para *C. vulgaris* quando cultivada em condições autotrófica, heterotrófica e mixotrófica. Em condição autotrófica, as células foram cultivadas na presença (0,25 g/L de $NaNO_3$ no meio de cultura) e ausência de nitrato de sódio. Para cultivo heterotrófico, as células cresceram no escuro com presença de 1% de glicose. E, no cultivo mixotrófico, as células foram cultivadas na presença de luz com 1% de glicose. Os autores compararam ainda o uso de três fontes de carbono diferentes: glicose 1%; acetato 1% e glicerol a 1% e 2%. No caso do cultivo mixotrófico com 1% de acetato foi observada também a influência de nitrato de sódio. Dentre todos os cultivos testados, a máxima produtividade em biomassa (254 $mg.L^{-1}.d^{-1}$) foi obtida em cultivo mixotrófico (presença de luz e 1% de glicose). Embora o maior conteúdo lipídico (38% em peso seco) tenha sido obtido em cultivo autotrófico com $NaNO_3$ no meio de cultura, o cultivo mixotrófico apresentou maior crescimento celular de modo a superar a produtividade em lipídios (54 $mg.L^{-1}.d^{-1}$) quando comparado ao cultivo autotrófico.

Pertencente à classe Chlorophyceae, o gênero *Desmodesmus* An, Friedl & Hegewald abrange de 100 a 120 espécies. Caracteriza-se como colônias cenobiais planas e formadas por 2, 4, 8 ou 16 células elipsoides ou ovóides dispostas lado a lado (Bicudo & Menezes, 2005). São indivíduos 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 uma 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 (Samorì *et al.*, 2013).

Ankistrodesmus Corda é um gênero de *Chlorophyceae* caracterizado por células que podem ser lunadas, fusiformes, muitas vezes mais longas que o próprio diâmetro, lembrando forma de agulhas, podendo ser tanto retas quanto encurvadas ou até sigmoides. São células solitárias ou reunidas em tufos menos organizados, ou em feixes frouxos mais organizados. 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). Ao estressar culturas de *A. falcatus*, Kalita *et al.* (2011) obtiveram de 43 a 56,1% em diferentes concentrações de cloreto de sódio.

Segundo Lourenço (2006), os estudos sobre cultivo de microalgas se iniciaram com o trabalho de Cohn (1850), que manteve uma cepa de *Haematococcus* viva em laboratório. Contudo, muitos autores desconsideram seu pioneirismo pelo fato de não ter isolado a espécie estudada nem preparado um meio de cultura próprio. Assim, atribui-se a Famintzin (1871) os primeiros estudos sobre o cultivo de microalgas, produzindo o primeiro relato sobre a necessidade de sais inorgânicos para o desenvolvimento desses organismos, influenciando decisivamente na atuação dos

primeiros pesquisadores da área. Após a fase inicial de desenvolvimento dos estudos sobre cultivos de microalgas, a velocidade de geração de conhecimentos e a diversificação dos estudos intensificaram-se, surgindo mais estudos ecológicos, fisiológicos, ontogenéticos, bioquímicos e genéticos. O cultivo de microalgas em altas densidades e volumes começou a ser realizado na década de 40 do século passado, com o despertar do interesse pela produção de biomassa algácea para uso como alimento animal e humano, pois até então as microalgas eram encaradas com enfoque meramente biológico.

O uso contínuo de combustíveis derivados do petróleo há muito se mostra insustentável, principalmente devido à iminente depleção das reservas e à notável contribuição para a emissão de CO_2 na atmosfera (Klass, 1998). O esgotamento das reservas existentes conduzirá a uma crise energética e consequente aumento dos preços dos combustíveis, resultando num grande impacto na segurança energética e na vida da sociedade (Amin, 2009, Reda *et al.*, 2011). Por conta disso, tem-se dado cada vez mais atenção aos biocombustíveis (Sheehan *et al.*, 1998, Hu *et al.*, 2008). No Brasil, utiliza-se principalmente o etanol, produzido a partir de cana-de-açúcar (Schenk *et al.*, 2008), nos Estados Unidos, produz-se principalmente biodiesel a partir da soja (Chisti, 2007). Outras fontes de biocombustíveis comerciais incluem óleo de canola, gordura animal, óleo de palma, óleo de milho e óleo de cozinha usado (Felizardo *et al.*, 2006, Reda *et al.*, 2011). Contudo, essas fontes, chamadas de biocombustíveis da primeira geração, não suprem a demanda e competem ainda com culturas alimentícias (Moore, 2008).

Atualmente, cerca de 1% de toda a área cultivável do mundo (14 milhões de hectares) é voltada para a produção de bicombustíveis, suprindo apenas 1% da demanda global de combustíveis para o transporte. Tendo isso em vista, suprir 100% dessa demanda se

torna impraticável devido às grandes áreas cultiváveis necessárias e por consequência, severo impacto no fornecimento alimentar mundial que acarretaria (IEA, 2006).

Em face a toda essa problemática atual, a tecnologia da produção de biodiesel a partir de microalgas surge como mais uma forma de amenizar os efeitos do consumo de combustíveis fósseis e potencial para substituí-los no futuro (Chisti, 2007, Chisti, 2008, Schenk *et al.*, 2008).

A ideia da utilização de microalgas como fonte de combustível começou no final da década de 70 (Chisti, 1980, Sawayama *et al.,* 1995). De 1978 a 1996, o Departamento de Energia do Instituto de Desenvolvimento de Combustíveis dos Estados Unidos fundou um programa para desenvolver combustíveis renováveis a partir de algas (Sheehan *et al.,* 1998). Mas agora a ideia tem sido levada a sério frente ao crescente preço do petróleo e preocupação com o aumento do aquecimento global provocado pela queima de combustíveis fósseis (Gavrilescu & Chisti, 2005).

Dentre as vantagens de se utilizar microalgas como fonte de biocombustíveis, se destacam: (1) Não competem com culturas alimentícias, já que são produzidos a partir de fonte não alimentar; (2) Rápido crescimento e reprodução, se comparadas a ciclos de vida de vegetais (Schenk *et al.,* 2008); (3) Não necessitam da aplicação de inseticidas ou herbicidas (Rodolfi *et al.,* 2009); (4) Crescem em meio aquoso, mas utilizando menos água que plantações e ainda podem utilizar água salobra ou residual (Chisti, 2007, Dismukes *et al.,* 2008). Por conta disso, não necessitam de terras aráveis, não competindo com plantações (Hu *et al.,* 2008); (5) Ao contrário das plantações, as microalgas crescem em volume, ocupando menor área (Hu *et al.,* 2008); (6) maior produção, se comparada às outras culturas (Mata *et al.,* 2010, Reda *et al.,* 2011). Muitas espécies possuem naturalmente um conteúdo de lipídios variando de 20 a 50%, sendo

que essa porcentagem pode ser manipulada visando maior produção (Metting, 1996, Qin, 2005, Spolaore *et al.*, 2006, Chisti, 2007, Schenk *et al.*, 2008); (7) após a extração do óleo, a biomassa residual pode ser utilizada como ração na aquicultura ou fertilizante (Spolaore *et al.*, 2006). Dadas estas vantagens, os combustíveis produzidos a partir de microalgas têm sido reconhecidos como a terceira geração de energia de biomassa (Gressel, 2008) e a única fonte atual renovável de óleo que pode atender a demanda global por combustíveis para transporte (Schenk *et al.*, 2008).

No Brasil, cultivos de microalgas para fins de alimentação humana, produção de rações ou alimento vivo na aquicultura, produção de cosméticos, além de outros usos biotecnológicos, estão em acelerado desenvolvimento. A partir de 2008, por exemplo, empresas como a Petrobrás e as agências nacionais de apoio à pesquisa tem incentivado a produção de biomassa microalgal para a produção de biodiesel (Pedrini, 2010).

