

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**CULTIVO DE *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*
FLOTOW (CHLOROPHYCEAE) EM SISTEMA
FOTOTRÓFICO E MIXOTRÓFICO A BASE DE
MEIO ALTERNATIVO**

Bruno Scardoeli Truzzi

Jaboticabal, SP

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**CULTIVO DE *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*
FLOTOW (CHLOROPHYCEAE) EM SISTEMA
FOTOTRÓFICO E MIXOTRÓFICO A BASE DE
MEIO ALTERNATIVO**

Bruno Scardoeli Truzzi

Orientadora: Profa Dra. Lúcia Helena Sipaúba Tavares

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Aquicultura do Centro de Aquicultura
da UNESP – CAUNESP, como parte
dos requisitos para obtenção do
título de Mestre.

Jaboticabal, SP

2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Unidade Complementar - Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Cultivo de *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae) em sistema fototrófico e mixotrófico a base de meio alternativo

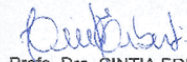
AUTOR: BRUNO SCARDOELI TRUZZI

ORIENTADORA: LUCIA HELENA SIPAUBA TAVARES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AQUICULTURA, área: Biologia Aquática, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. LUCIA HELENA SIPAUBA TAVARES

Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton / Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP



Profa. Dra. CINTIA ERBERT

Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias



Prof. Dr. CLAUDINEI DA CRUZ

Departamento de Agronomia / Centro Univ. da Fund. Educacional de Barretos

Jaboticabal, 26 de fevereiro de 2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Lúcia H. Sipaúba Tavares, que além da orientação, sempre incentivou e contribuiu para o meu desenvolvimento profissional e pessoal. Agradeço também por todas as oportunidades, amizade, confiança e paciência durante esses anos de orientação.

Aos amigos de laboratório, Aline, Lorena, Juliane e principalmente Taise que sempre ajudaram nas montagens e análises durante o período experimental. Agradeço também a Flavia Berchielli por todos ensinamentos e amizade durante o início da minha formação.

Agradeço aos meus amigos e familiares pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao Centro de Aquicultura da UNESP e ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura que disponibilizaram o espaço físico para realização deste projeto.

A CAPES pela bolsa concedida.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram neste trabalho.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL	9
DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE <i>Haematococcus pluvialis</i>	15
OBJETIVOS GERAIS	18
DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTUDO	18
PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA	21
REFERÊNCIAS	24
CAPÍTULO II.....	29
RESUMO	30
ABSTRACT	31
INTRODUÇÃO	32
MATERIAL E MÉTODOS	34
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO.....	41
CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46
CAPITULO III.....	56
RESUMO	57
ABSTRACT	58
INTRODUÇÃO	59
MATERIAL E MÉTODOS	61
RESULTADOS	65
DISCUSSÃO.....	68
CONCLUSÃO	72
REFERÊNCIAS	72

Lista de Figuras

Capítulo I

Figura 1. Ciclo de vida da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i>	16
Figura 2. Cultivo de microalgas evidenciando as condições de cultivo	19
Figura 3. Fertilizante inorgânico NPK nas seguintes relações: 20:5:20 (A); 12:6:12 (B); 10:10:10 (C), 4:14:8 (D)	22
Figura 4. Preparo da solução de melaço utilizada no cultivo sob condições mixotróficas, onde: melaço “in natura” (A), pesagem do melaço (B) e melaço diluído (C).....	23
Figura 5. Meios contendo a solução de melaço diluída nas diferentes nas proporções.....	23

Capítulo II

Figura 1. Crescimento da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> em diferentes meios de cultura durante o período experimental	50
Figura 2. Concentrações de nitrato (NO_3^-) e fósforo total (PT) em meio comercial WC e amônia (NH_3^-) no meio de cultura a base de fertilizante inorgânico NPK (20:5:20, 12:6:12, 10:10:10 e 4:14:8) durante o período de 28 dias no cultivo de <i>Haematococcus pluvialis</i>	51

Capítulo III

Figura 1. Densidade celular máxima de <i>Haematococcus pluvialis</i> em relação a concentração de melaço de cana de açúcar (10-13th= tempo em dias da máxima densidade celular)	76
Figura 2. Crescimento da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> em condições fototróficas e mixotróficas.....	77
Figura 3. Concentração de Nitrogênio Amoniacal Total (TAN) e Fósforo Total (TP) nos diferentes meios de cultivo sob condições fototróficas e mixotróficas, diferentes letras minúsculas na parte superior de cada coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,01$).....	78

Lista de tabelas

Capítulo I

Tabela 1. Diferentes tipos de metabolismo algal em função das condições de cultivo	11
Tabela 2. Forma de diluição das soluções constituintes do meio de cultura WC (Guillard e Lorenzen, 1972)	21
Tabela 3. Preparo do meio de cultura WC (Guillard e Lorenzen, 1972)	22

Capítulo II

Tabela 1. Composição dos diferentes fertilizantes inorgânicos	52
Tabela 2. Variáveis fisiológicas da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> em diferentes meios de cultura	53
Tabela 3. Conteúdo de aminoácidos (g 100g peso seco) da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> nos diferentes meios de cultura. Todos os valores são médias $\pm$ desvio padrão (n=2)	54
Tabela 4. Variáveis dos meios de cultura ao longo do período experimental.....	55

Capítulo III

Tabela 1. Variáveis fisiológicas da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> após o cultivo em condições fototróficas e mixotróficas	79
Tabela 2. Conteúdo de aminoácidos (g 100g peso seco) na microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> após cultivo fototrófico e mixotrófico. Todos os valores são médias $\pm$ desvio padrão (n=2).....	80

Resumo

As microalgas são organismos que apresentam diversificada composição bioquímica e tem atraído interesse de várias áreas comerciais e de pesquisas focadas na obtenção de compostos de alto valor comercial. Algumas espécies são cultivadas em larga escala, como por exemplo a microalga *Haematococcus pluvialis*, que na aquicultura desempenha papel fundamental como fonte alimentar de organismos aquáticos. O crescimento, desenvolvimento e a composição bioquímica algal são influenciados por diversos fatores como o meio de cultura e as condições de cultivo. Um dos maiores problemas na produção destes microrganismos em larga escala é o elevado custo de produção, principalmente devido as formulações dos meios de cultura. O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho da microalga *H. pluvialis* cultivada em meios de cultura alternativos com baixo custo de produção comparado ao meio comercial WC, sob duas condições de cultivo: fototrófico e mixotrófico. Em condição fototrófica, a microalga foi cultivada em meio a base de fertilizante inorgânico NPK nas relações (20:5:20, 12:6:12, 10:10:10 e 4:14:8) e em condição mixotrófica foi testado a adição de melaço como fonte orgânica de carbono. Este estudo foi realizado em ambiente com condições controladas em volume de 2 litros. A microalga *Haematococcus pluvialis* apresentou crescimento e desenvolvimento satisfatório quando cultivada em meio alternativo à base de fertilizante inorgânico sob condição fototrófica. Em relação ao cultivo mixotrófico utilizando melaço de cana-de açúcar como fonte alternativa de glicose, a produção de biomassa é diretamente influenciada pelo meio de cultura adotado. A relação 10:10:10 apresentou elevada densidade celular comparada ao meio comercial WC, sendo a mais indicada para obtenção de alta produtividade. O meio de cultura adotado também influenciou a composição bioquímica desta espécie, sendo obtidos elevados teores de proteína e aminoácidos totais e baixa produção de lipídios, uma vez que, a disponibilidade e consumo de nitrogênio e fósforo no cultivo foi alta. A adição de melaço pode ser uma alternativa econômica na substituição de fontes orgânicas de carbono comumente utilizada em cultivo mixotrófico, podendo estimular o crescimento de *H. pluvialis* e induzir maior produção de aminoácidos totais, no entanto em meio a base de fertilizante o crescimento da microalga não foi satisfatório evidenciando que o

meio de cultura também influencia as condições de cultivo. Comparando os resultados obtidos, para estas condições de cultivo testadas, a microalga *Haematococcus pluvialis* tem melhor desenvolvimento sob condição fototrófica de cultivo e o uso de meios de cultura utilizando fontes alternativas de nutrientes é uma técnica adequada para reduzir os custos de produção e obter alta produtividade com elevado valor nutricional.