A habilidade das microalgas de sobreviver e se reproduzir sob uma ampla gama de condições ambientais é, em grande parte, refletida na alta diversidade de lipídios celulares, bem como na capacidade de modificar o metabolismo lipídico de forma eficiente em resposta a mudanças no ambiente (Wada & Murata, 1998, Guschina & Harwood, 2006). Por conta disso, existem estudos evidenciando que em condições de estresse, algumas algas aumentam suas taxas de lipídios, sendo essa uma forma de otimização quando se trata de utilizá-las na produção de biodiesel (Tornabene *et al.*, 1983, Thomas *et al.*, 1984, Hu *et al.*, 2008).

Segundo Lourenço (2006), durante um cultivo, geralmente ocorrem cinco fases de crescimento distintas: Fase de adaptação (*lag*), fase exponencial (*log*), fase de redução do crescimento, fase estacionária e fase de declínio, ou de senescência. A fase *lag* ocorre quando o inoculo recém-transferido para o meio de cultura fresco sofre

defasagem para iniciar o crescimento de fato. É uma fase marcada pela adaptação das células de um cultivo preexistente ao ambiente novo, havendo um aumento da biomassa, com pequenas variações. Na fase *log*, a taxa de crescimento torna-se maior e aproximadamente constante por curto período, variando de acordo com fatores como características da espécie e do conjunto de condições de crescimento. Quando algum componente torna-se limitante, a fase exponencial termina e verifica-se crescimento em taxas mais reduzidas, sendo que a exaustão ou redução drástica de qualquer nutriente essencial pode até mesmo eliminar essa fase de crescimento.

A fase estacionária sucede a de redução do crescimento ou transição, e é onde o cultivo atinge rendimento final máximo, expresso como o maior número possível de células por mililitro de cultivo. A taxa de crescimento tende a se tornar estável e com valores próximos de zero, uma vez que em média, a mesma quantidade de células que consegue se replicar, é a mesma quantidade de células que morrem.

A fase de declínio é marcada pela lise de muitas células e uma taxa de crescimento negativa, já que na população, pouquíssimas células ainda podem crescer e um número muito maior de indivíduos morre.

O crescimento das microalgas em cultivo é caracteristicamente não balanceado, e a sucessão das fases ocorre ao longo de intervalos de tempo altamente variáveis e difíceis de generalizar. A duração de cada estádio depende de fatores como a espécie examinada, as concentrações de nutrientes oferecidas, a intensidade de luz, o volume e até mesmo a forma dos frascos de cultivo.

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). A fonte de nutrientes

consiste no segundo maior componente dos custos de produção. Dessa forma, importante se faz encontrar as concentrações ideais de nutrientes que resultem tanto num aumento da produtividade de biomassa, quanto de lipídios (Vonshak, 1997).

O nitrogênio é um macronutriente que atua como componente estrutural de aminoácidos, nucleotídeos, clorofilas e coenzimas (Raven *et al.*, 1996). A concentração de nitrogênio presente na água é considerada um fator fundamental, tendo influência direta no crescimento algal, que está intimamente relacionado à remoção de nutrientes e acumulação lipídica (Xin *et al.*, 2010). Desde a década de 80, estudos tem mostrado a influência da concentração do nitrogênio sobre a biomassa e o teor lipídico de microalgas (Suali & Sarbatly, 2012). Entretanto, ainda que sejam encontrados muitos relatos sobre os efeitos de condições estressantes sobre a fisiologia de microalgas e sua potencial produtividade, muitas vezes torna-se difícil a comparação entre os dados obtidos em função das diferentes condições descritas, como intensidade de luz, temperatura, aeração ou meio de cultura.

Ming *et al.* (2010) demonstraram a necessidade de diferentes condições de cultivo para assegurar uma alta produção de biomassa aliada a um alto teor lipídico. Os autores sugerem que as microalgas devem ser cultivadas sob condições favoráveis e posteriormente estressadas nutricionalmente com concentrações reduzidas de nitrato. Os autores analisaram o crescimento celular e o conteúdo lipídico de *Chlorella vulgaris* cultivada sob aeração com enriquecimento de CO_2 a 1,0%, intensidade de luz de 60 µmol de fótons.$m^{-2}s^{-1}$ e temperatura de 25 ºC nas concentrações de 0,2 mM, 1,0 mM, 3,0 mM e 5,0 mM de KNO_3 no meio de cultura. A concentração celular aumentou de 0,4 g/L para 1,2 g/L com o aumento de 0,2 mM para 5,0 mM de KNO_3, em contrapartida, o conteúdo lipídico reduziu de 22,5% para 15,9% em relação ao peso seco de biomassa.

Ördög *et al.* (2012) avaliaram a concentração de lipídios durante 15 dias de cultivo da espécie *Chlorella minutissima*, nas concentrações de 0,007 g/L, 0,021 g/L, 0,035 g/L, 0,07 g/L e 0,7 g/L de nitrogênio no meio de cultura. A microalga foi cultivada sob aeração com enriquecimento de CO_2 a 1,5%, 130 µmol de fótons.$m^{-2}s^{-1}$ com fotoperíodo 14:10 e 25 ºC. Ao final dos 15 dias de cultivo, a microalga mantida a 0,7 g/L de nitrogênio apresentou uma concentração celular de 2,88 g/L e 11,2% de conteúdo lipídico. Já a microalga cultivada em 0,007 g/L de nitrogênio apresentou concentração celular de 0,97 g/L e teor lipídico de 43,3%.

Tornabene *et al.* (1983) verificaram que houve maior acúmulo de lipídios em *Nannochloropsis* sob condições de depleção de nitrogênio. Hu *et al.* (2008) demonstraram que o conteúdo lipídico de espécies de clorofíceas, diatomáceas, crisofíceas, rodofíceas e dinoflagelados aumentou significativamente com o decréscimo da disponibilidade de nitrogênio; Macedo & Alegre (2001) demonstraram que o conteúdo lipídico de *Spirulina* aumentou aproximadamente três vezes com o decréscimo da temperatura e disponibilidade de nitrogênio, sendo o último, mais efetivo. Thomas *et al.* (1984) e Feng *et al.* (2011) sugerem que concentrações maiores de nitrogênio aumentam a concentração lipídica das células, ao passo que uma menor concentração de nitrogênio acarreta em menor biomassa. Da mesma forma, Lardon *et al.* (2009) e Griffiths & Harrison (2009) afirmam que condições de estresse por nitrogênio aumentam o conteúdo lipídico em detrimento do crescimento, podendo não aumentar a produção lipídica de fato.

Por ser uma tecnologia nova, a produção de biodiesel a partir de microalgas carece de estudos para otimização das condições de cultura, visando maior produção lipídica, produção em larga escala, barateamento do custo de produção e viabilização comercial (Wright, 2006, Hu *et al.*, 2008, Brennan & Owende, 2009, Carolino, 2011). Nesse

sentido, o estudo de diferentes concentrações de nitrogênio sobre o acúmulo lipídico e produção de biomassa em espécies potencialmente produtoras de biodiesel representa mais uma ferramenta para auxiliar nesse processo (Suali & Sarbatly, 2012).

Diante do exposto, a presente pesquisa visa contribuir ao conhecimento da fisiologia de três espécies de microalgas no que tange a avaliação de aumento de biomassa e produção de lipídeos totais sob condição de estresse, representado por depleção de um dos nutrientes essenciais ao metabolismo, o nitrogênio, de modo a subsidiar a sua utilização como fonte produtora de biodiesel.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio sobre a biomassa e produção lipídica em três espécies de microalgas fitoplanctônicas que possuem potencial para a produção de biodiesel.

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar três espécies de microalgas fitoplanctônicas para cultivo com base na potencialidade, segundo a literatura, para a produção de biodiesel;
- Identificar, isolar e cultivar as espécies em meio de cultura sob três diferentes concentrações de nitrogênio;
- Avaliar o incremento de biomassa e produção lipídica das microalgas em diferentes concentrações de nitrogênio;
- Discutir acerca da potencialidade das espécies para serem utilizadas em larga escala na produção de biodiesel;
- Contribuir para o conhecimento da fisiologia das espécies de microalgas sob estresse por nitrogênio.

3. HIPÓTESE DA PESQUISA

De acordo com o levantamento bibliográfico realizado e analisando os resultados obtidos em diversas pesquisas já realizadas, espera-se que para as três espécies de microalgas selecionadas há menor crescimento (acúmulo de biomassa), menor peso seco, e maior produção lipídica quanto menor fosse a concentração de nitrogênio no meio.

4. METODOLOGIA GERAL

4.1. Isolamento e cultivo

Foram estudadas três espécies de microalgas: *Desmodesmus spinosus* (Chodat) E.Hegewald, *Chlorella vulgaris* Beijerinck e *Ankistrodesmus fusiformis* Corda. A cepa de *C. vulgaris* foi cedida pela Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce da UFSCar. Foi realizada uma coleta do fitoplâncton em uma lagoa artificial urbana na cidade de Vitória – ES, a lagoa da UFES, no campus Alaor de Queiroz Araújo da Universidade Federal do Espírito Santo.

A lagoa da UFES se encontra na região costeira do Estado do Espírito Santo (20º 16' 41" S e 40º 18' 10" W) e é um ecossistema artificial, raso, praticamente sem recortes em seu perímetro e com considerável declividade em suas margens. Apresenta área total de 1,4 há, volume total de $1{,}7 \times 10^6$ m³, perímetro de 521,63 m, baixo índice de desenvolvimento de margem (1,23), comprimento máximo efetivo de 186,6 m, largura máxima efetiva de 144,4 m, profundidade máxima de 1,7 m, profundidade média de 1,20 m e desenvolvimento de volume de 3,33 (Perrone, 1997). O fundo da lagoa é predominantemente plano, exceto junto às suas margens, ocorrendo apenas um aumento da profundidade do meio da lagoa em direção ao anel viário. No sentido oposto há uma redução gradativa da profundidade, devido à proteção pela vegetação remanescente de manguezal. De forma geral, a bacia apresenta configuração em forma de "U", com sedimento rico em matéria orgânica (Perrone, 1997).

A origem desse ecossistema está associada a obras de urbanização do próprio Campus universitário, para fins de ocupação e de harmonia paisagística (Borgo, 1995). Em janeiro de 1980, durante as obras de ampliação do Campus, foi observada uma lâmina de água salobra por ocasião dos aterros para a construção da Biblioteca Central,

Restaurante Universitário e o Centro de Ciências Jurídicas e Econômicas (CCJE). A extensão alagada, com uma profundidade muito reduzida e formato relativamente arredondado, formou uma lagoa entre as edificações e o anel viário, o qual representava seu escoamento natural, passando este a ser canalizado através de manilhas para o Canal da Passagem. Com o término das obras, a lagoa passou a receber efluentes sanitários das próprias edificações do entorno, resultando num processo acelerado de eutrofização com consequente formação de grande biomassa de macrófitas aquáticas, principalmente dos gêneros *Typha* e *Lemnea* (Perrone, 1997). Entre 1993 e 1994, durante a gestão do reitor Roberto Cunha Penedo, a lagoa sofreu intervenções com obras de urbanização relacionadas à drenagem, retirada das macrófitas aquáticas, retificação de seu perímetro, remoção do sedimento e outras obras de engenharia, com objetivo de diminuir os focos de mosquitos, o mau cheiro e melhorar o aspecto visual. No final de 1998, um prolongado período de estiagem na região acarretou em uma drástica redução do nível d'água da lagoa. O problema foi então resolvido com o bombeamento de água salobra proveniente do sistema estuarino da Baía de Vitória/Canal da Passagem, localizado a oeste do Campus universitário. Desde então, a manutenção do nível da água se dá principalmente pela precipitação pluviométrica e pelo lençol freático, exceto quando há necessidade de reabastecimento devido às estiagens pronunciadas, quando então é novamente bombeada água do sistema estuarino (Pereira & Fernandes, 1999).

Atualmente a lagoa da UFES consiste em um importante ambiente ecológico, por constituir habitats para a fauna e flora aquática, e científico, funcionando como laboratório natural para pesquisas acadêmicas e contribuindo para o aumento do conhecimento sobre componentes bióticos e abióticos dos ecossistemas aquáticos. É utilizada para a realização de aulas de campo por diferentes cursos, como os de Ciências

Biológicas, Oceanografia, Geografia, Artes Plásticas, além de proporcionar à comunidade universitária, harmonia paisagística através de sua beleza cênica.

Foi realizada uma coleta do fitoplâncton mais próxima ao anel viário com auxílio de rede de plâncton com malha de 20µm. A amostra foi analisada ainda viva através da montagem de lâminas e observações em microscópio óptico Olympus nos aumentos de 200x, 400x e 1000x; foram selecionados dois táxons e foi feito o isolamento das cepas desejadas por pipetagem e diluições sucessivas (Lourenço, 2006). Os indivíduos isolados (posteriormente identificados como *Desmodemus spinosus* e *Ankistrodesmus fusiformis*) foram esquematizados com auxílio de câmara clara, medidos com ocular micrometrada e fotografados para identificação a nível de espécie com o auxílio de bibliografia especializada. Paralelamente, as cepas foram depositadas no banco de cultura de microalgas do Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Algas Continentais (LATEAC) da Universidade Federal do Espírito Santo.

Após isolamento, foi feito o cultivo de 500 mL das cepas de *D. spinosus* e *A. fusiformis* para servirem como inoculo para o experimento. De acordo com a resposta em testes piloto nas mesmas condições propostas no trabalho, mas com número de células no inoculo inicial variável, padronizou-se o mesmo para conter 10^6 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, consequentemente, acúmulo máximo de lipídios. As células foram contadas em câmara de Fuchs-Rosenthal e em réplicas.

O experimento foi realizado em cultivos de 500 mL em elernmeyers de 1L em câmaras incubadoras no Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Algas Continentais (LATEAC/UFES), em meio de cultura BBM e sob condições controladas de

temperatura a 26ºC (±1), aeração por borbulhamento à pressão ambiente e luminosidade fornecida por lâmpadas fluorescentes, com intensidade de 47,25 μmol de fótons $m^{-2}.s^{-1}$ (3500 lux), fotoperiodo de 12h e pH 7. A cada 48h, os frascos foram alterados quanto a posição dentre as prateleiras das incubadoras a fim de se uniformizar a luminosidade incidente em cada um.

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% do total), além do controle, sendo esta 100% do meio de cultura. As condições foram obtidos 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 $NaNO_3$ utilizadas no experimento.

Tratamentos	Concentração de $NaNO_3$ (g/L)	Porcentagem (%)
X0	0,25	100
X1	0,10	40
X2	0,05	20

4.2. Curva de crescimento e obtenção de biomassa

Foram retiradas, a cada 48h, alíquotas de 7 mL para determinação da densidade celular por análise em espectrofotometria óptica, sempre em duplicatas. O uso da densidade óptica para avaliar o crescimento de microalgas fundamenta-se na obstrução física da luz pelas células. Foi usado comprimento de onda de 570 nm, visto que esse

comprimento situa-se numa faixa distante da absorção máxima de luz pelas clorofilas e carotenoides. A absorbância registrada foi então pouco influenciada pelos pigmentos fotossintéticos, atribuindo-se, fundamentalmente, à obstrução física da passagem de luz pelas células em suspensão (Lourenço, 2006).

No decorrer do experimento, foram observadas as fases de crescimento: fase de adaptação (ou fase *lag*), onde geralmente há aumento de biomassa, com pequenas variações na densidade celular; fase exponencial (ou fase *log*), quando a taxa de crescimento torna-se maior e aproximadamente constante; e fase estacionária, quando o cultivo atinge rendimento final máximo, expresso como o maior número possível de células por mililitro.

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 em balança analítica.

4.3. 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 de 100 mL, onde foram adicionados 2 mL de água destilada para cada 0,5 g de biomassa seca, respeitando-se as proporções quando em quantidades menores que 0,5 g. 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 mais 2,5mL 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 um béquer e seca em estufa a 60°C até restarem somente os lipídios totais em forma sólida, que foram pesados em balança analítica.

4.4. Análise dos dados

Foram calculadas as médias dos valores de absorbância das réplicas para cada dia de leitura em espectrofotômetro. As médias foram plotadas em gráficos e calculou-se o desvio-padrão de cada dia. Os valores de absorbância 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. As pesagens de lipídios, de biomassa ao final dos cultivos, bem como as porcentagens de lipídios em relação ao peso seco, foram submetidas aos mesmos testes.