Palavras-chave: Fertilizante inorgânico, melaço de cana-de-açúcar, desempenho algal.

Abstract

Microalgae are organisms with diversified biochemical composition and are increasingly being focused by several commercial firms and research areas to obtain compounds with high commercial value. Some species, such as the microalga *Haematococcus pluvialis*, are cultivated on a large scale and have a fundamental role as feed sources of water organisms. Growth, development and biochemical composition of the algae are affected by several factors such as the culture medium and breeding conditions. One of the most important issues in the large scale production of these microorganisms is high production costs especially due to the formulation of culture media. Current paper evaluates the performance of microalga *H. pluvialis* bred in alternative culture media with low production costs when compared to WC commercial medium under phototrophic and mixotrophic culture conditions. In phototrophic conditions, the microalga was cultivated in a medium based on the inorganic fertilizer NPK at different ratios (20:5:20, 12:6:12, 10:10:10 and 4:14:8), whereas in mixotrophic conditions it was tested by adding sugar cane molasses as the organic source for carbon. Current analysis was performed in a 2-L volume in controlled conditions. The microalga *Haematococcus pluvialis* grew and developed successfully when cultivated in an alternative medium based on inorganic fertilizers under phototrophic conditions. In the case of mixotrophic culture with sugar cane molasses as an alternative glucose source, biomass production was directly affected by the culture medium used. The ratio 10:10:10 had high cell density when compared to that of WC commercial medium, more appropriate for high productivity. Culture medium also influenced the biochemical composition of the species with high levels of proteins and total amino acids and low production of lipids due to the high availability and intake of nitrogen and phosphorus in the culture. The addition of molasses may be an economical alternative in the substitution of organic sources of carbon commonly used in mixotrophic culture and may stimulate the growth of *H. pluvialis* and induce higher production of total amino acids. However, the growth of the microalga in a fertilizer-based medium was not satisfactory and revealed that the culture medium also influenced the culture conditions. When results were compared for the conditions of the tested culture, the microalga *Haematococcus pluvialis* developed better under phototrophic conditions. The use of culture media with alternative nutrient sources

was an adequate technique to lower production costs and obtain high productivity with high nutritional rates.

Keywords: inorganic fertilizer, cane molasses, performance of algae.

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO GERAL

As microalgas são organismos fotossintéticos que utilizam luz e CO₂ como fonte de carbono para produção de biomassa (Pérez–Garcia et al. 2011); e apresentam altas taxas de conversão da energia solar em biomassa (Schenk et al. 2008). Estes microrganismos podem ser unicelulares, coloniais ou filamentosos; são comuns em ambientes aquáticos, principalmente em água doce (90%), águas salgadas ou salobra e nos solos; podem apresentar ou não motilidade; a maioria apresenta vida livre, porém podem viver em associação simbiótica com tolerância à ampla gama de condições ambientais (Lee, 2008).