5. REFERÊNCIAS

Amin, S. 2009. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. Energy conversion and management, 50:1834–1840.

Banerjee, A., Sharma, R., Chisti, Y. & Banerjee, U.C. 2002. *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals. Crit. Rev. Biotechnology, 22:245–279.

Bashan, L.E., Antoun, H. & Bashan, Y. 2005. Cultivation factors and population size control the uptake of nitrogen by the microalgae *Chlorella vulgaris* when interacting with the microalgae growth-promoting bacterium azospirillum brasilense. microbiology ecology. 54:197–203.

Becker, W. 2004. Microalgae in Human and Animal Nutrition. In: Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Richmond, A.(ed.), 312-351, Blackwell Publishing, Oxford.

Beijerinck, M.W. 1890. Culturversuche mit zoochlorellen, lichengonidien und anderen niederen algaen. Bot. ztg. 48:725-785.

Bicudo, C.E.M., Menezes, M. 2005. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil (chave para identificação e descrições). São Carlos, Rima, 508 p.

Bligh,E.G. & Dyer,W.J. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. Can.J.Biochem.Physiol. 37:911-917

Borgo, I.A. 1995. UFES 40 anos de história. UFES, Vitória. 386 p.

Brennan, L. & Owende, P. 2009. Biofuels from microalgae—a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. Renew sustain energy reviews. 14(2):557-577

Carolino, L.R.V. 2011 Cultivo de microalgas unicelulares para determinação da produção lipídica e sequestro de carbono. 80 f. Tese de mestrado. Universidade de Lisboa, Faculdade de ciências, Lisboa.

Chisti, Y. 1980. An unusual hydrocarbon. J. Ramsay Soc. 81:27–28.

Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances. 25(3):294–306.

Chisti, Y. 2008. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. Trends Biotechnology, 26:126-131.

Cohn, F. 1850. Nachträge zur naturgeschichte des *protococcus pluvialis* kützing (*haematococcus pluvialis* flotow). Nov. Act. Leop. Carol. 22(2):605-764.

Demirbas, A. 2008. Energy sources, part a: recovery, utilization, and environmental effects. Energy Sources, 31:163–168.

Dismukes, G.C., Carrieri, D., Bennette, N. Ananyev, G.M. & Posewitz, M.C. 2008. Aquatic phototrophs: Efficient alternatives to land-based crops for biofuels. Biotechnology, 19(3):235–240.

Doebbe, A., Rupprecht, J. & Beckmann, J. 2007. Functional integration of the hup1 hexose symporter gene into the genome of *C. reinhardtii*: Impacts on biological h2 production. J. Biotechnology. 131:27–33.

Esteves, F.A. 2011. Fundamentos de Limnologia. Rio de Janeiro. Interciência, 790 p.

Falkowski, P., Scholes, R.J., Boyle, E., Canadell, J., Canfield, D., Elser, J., Gruber, N., Hibbard, K., Högberg, P., Linder, S., Mackenzie, F.T., Moore III, B., Pedersen, T., Rosenthal, Y., Seitzinger, S., Smetacek, V., Steffen, W. 2000. The Global Carbon Cycle: A Test of Our Knowledge of Earth as a System. Science 290: 291-296.

Famintzin, A. 1871. Die anorganischen salze als ausgezeichnetes hilfsmittel zum studium der entwicklung niederer chlorophyllhaltiger organismen. Bull Acad. Sci. St. Petesb. 17:31-70.

Felizardo, P., Correia, M.J.N., Raposo, I., Mendes, J.F., Berkemeier, R. & Bordado, J.M. 2006. Production of biodiesel from waste frying oil. Waste manag. 26(5):487–94.

Feng, D., Chen, Z., Xue, S. & Zhang, W. 2011. Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (chrysophyta) by nitrogen supplement. Bioresource Technology. 102:6710–6716.

Gavrilescu, M. & Chisti, Y. 2005. Biotechnology—A sustainable alternative for chemical industry. Biotechnology, Adv. 23:471–99.

Gouveia, L. & Oliveira, A.C. 2009. Microalgae as a raw material for biofuels production. Biotechnology, 36:269-274.

Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2014. AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. http://www.algaebase.org; Acesso em 01/05/2014.

Guschina, I.A. & Harwood, J.L. 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. Prog. Lipid Res. 45:160–186.

Gressel, J. 2008. Transgenics are imperative for biofuel crops. Plant sci. 174:246–263.

Griffiths, M.J. & Harrison, S.T.L. 2009. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. J. Appl. Phycol. 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/. Acesso 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.

Huang, G.; Chen, F.; Wei, D.; Zhang, X.; Chen, G. 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. Appl. Energy. 87(1):38-46

Huntley, M. E., Redalje, D. G. 2006. Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change.

IEA. 2006. World energy outlook: Paris. International energy agency. Disponível em: http://www.iea.org. Acesso em 06.12.2013.

Illman, A.M., Scragg, A.H. & Shales, S.W. 2000. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. Enzyme and microbial technology, 27:631–635.

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. J. Microbiol. Biotech. Res. 1(4):148-157.

Kapdan, I.K. & Kargi, F. 2006. Bio-hydrogen production from waste materials. Enzyme Microb. Technol, 38:569–82.

Klass, L.D. 1998. Biomass for renewable energy, fuels and chemicals. Academic press, New York, 652 p.

Krienitz, L., Hegewald, E.H., Hepperle, D., Huss, V.A.R., Rohr, T., Wolf, M. 2004. Phylogenetic relationship of Chlorella and Parachlorella gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). Phycologia 43(5):529-542.

Lardon, L., Hélias, A., Sialve, B., Steyer, J.P. & Bernard, O. 2009. Life-cicle assessment of biodiesel production from microalgae. Environmental Science & Technology, 43(17):6475-6481.

Lee, R.E. 2008. Phycology. New York: Cambridge University Press. 547p.

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 tech. 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. São Carlos. Rima, 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, Ciênc. Tecnol. Aliment, 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.

Metting, F.B. 1996. Biodiversity and application of microalgae. Journal of industrial microbiology, 17(6):477–89.

Ming Lv, J., Hua Cheng, L., Hua Xu, X., Zhang, L., Lin Chen, H. 2010. Enhanced lipid production of Chlorella vulgaris by adjustment of cultivation conditions. Bioresource Technology 101(17):6797-804.

Moore, A. 2008. Biofuels are dead: Long live biofuels—Part one. New biotechnology, 25(1):6–12.

Norton, T.A., Melkoniam, M., Andersen, R.A. 1996. Algal biodiversity. Phycologia. 35(4):308-326.

Ohse, S., Derner, R.B., Ozório, R.A., Cunha, P.C.R., Lamarca, C.P., Santos, M.E., Mendes, L.B.B. 2007. Revisão: Sequestro de carbono realizado por microalgas e florestas e a capacidade de produção de lipídios pelas microalgas. Insula, Florianópolis, 36:39-74

Ördög, V., Stirk, W.A., Bálint, P., Staden, J. V., Lovász, C. 2012. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen-stressed Chlorella minutissima cultures. Journal of Applied Phycology, 24(4):907-914

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.

Pedrini, A.G. 2010. Macroalgas: uma introdução à taxonomia. Technical Books, Rio de Janeiro. 125p.

Pereira, C.M.P., Hobuss, C.B., Maciel, J.V., Ferreira, L.R., Del Pino, F.B., Mesko, M.F., Jacob-Lopes, E., Neto, P.C. 2012. Biodiesel renovável derivado de microalgas: avanços e perspectivas tecnológicas. Química Nova. 35(10):2013-2018.

Pereira, J.B., Fernandes, L.L. 1999. Variação temporal do zooplâncton da lagoa da UFES, Vitória, Espírito Santo. Acta limnologica Brasiliensia 11(2):79-88.

Perrone, A. 1997. Diagnóstico ambiental da lagoa da UFES-ES: morfometria e concentrações de matéria orgânica no sedimento e sólidos na água. 34 f. Monografia (Especialização), Universidade Federal do Espírito Santo.

Qin J. 2005. Bio-hydrocarbons from algae—impacts of temperature, light and salinity on algae growth. Barton, Australia: Rural industries research and development corporation. RIRDC Publication, 5(25):17-18.

Raven, P.H., Evert, R.F. & Eichhorn, S.E. 1996. Biologia vegetal. Guanabara koogan, Rio de Janeiro. 728 p.

Reda, A.I.A-S., Hwang, J-H., Cho, Y., Min, B. & Jeon, B-H. 2011. Characterization of microalgal species isolated from fresh water bodies as a potential source for biodiesel production. Applied energy, 88:3300–3306.

Reviers, B. 2010.Natureza e posição das algas na árvore filogenética do mundo vivo. In: Franceschini, I.M., Burliga, A.L., Reviers, B., Prado, J.F., Rézig, S.H. Algas: Uma Abordagem Filogenética, Taxonômica E Ecológica. Artmed, 332 f.

Richmond, A. 2004. Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology. Blackwell Publishing, Oxford. p. 83-93.

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.

Samorì, G. Samorì, 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 res. 47(2):791-801.

Sawayama, S., Inoue, S., Dote, Y. & Yokoyama, S-Y. 1995. CO2 fixation and oil production through microalga. Energy Convers Manag. 36:729–31.

Schenk, P., Thomas-Hall, S., Stephens, E., Marx, U., Mussgnug, J. & Posten, C. 2008. Second generation biofuels: High-efficiency microalgae for biodiesel production. Bioenergy Research. 1(1):20–43.

Sheehan, J., Dunahay, T., Benemann, J., & Roessler, P. 1998. A look back at the U.S. department of energy's aquatic species program—biodiesel from algae. National renewable energy laboratory. Disponível em: http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/24190.pdf. Acesso em 06.12.2013.

Singh, J. & Gu, S. 2010. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14(9): 2596-2610.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. & Isambert, A. 2006. Commercial applications of microalgae. Journal of bioscience and bioengineering, 101(2):87–96.

Suali, E. & Sarbatly, R. 2012. Conversion of microalgae to biofuel. Renewable and sustainable energy reviews, 16:4316-4342.

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. Acesso em 06.12.2013.

Vonshak, A. 1997. *Spirulina platensis* (Arthrospira) physiology, cell-biology and biotechnology. London: Taylor & Francis, 233 p.

Wada, H., Murata, N. 1998. Membrane lipids in cyanobacteria. *in* lipids in photosynthesis: Structure, function and genetics. Netherlands, Kluwer academic publishers, p. 65–81.

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.

Wilson, K. E., Huner, N.P.A. 2000. The role of growth rate, redoxstate of the plastoquinone pool and the trans-thylakoid delta pH in photoacclimation of *Chlorella vulgaris* to growth irradiance and temperature. Planta, 212:93–102.

Wright, L. 2006 Worldwide commercial development of bioenergy with a focus on energy crop-based projects. Biomass bioenergy, 30:706–714.

Xin, L., Hong-Ying, H., Ke, G. & Ying-Xue, S. 2010. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. bioresource technology, 101:5494–5500.

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.

EFEITOS DA DEPLEÇÃO DE NITROGÊNIO SOBRE A FISIOLOGIA DE TRÊS ESPÉCIES DE MICROALGAS

Gustavo Benevides Martins[1], Valéria de Oliveira Fernandes[1]

[1] 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

Artigo a ser submetido na Revista Iheringia

Normas disponíveis em

http://www.fzb.rs.gov.br/upload/20140701082504normas_guidelines_ihbotanica_jun2014.pdf

RESUMO - A produção de biodiesel a partir de microalgas surge como mais uma forma de amenizar os efeitos do consumo de combustíveis fósseis com potencial para substituí-los no futuro, em um cenário onde seu uso se mostra insustentável. Para viabilizar a produção em larga escala, é necessário selecionar as espécies corretas, diminuir os custos e determinar as condições ideais de cultivo. Os gêneros *Chlorella*, *Desmodesmus* e *Ankistrodesmus* apresentam características favoráveis à produção comercial, tendo sido selecionada uma espécie de cada no presente trabalho. As algas foram cultivadas em laboratório, em condições controladas, sob duas concentrações estressantes de nitrato de sódio (10 g/L e 5 g/L). 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, havendo apenas sutis alterações. Com repostas 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.** Biodiesel production from microalgae emerges as a way to mitigate the effects of fossil fuels consumption with a potential to replace them in the future, in a scenario where its use proves unsustainable. To make the large-scale production feasible it is necessary to select the right species, reduce production costs and determine the optimal growth conditions. *Chlorella*, *Ankistrodesmus* and *Desmodesmus* genus have favorable characteristics for commercial production, therefore selected, one species each, to the present work. The algae were cultured in laboratory, under controlled conditions and under two stressful concentrations of sodium nitrate (10 g/L e 5 g/L). The stress in *D. spinosus* resulted in increased lipid accumulation, but also in a dramatic growth decrease. *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 of the physiology and autoecology of the strain to be grown on a commercial scale.

Keywords: culturing, phytophysiology, phytoplankton, stress

INTRODUÇÃO

A crise energética se tornou uma das maiores preocupações, e contorná-la, um dos maiores desafios do século 21. A depleção das reservas de petróleo e gás natural é estimada para ocorrer dentro de 40 e 64 anos, respectivamente (Vasudevan & Briggs, 2008). O uso de combustíveis derivados de biomassas tem sido apontado como uma alternativa capaz de minimizar esse problema. Programas incentivando a produção e o uso de biocombustíveis foram implantados em vários países nas últimas décadas, como o etanol no Brasil e nos Estados Unidos, e o biodiesel, cuja produção industrial foi alavancada na última década em várias regiões do mundo (Schenk, 2008, Chisti, 2007).

Microalgas são microrganismos 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). Além do biodiesel produzido a partir do óleo de microalgas, esses organismos podem ainda produzir outros diferentes tipos de biocombustíveis renováveis, incluindo bioquerosene (Singh & Gu, 2010), biohidrogênio produzido fotobiologicamente (Kapdan & Kargi, 2006) e metano produzido por digestão anaeróbica da biomassa algácea (Spolaore *et al.*, 2006).

Microalgas são uma promissora fonte alternativa de óleo para a produção de biodiesel, apresentando diversas vantagens em relação às atuais culturas de óleos vegetais, com uma estrutura morfológica simples com elevada potencialidade de produtividade de óleo. A produção não compete com recursos da agricultura tradicional, e as culturas podem ser mantidas usando água salgada ou salobra e nutrientes de efluentes (Chisti, 2007; Mata *et al.*, 2010; Rodolfi *et al.*, 2009). Existe ainda a possibilidade de utilização da biomassa residual para a produção de outros subprodutos, como antioxidantes, pigmentos, fármacos, fertilizantes e biomassa para alimentação humana ou animal (Mata *et al.*, 2010).

O cultivo de microalgas é um processo que se dá, após o isolamento da cepa, pela inoculação da espécie escolhida em um meio aquoso contendo nutrientes essenciais. Em laboratório, tradicionalmente utiliza-se meios de cultura com concentrações de macro e micronutrientes já pré-estabelecidas, e o cultivo é feito em ambiente fechado, com iluminação artificial e temperatura controlada. É uma ferramenta essencial para a produção de biomassa, além de, se desejado, prover 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 algumas apresentam certas vantagens e facilidades quando se objetiva a produção de biomassa, como um rápido crescimento, altas taxas de lipídios, alta resistência a contaminação por fungos e bactérias, e alta competitividade com outras espécies de algas (Lourenço, 2006). Duas das três espécies cultivadas no presente estudo pertencem à classe *Chlorophyceae*, uma classe que apresenta rápido crescimento e tolerância às condições de cultivo, com espécies já amplamente estudadas em cultivo e produzidas para alimentar organismos aquáticos, extração de carotenóides ou mesmo na alimentação e suplementação humana (Lourenço, 2006).