Segundo Reiers (2006), além das Cyanobacteria, existem outros 10 grupos de algas eucarióticas distribuídos nas linhagens da coroa de divergência como as: Chlorophyta (algas verdes); Rhodophyta (algas vermelhas); Glaucophyta (algas unicelulares com plastídios verde-azulados); Cryptophyta (unicelulares flagelados com plastídios de cores variadas); Picobiliphyta (algas unicelulares picoplanctônicas, descobertas em 2007 e ainda pouco conhecidas); Euglenophyceae (unicelulares flagelados, incolores ou com plastídios verdes); Chlorarachniophyceae (amebas ou ameboflagelados com plastídios verdes); Haptophyta (com plastídios castanho-dourados, majoritariamente unicelulares são um componente importante do plâncton marinho); Ochrophyta (14 classes de algas com plastídios castanho-dourados, como, por exemplo, as diatomáceas ou as algas pardas) e as Dinophyta (algas incolores ou providas de plastídios de cores variadas, majoritariamente planctônicas, unicelulares e flageladas). Dentre a distribuição de classes, são consideradas mais abundantes as diatomáceas (Bacillariophyceae), as algas douradas (Chrysophyceae) e as algas verdes (classe Chlorophyceae) (Demirbas e Demirbas, 2010).

Comparado a plantas terrestres, o crescimento algal pode ser 100 vezes mais acelerado e a duplicação de biomassa pode ocorrer em menos de um dia, devido apresentarem estrutura celular simples e elevada relação superfície/volume, favorecendo maiores taxas de assimilação de nutrientes (Lam et al. 2012). Outra importante característica das microalgas é o elevado consumo de CO₂, que de forma eficiente é convertido em biomassa liberando oxigênio via fotossíntese para

a atmosfera (Rossi et al. 2015). Assim, estes organismos são considerados responsáveis por pelo menos 60% da produção primária da Terra (Chisti, 2004).

Nos ambientes aquáticos, desempenham fundamental papel na ciclagem dos nutrientes, balanço do pH e na remoção do dióxido de carbono, gerando oxigênio e promovendo melhoria na qualidade da água através da absorção de compostos nitrogenados (Pérez-Garcia et al. 2011); na remoção de contaminantes orgânicos; metais pesados e microrganismos patogênicos presente em águas residuais (Munoz e Guieysse, 2006).

As microalgas apresentam composição bioquímica diversificada (carboidratos, proteínas, lipídios, ácidos graxos, etc.) sendo diretamente influenciadas pelas condições de cultivo, fatores ambientais e variando de acordo com a espécie (Miao e Wu, 2004). As clorofíceas comumente contêm em sua composição cerca de 32% de fibras totais, 10% de minerais, 44% de albumina, 12% de ácidos graxos, e 2% de clorofila em relação ao peso seco (Paniangua, 2003). Consideradas excelentes fontes produtoras de lipídios, o acúmulo pelas células pode ultrapassar 80% em relação ao seu peso, embora a maioria das espécies são reportadas com níveis variando entre 20% e 50% (Chisti, 2007). A limitação de alguns elementos em seu cultivo, como nitrogênio e fósforo, pode alterar a produção de determinados compostos intracelulares aumentando ou reduzindo o acúmulo pelas células (Illman et al. 2000).

As microalgas apresentam fases características de crescimento e desenvolvimento, a duração de cada fase é diretamente influenciada por fatores nutricionais, físicos, químicos e biológicos característicos de cada espécie cultivada (Richmond, 2004). O crescimento e a composição das microalgas são definidos pelas condições de cultivo, e devido à capacidade de se adaptarem a diversos ambientes estes microrganismos podem assumir alguns tipos de metabolismo, sendo capazes de alterar sua rota metabólica como resposta às mudanças ambientais (Mata et al. 2010). Os principais tipos de regime algal são: fototrófico, heterotrófico e mixotrófico. Na tabela abaixo encontram-se as principais características de cada condição de cultivo (Chen et al. 2011).

Tabela 1. Diferentes tipos de metabolismo algal em função das condições de cultivo

Condição de cultivo	Fonte de energia	Fonte de carbono
Fototrófico	Luz	Inorgânico
Heterotrófico	Composto orgânico	Orgânico
Mixotrófico	Luz ou composto orgânico	Inorgânico ou orgânico

Adaptado de Chen et al. 2011.