O gênero *Chlorella* Beijerinck 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 (Illman *et al.*, 2000, Wilson & Huner, 2000, Bashan *et al.*, 2005, 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 possuem conteúdo lipídico que pode chegar até 67% em conjunto com uma alta produtividade (Mata *et al.*, 2010).

Ankistrodesmus Corda 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 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 (Samorì *et al*., 2013). Entretanto, Hu *et al.* (2013) verificaram uma produção

lipídica de 50% do peso seco algáceo 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, minimização da predação e contaminação por outras espécies de algas, diminuição da energia utilizada para manter as culturas, e coleta de biomassa e 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 consequentemente a produção de óleo por esse método. 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) sugerem que menores concentrações de nitrogênio no meio de cultura acarretam em maior cúmulo lipídico, outros como Thomas *et al.* (1984) e Feng *et al.* (2011) afirmam 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 objetiva 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

Foram selecionadas três espécies de microalgas: *Desmodesmus spinosus* (Chodat) E. Hegewald, *Chlorella vulgaris* Beijerinck e *Ankistrodesmus fusiformis* Corda. Foi realizada uma coleta do fitoplâncton em uma lagoa artificial urbana na cidade de Vitória – ES, a lagoa da UFES, no campus Alaor de Queiroz Araújo da Universidade Federal do Espírito Santo, com auxílio de rede de plâncton com malha de 20 µm. Dessa amostra, foram isoladas as cepas de *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 500 mL das cepas de *D. spinosus* e *A. fusiformis* para servirem como inoculo para o experimento. De acordo com a resposta em testes piloto, padronizou-se o inoculo 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, consequentemente, acúmulo máximo de lipídios. As células foram contadas em câmara de Fuchs-Rosenthal e em réplicas.

O experimento foi realizado em cultivos de 500 mL em elernmeyers de 1 L em incubadoras, em meio de cultura BBM e sob condições controladas de temperatura a 26 ºC (±1), aeração por borbulhamento à pressão ambiente e luminosidade fornecida por lâmpadas fluorescentes, com intensidade de 108 μmol de fótons.m^{-2}.s^{-1} (8000 LUX), fotoperiodo 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 $NaNO_3$ utilizadas no experimento.

Tratamentos	Concentração de $NaNO_3$ (g/L)	Porcentagem (%)
C	0,25	100
T1	0,10	40
T2	0,05	20

Curva de crescimento e obtenção de biomassa

Foram retiradas a cada 48 h, 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: Fase de adaptação (ou fase *lag*), onde geralmente há aumento de biomassa, com pequenas variações na densidade celular; fase exponencial (ou fase *log*), quando a taxa de crescimento torna-se maior e aproximadamente constante; e fase estacionária, quando o cultivo atinge rendimento final máximo, expresso como o maior número possível de células por mililitro.

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.

Toda a biomassa seca foi colocada em béquer de 100 mL, onde foram adicionados 2 mL de água destilada para cada 0,5 g de biomassa seca, respeitando-se as proporções quando em quantidades menores que 0,5 g. 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 mais 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 um béquer e seca em estufa a 60 °C até restarem somente os lipídios totais em forma sólida, que foram pesados em balança analítica.

Análise dos dados

Foram calculadas as médias dos valores de absorbância das réplicas para cada dia de leitura em espectrofotômetro. As médias foram plotadas em gráficos e calculou-se o desvio-padrão de cada dia. Os valores de absorbância 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. As pesagens de lipídios, de biomassa ao final dos cultivos, bem como as porcentagens de lipídios em relação ao peso seco, foram submetidas aos mesmos testes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Detalhamento taxonômico das espécies estudadas

a) *Ankistrodesmus fusiformis* Corda ex Korshikov 1953 (Ordem Sphaeropleales; Família Selenastraceae). Prancha I, Fig. a

Descrição: Segundo Sant'Anna (1984) esta espécie apresenta colônias estreladas, cruciadas, com 2 até muitas células. Células fusiformes, retas a arcuadas, afilando gradualmente em direção aos ápices, apenas cruzando-se umas sobre as outras. Comprimento 22,0-70,0 µm, diâmetro 1,6-4,0 µm. Cloroplasto único, parietal, laminado, sem pirenoide.

Comentários: Segundo Komarkova-Legnerova (1969), *Ankistrodesmus fusiformis* forma colônias efêmeras, que logo se isolam os indivíduos constituintes. Segundo Sant'Anna (1984), a espécie pode se apresentar sob a forma de colônias grandes (mais de 8 células), pequenas (2-8 células) ou indivíduos isolados. No presente estudo, antes e durante o cultivo, foram observadas tanto colônias pequenas, quanto grandes, quanto indivíduos isolados, confirmando as observações dos supracitados autores.

b) *Desmodesmus spinosus* (R. Chodat) Hegewald 2000 (Ordem Sphaeropleales; Família Scenedesmaceae). Prancha I, Fig. b

Basinômio: *Scenedesmus spinosus* R. Chodat, Monographies d'algues en culture pure. 74, Figura 70-74. 1913

Descrição: Segundo Godinho (2009), esta espécie se apresenta como cenóbios planos formados por 4 células; células dispostas linearmente, elípticas a cilíndricas, pólos arredondados, células externas com 1-2 espinhos em cada pólo, 1 espinho na margem da célula externa, células internas com 1 espinho em cada pólo, podendo ocorrer espinhos

em toda parede celular; comprimento da célula 9,7-12,3 µm, largura 2,6-3,4 µm, espinhos polares 5-12 µm de comprimento; cloroplastídio parietal, 1 pirenoide.

Comentários: Segundo Godinho (2009), *Desmodesmus spinosus* (R. Chodat) Hegewald é muito parecido e facilmente confundido com *Desmodesmus abundans* (Kirchner) Hegewald. O que diferencia *D. spinosus* de *D. abundans* é a presença de dois espinhos de tamanhos desiguais entre si nas células externas. Às vezes, estes espinhos podem ocorrer sozinhos e, embora esporadicamente, também em número de três. Esta espécie é ainda confundida com *D. subspicatus* (R. Chodat) Hegewald & Schmidt. Difere, contudo, porque a *D. spinosus* manifesta uma tendência à desagregação dos cenóbios em células solitárias. Todas as características supracitadas foram observadas na cepa do presente estudo, corroborando os comentários do autor.

c) *Chlorella vulgaris* Beyerinck [Beijerinck] 1890 (Ordem Chlorellales; Família Chlorellaceae). Prancha I, Fig. c

Descrição: Segundo Mendes *et al.* (2012), *Chlorella vulgaris* se apresenta como células jovens elipsóides e as adultas, esféricas, 2,3-4,0 x 2,4-2,8 µm, isoladas ou em pequenos aglomerados transitórios. Cloroplasto único, parietal ocupando ¾ ou ½ da célula, presença de pirenóide. Reprodução por 2-4-8 autósporos. Autósporos elípticos. Segundo Bicudo & Menezes (2005), a espécie se apresenta como células esféricas, elipsoidais ou ovóides, podendo ser ainda reniforme ou um pouco assimétrica. Indivíduos solitários e de vida livre. Cloroplasto único na maioria das vezes, raro ocorrerem dois. Quando único, tem a forma de taça; quando em número de dois, cada um tem a forma de uma calota rasa e aberta. Pirenoide nem sempre presente.

Comentários: A cepa utilizada no presente estudo foi cedida pela Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce da UFSCar e apresentou as características descritas.

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 o crescimento, peso seco e teor de lipídios totais

A figura 1 representa as curvas de crescimento das culturas de *Desmodesmus 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 absorbância 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 conteúdo lipídico 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 um aumento de 114,2% do teor de lipídios totais em D1 e um aumento de 149,7% em D2 (Tab. 2). Estatisticamente, quanto ao peso de lipídios totais, não houve variação entre o controle e os tratamentos. Quanto ao peso seco, 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. Quanto à porcentagem de lipídios em relação ao peso seco, houve variação significativa entre o controle e os dois tratamentos, e estes variaram entre si (GL=2; F=13,3496; p>0,0321), havendo um acréscimo inversamente proporcional à concentração de nitrato de sódio.

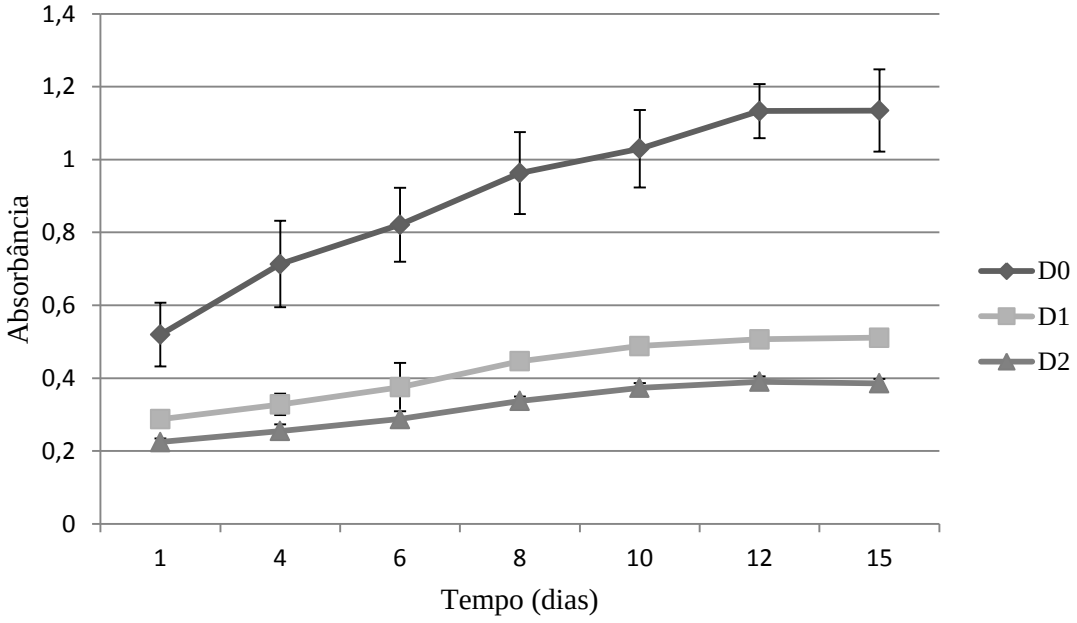

Fig. 1. *Curvas de crescimento das culturas de Desmodesmus spinosus submetidas a diferentes concentrações de nitrato de sódio (D0 = Controle; D1 = 40%; D2 = 20%).*

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 *Desmodesmus* sp. em meio BG-11, verificaram um aumento do teor de lipídios por massa seca de 55%, aliado a um maior crescimento. No presente

trabalho, na condição de maior estresse, houve um teor lipídico 149,7% maior do que no controle, mas com um crescimento suprimido, como evidenciado na Figura 1. Assim, questiona-se se houve de fato um aumento da produtividade em baixas concentrações de nitrato de sódio. Já no controle, *D. spinosus* apresentou maior acúmulo de biomassa e menor acúmulo lipídico. Dessa forma, sugere-se, para essa espécie, o uso de uma concentração entre 100% e 40% do total de nitrogênio do protocolo original do preparo do meio BBM para uma produção ótima tanto de biomassa, quanto de lipídios totais.

Nenhum dos parâmetros analisados (biomassa, curva 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). Quanto 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 uma fase *lag* durando até o dia 4 (Fig. 2). Os resultados da ANOVA não revelaram diferenças significativas para as porcentagens ($GL=2$; $F=0,0516$; $p<0,05$), pesagens de lipídios ($GL=2$; $F=0,6639$; $p<0,05$), ou de biomassa ($GL=2$; $F=6,799$; $p=0,0768$). Observa-se, entretanto, um ligeiro aumento gradativo do peso seco e dos lipídios totais, quando a concentração de nitrogênio do meio é decrescida. E, apesar de estatisticamente não significativo, houve um aumento de 2,3% no teor de lipídios totais em C2.

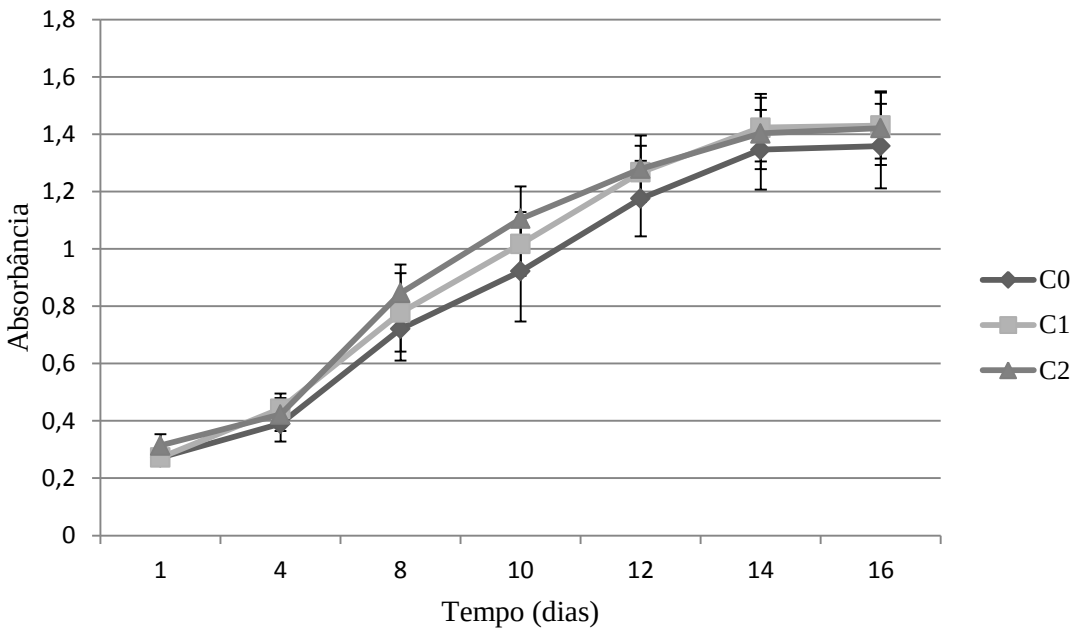

Fig. 2. *Curvas de crescimento das culturas de Chlorella vulgaris submetidas a diferentes concentrações de nitrato de sódio (C0 = Controle; C1 = 40%; C2 = 20%).*

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 um 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 por lâmpadas fluorescentes constante. Após 23 dias de crescimento celular, foi obtida uma produtividade em biomassa de 0,010 $g.L^{-1}.d^{-1}$.

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.$m^{-2}s^{-1}$. A microalga marinha *N. oculata* foi avaliada em concentrações de 0,075 g/L, 0,15 g/L e 0,30 g/L de $NaNO_3$ 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 $mg.L^{-1}.d^{-1}$ para 20,30 $mg.L^{-1}.d^{-1}$ ao reduzir a concentração de 1,5 g/L para 0,375 g/L de $NaNO_3$. Já no caso de *N. oculata*, a redução de 0,30 g/L para 0,075 g/L de $NaNO_3$ no meio de cultura aumentou a produtividade de lipídios de 10,01 $mg.L^{-1}.d^{-1}$ para 16,41 $mg.L^{-1}.d^{-1}$. 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 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. 3). 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). A biomassa no controle atingiu um valor menor do que nos tratamentos e observou-se leve decréscimo das pesagens e das porcentagens de lipídios totais proporcional à redução de

nitrato de sódio no meio de cultura. Contudo, os resultados da ANOVA não revelaram diferenças significativas para as porcentagens (GL=2; F=0,9686; p<0,05), pesagens de lipídios (GL=2; F=0,9015; p<0,05), ou de peso seco (GL=2; F=7,991; p=0,0628). Contudo, a curva de crescimento do controle se mostra mais atenuada, tendo atingido valores menores tanto de densidade óptica, quanto de peso seco, ao final do experimento. A pesagem e a porcentagem de lipídios totais se mostrou maior no controle, mostrando assim, que apesar da ausência de diferença significativa entre os valores analisados estatisticamente, a redução da concentração de nitrato de sódio em *A. fusiformis* induziu ligeiro acúmulo de biomassa e diminuição do conteúdo lipídico.