O cultivo em condições fototróficas apresenta como principal característica a utilização de luz como fonte de energia e carbono orgânico (CO₂) como fonte de carbono, sendo ambos convertidos em energia química através de reações fotossintéticas (Huang et al. 2010, Cheirsilp e Torpee, 2012). Este tipo de cultivo é comumente utilizado em produções de microalgas em larga escala, uma vez que são realizados em locais abertos para maior aproveitamento da incidência de luz (Yoo et al. 2010).

Embora a luminosidade atue como principal fator de eficiência sobre o cultivo de microalgas em condições fototróficas, a limitação de luz ocasionada pela alta densidade celular ou o excesso de luz (fotoinibição) podem acarretar reduções no crescimento algal. Neste tipo de regime, as culturas requerem um maior período de cultivo para obter elevada densidade celular (Adesanya et al. 2014).

Em cultivo sob condições heterotróficas, as microalgas utilizam fontes de carbono orgânico tanto como fonte de energia quanto como fonte de carbono na ausência de luminosidade (Liang, 2013). Neste sistema é possível evitar problemas associados à limitação de luz, apresentando relevantes resultados na produção de biomassa, sendo os rendimentos significativamente superiores aos do cultivo fototrófico. Porém nem todas espécies conseguem se desenvolver neste tipo de condição (Huang et al. 2010).

O crescimento da microalga em condições heterotróficas oferece outras vantagens além da ausência da luminosidade e maior acúmulo de biomassa, como por exemplo melhor controle das condições de cultivo e maior produção de lipídeos (Gim et al. 2014). No entanto, o metabolismo heterotrófico é questionado em relação aos custos de produção, uma vez que as microalgas necessitam de elevadas concentrações de carbono no meio para que não ocorra inibição no metabolismo e a adição de uma fonte de carbono orgânico apresenta elevado custo podendo inviabilizar este tipo de cultivo (Su et al. 2012, Liang, 2013).

Condição mixotrófica de cultivo é uma combinação entre as condições fototróficas e heterotróficas, onde pode ser empregada luz além de compostos orgânicos como fontes de energia (Wang et al. 2014). Este sistema apresenta como principal vantagem maior e melhor aproveitamento da energia, uma vez que a cultura tem menor dependência da luminosidade (Cerón-García et al. 2000, Liang et al. 2009). Algumas espécies são capazes de adaptar seu metabolismo para estas condições, podendo melhorar significativamente a produtividade de biomassa (densidade celular e taxa de crescimento), reduzindo os custos de produção gastos com a adição de fontes de carbono (Girard et al. 2014). Outra forma indicada para reduzir os gastos ocasionados pela adição de fontes de carbono é o uso de fontes alternativas como águas residuais, melaço de cana e carboidratos hidrolisados, que apresentam em sua composição elevada concentração de glicose (Liang, 2013).

O meio de cultura utilizado no cultivo de microalgas é o principal fator responsável pela alta produtividade. Os nutrientes presentes nesses meios podem estimular ou inibir o crescimento de acordo com a sua disponibilidade (Sipaúba-Tavares et al. 2011). A constituição do meio de cultura não só influencia o crescimento celular, mas também influencia a composição das células e a síntese de outros produtos; por isso, uma das principais características dos meios de cultura é suprir as necessidades nutricionais das microalgas (Imamoglu et al. 2007).

Alguns nutrientes são considerados essenciais para o crescimento das microalgas, como o nitrogênio, fósforo, cálcio, magnésio e potássio, entre outros (Sipaúba-Tavares e Rocha, 2001). O nitrogênio é um dos principais elementos responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento algal. Várias formas de nitrogênio são comumente utilizadas, como nitrato, ureia e amônia; porém, a amônia é a fonte que apresenta maior preferência de assimilação (Shi et al. 2000, Liu et al. 2013). A amônia é assimilada preferencialmente pela maioria das microalgas, porém em cultivos de larga escala a ureia é utilizada devido ao baixo custo e dificulta a contaminação do cultivo por protozoários ou outras algas (Xia et al. 2013). O fósforo também é um elemento essencial para o cultivo de microalgas, pois auxilia nos processos metabólicos, na conversão de energia e na fotossíntese (Junying et al. 2013, Rashid et al. 2014).