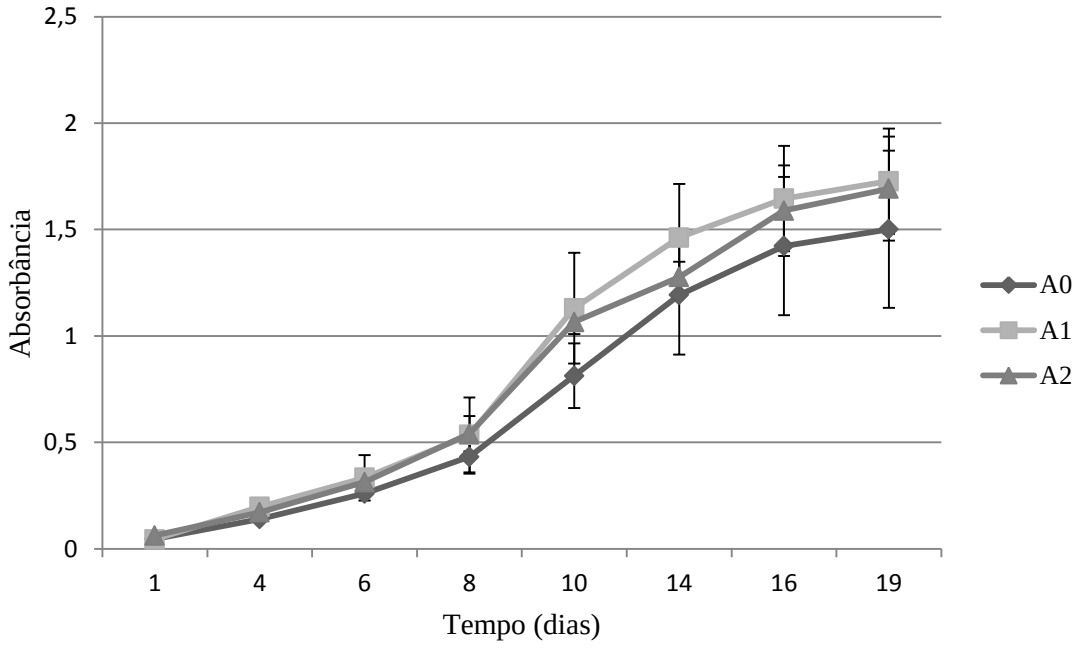

Fig. 3. *Curvas de crescimento das culturas de Ankistrodesmus fusiformis submetidas a diferentes concentrações de nitrato de sódio (A0 = Controle; A1 = 40%; A2 = 20%).*

Ao estressar culturas de *A. falcatus*, Kalita *et al*. (2011) obtiveram 43%, 48%, 56,1% e 51,2% de lipídios totais em relação ao peso seco 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 25ºC e fotoperiodo 16:8. Carolino (2011) encontrou para *A. fusiformis*, um conteúdo lipídico de 17,1% em condições normais de nutrientes em meio BBM, temperatura de aproximadamente 22ºC e fotoperiodo de 14:10. O presente estudo avaliou o desempenho de *A. fusiformis* em condições distintas (25 ºC, fotoperiodo 12:12), resultando em maior concentração 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.

Tabela 2. Teores de lipídios totais e porcentagem de acordo com o peso seco obtidos em cada espécie (D = *D. spinosus*; C = *C. vulgaris*; A = *A. fusiformis*) e cada tratamento (0 = Controle, 1 = 40%, 2 = 20%).

Tratamentos	**Peso seco (mg/500mL)**	**Lipídios totais (mg)**	**Porcentagem**
A0	174,20	41,80	23,9
A1	197,10	37,45	19,0
A2	194,50	36,45	18,7
C0	130,60	16,65	12,7
C1	134,80	17,25	12,7
C2	146,30	21,95	15,0
D0	217,30	13,25	6,09
D1	90,40	11,80	13,05
D2	85,10	12,95	15,21

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 à procura por espécies que não somente sejam promissoras para a produção em larga escala de biodiesel, mas que também tenham 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.

CONCLUSÕES

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. *D. spinosus*, nos tratamentos de estresse, apresentou um maior conteúdo lipídico, mas uma baixa produção de biomassa. *A. fusiformis* e *C. vulgaris* não apresentaram diferenças estatisticamente significativas no crescimento ou produção lipídica, mesmo quando em meio com -80% de nitrogênio. Evidencia-se, portanto, a importância do conhecimento da autoecologia da espécie a ser cultivada e de estudos preliminares das condições ótimas para a cepa isolada, visando a produção de biodiesel em escala comercial.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) pelo auxílio financeiro através da concessão da bolsa de mestrado; à Dra. Cláudia Maria Luz Lapa Teixeira do 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. Crit. Rev. Biotechnology, 22:245–279.

Bashan, L.E., Antoun, H. & Bashan, Y. 2005. Cultivation factors and population size control the uptake of nitrogen by the microalgae *Chlorella vulgaris* when

interacting with the microalgae growth-promoting bacterium azospirillum brasilense. microbiology ecology. 54:197–203.

Beijerinck, M.W. 1890. Culturversuche mit zoochlorellen, lichengonidien und anderen niederen algaen. Bot. ztg. 48:725-785.

Bicudo, C.E.M., Menezes, M. 2005. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil (chave para identificação e descrições). São Carlos, Rima, 508 p.

Bligh,E.G. & Dyer,W.J. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. Can.J.Biochem.Physiol. 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. 80 f. Tese de mestrado. 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 h2 production. J. Biotechnology. 131:27–33.

Feng, D., Chen, Z., Xue, S. & Zhang, W. 2011. Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (chrysophyta) by nitrogen supplement. Bioresource Technology. 102:6710–6716.

Godinho, L.R. 2009. Família Scenedesmaceae no Estado de São Paulo: Levantamento Florístico. Tese de doutorado. 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. J. Appl. Phycol. 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/. Acesso 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.

Illman, A.M., Scragg, A.H. & Shales, S.W. 2000. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. Enzyme and microbial technology, 27:631–635.

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. J. Microbiol. Biotech. Res. 1(4):148-157.

Kapdan, I.K. & Kargi, F. 2006. Bio-hydrogen production from waste materials. Enzyme Microb. Technol, 38:569–82.

Kilham, S., Kreeger, D., Goulden, C. & Lynn, S. 1997. Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*. Freshwater biology, 38:591-596.

Kormakova-Legnerova, J. 1969. The genera Ankistrodesmus Corda and Raphidium Kützing and their position in the family Ankistrodesmaceae. Presilia, Prague, 37: 1-8.

Lardon, L., Hélias, A., Sialve, B., Steyer, J.P. & Bernard, O. 2009. Life-cicle 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 tech. 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. São Carlos. Rima, 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, Ciênc. Tecnol. Aliment, 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 Bot. Bras. 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. Handbook of microalgal culture:biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Science, 2004.

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.

Samorì, G. Samorì, 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 res. 47(2):791-801.

Sant'Anna, C.L. 1984. Chlorococcales (Chlorophyceae) do Estado de São Paulo, Brasil. J. Cramer. 348p.

Schenk, P., Thomas-Hall, S., Stephens, E., Marx, U., Mussgnug, J. & Posten, C. 2008. Second generation biofuels: High-efficiency microalgae for biodiesel production. Bioenergy Research. 1(1):20–43.

Singh, J. & Gu, S. 2010. Commercialization potential of microalgae for biofuels production. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14(9): 2596-2610.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. & Isambert, A. 2006. Commercial applications of microalgae. Journal of bioscience and bioengineering, 101(2):87–96.

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. Acesso em 06.12.2013.

Vasudevan, P.T. & Briggs, M. 2008. Biodiesel production—Current state of the art and challenges. Journal of industrial microbiology & biotechnology. 35(5):421-430.

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.

Wilson, K. E., Huner, N.P.A. 2000. The role of growth rate, redoxstate of the plastoquinone pool and the trans-thylakoid delta pH in photoacclimation of *Chlorella vulgaris* to growth irradiance and temperature. Planta, 212:93–102.

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.