Os micronutrientes também são fontes nutricionais importantes para o crescimento algal. A deficiência de determinado micronutriente, como por exemplo

o ferro, está relacionado com a diminuição da densidade celular de algumas espécies (Imamoglu et al. 2009). O ferro também é um micronutriente fundamental para estimular o acúmulo de pigmentos (Wang et al. 2013). Além dos macros e micronutrientes considerados essenciais, o uso de vitaminas complementa o meio e ajuda elevar a produção de biomassa e são essenciais para muitas espécies (Sipaúba-Tavares e Rocha, 2001, Sipaúba-Tavares e Bachion, 2002).

Em condições onde a disponibilidade de nutrientes é baixa, é possível constatar uma redução na divisão celular, taxa fotossintética e síntese de proteínas. A energia fotossintética antes utilizada na divisão celular é voltada para o acúmulo de carboidratos e de lipídeos, ocorrendo também aumento na síntese de enzimas específicas para a absorção de nutrientes (Yeh e Chang, 2012).

O maior problema relacionado à produção do meio de cultura é o elevado custo de produção. Assim, alguns meios de cultura alternativos têm sido propostos como substitutos dos reagentes utilizados nas formulações dos meios comerciais, obtendo-se resultados similares tanto no crescimento algal como no valor nutricional da espécie (Sipaúba-Tavares et al. 2009). O uso de fertilizantes inorgânicos para a formulação de meios de cultura é uma alternativa de baixo custo e atua de forma eficiente no desenvolvimento algal (Sipaúba-Tavares et al. 1999, 2009, Campaña-Torres et al. 2012). Outros autores também utilizaram águas residuais de estações de tratamento de esgoto doméstico (Bhatnagar et al. 2011) e meio a base de plantas aquáticas (Sipaúba-Tavares e Braga, 2007).

A aeração no cultivo de microalgas está relacionada à diversos fatores que influenciam nos parâmetros de crescimento celular. Uma das principais funções da aeração é impedir que as células algais se aglomerem, garantindo maior incidência luminosa sob o cultivo. Manter a aeração nos sistemas de cultivo também ajuda na mistura do meio de cultura, auxiliando uma distribuição homogênea de nutrientes e favorecendo a troca de gases e, conseqüentemente, aumentando a produtividade (Lee e Shen, 2004). A falta de oxigênio nas culturas dificulta a absorção de luz por cada célula de microalga e o desenvolvimento se torna limitado (Brennan e Owende, 2010).

O principal papel da temperatura nos sistemas de cultivo de microalgas é auxiliar a dissociação das moléculas de carbono, disponibilizando-as para os

processos fotossintéticos, além de ser responsável por regular as respostas morfológicas e fisiológicas das células (Zeng et al. 2011). Altas temperaturas podem aumentar as taxas metabólicas, enquanto baixas temperaturas podem inibir o crescimento algal (Munoz e Guieysse, 2006). Os níveis ótimos de temperaturas são influenciados por outros parâmetros ambientais, tais como, a intensidade luminosa (Zeng et al. 2011). No entanto, a maioria das microalgas desenvolve-se em temperaturas entre 10 e 35°C, com ótimo crescimento entre 15 e 25°C (Sipaúba-Tavares e Rocha, 2001).

Devido a capacidade das microalgas em assimilarem carbono inorgânico, o pH durante o cultivo também deve ser controlado e monitorado, pois possuem tendência de aumentar durante o cultivo (Rocha et al. 2003). O controle e monitoramento do pH é fundamental, uma vez que a elevação do mesmo acarreta na decantação de nutrientes como o ferro e pode ocasionar aglomeração das microalgas junto com o precipitado (Sipaúba-Tavares e Rocha, 2001). A grande maioria das espécies de microalgas possui ótimo crescimento em pH neutro, porém algumas espécies crescem sob condições ácidas ou alcalinas (Zeng et al. 2011).

A luminosidade exerce importante influência no crescimento e desenvolvimento das microalgas e é fundamental na realização da fotossíntese (Oncel e Akpolat, 2006). A intensidade requerida é específica para cada espécie e quando a sua distribuição é homogênea sob o cultivo, proporciona melhores taxas de absorção de energia aumentando a eficiência fotossintética (Sipaúba-Tavares et al. 2011). As microalgas podem ser cultivadas utilizando tanto luz solar quanto luz artificial como fonte de energia, e variações na intensidade luminosa podem induzir alterações na composição bioquímica das microalgas (Krzemińska et al. 2014). O uso da luminosidade acima do requerido para cada espécie acarreta redução nas taxas de crescimento, sendo este fenômeno denominado fotoinibição, enquanto baixos níveis de luz limitam o crescimento das microalgas (Chisti, 2007). Para maioria destes organismos, a saturação devido ao excesso de luminosidade é em torno de $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Teo et al. 2014).

Comumente em condições laboratoriais os cultivos são realizados sob luminosidade constante, porém algumas espécies de microalgas podem entrar em estresse quando sujeitas a 24h de iluminação, sendo muitas vezes utilizados ciclos de fotoperíodo. Em geral podem ser de 20:4, 16:8, 14:10 ou 12:12 horas

claro/escuro, sendo relatados como fator determinante na taxa de atividade fotossintética das microalgas (Janssen et al. 2001).

Algumas microalgas já são cultivadas comercialmente, como as espécies *Chlorella beyerinck*, (Chlorophyceae) e *Arthrospira stizenberger* (Cyanophyceae) extraindo destas microalgas aditivos para alimentos naturais (“health food”). Já *Dunaliella salina*, (Chlorophyceae) pode ser utilizada na obtenção de β -caroteno e *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) na obtenção de astaxantina (Becker, 2004). Estima-se que a produção anual de biomassa algal é cerca de 5 milhões de quilos por ano, com valor de mercado próximo a 330 USD por kg (Pulz e Gross, 2004).

O cultivo das microalgas tem sido foco de diversas pesquisas com fins biotecnológicos para produção de substâncias específicas (Antelo et al. 2008). Por apresentar composição bioquímica diversificada, as microalgas são utilizadas como suplementos alimentares, para o desenvolvimento de produtos nutracêuticos, fonte de carboidratos e proteínas usados na indústria alimentícia e cosmética; pigmentos (carotenoides, ficobilina e clorofila), indústria cosmética e farmacêutica e lipídeos, principalmente ácidos graxos, utilizados na produção de biocombustíveis (Spolaore, 2006). Para produção de biocombustíveis, as microalgas podem ser cultivadas e convertidas em combustível através de diferentes vias metabólicas gerando biodiesel, bioetanol, biohidrogênio, biogás, biogasolina e bio-óleo (Singh e Gu, 2010).

Na aquicultura a biomassa algal pode ser utilizada como importante aditivo alimentar para os organismos aquáticos, fornecendo proteínas, vitaminas e micronutrientes (Riquelme e Avendaño-Herrera, 2003, Sipaúba-Tavares e Pereira, 2008, Ju et al. 2009).

DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE *Haematococcus pluvialis*

Segundo Hoek et al. (1995), a microalga *Haematococcus pluvialis* apresenta a seguinte classificação:

Divisão: Chlorophyta

Classe: Chlorophyceae

Ordem: Volvocales

Família: *Haematococcaceae*

Gênero: *Haematococcus*

Espécie: *Haematococcus pluvialis*

Os membros pertencentes a esta ordem apresentam características únicas, como mobilidade, que está presente tanto na fase reprodutiva quanto na fase vegetativa (Khondker et al. 2007).

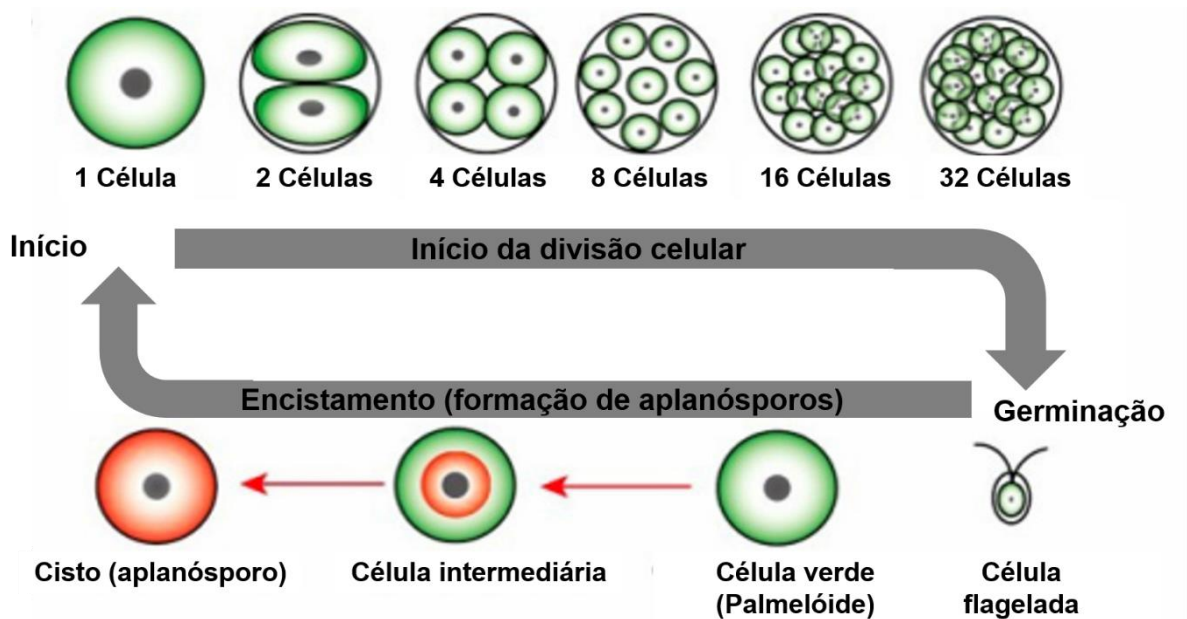


Figura 1. Ciclo de vida da microalga *Haematococcus pluvialis* (adaptado de Wayama et al. 2013)

Haematococcus pluvialis é uma microalga verde que pode sintetizar grande quantidade de astaxantina sob várias condições de estresse (Sarada et al. 2002) acumulando até 5% do seu peso seco (Lorenz e Cysewski, 2000). A astaxantina (3,3-di-hidroxi- β , β -caroteno-4,4-diona) é um carotenoide com alto poder antioxidante e possui um elevado valor de mercado, mais de \$200 milhões de dólares por ano (Li et al. 2011). Este composto tem atraído atenção devido à sua ampla aplicação e uso na formulação de cosméticos e fármacos, indústria alimentícia e como suplemento alimentar (Holtin et al. 2009).

Na aquicultura, a microalga *Haematococcus pluvialis* possui diversas aplicações, sendo utilizada no preparo de dietas de organismos aquáticos e

aumentando a pigmentação em espécies de camarões e de peixes como trutas, salmões e espécies ornamentais (Chien e Shiau, 2005). Cuzon et al. (2004), estudando o efeito da astaxantina produzida por *H. pluvialis* na alimentação do camarão *Litopennaeus vannamei*, relataram maior taxa de sobrevivência das larvas. A utilização de *H. pluvialis* em dietas alimentares da truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*) mostrou grande potencial de melhorar a qualidade dos seus ovos (Sheikhzadeh et al. 2012).

Várias pesquisas foram realizadas visando obter maior crescimento de *Haematococcus pluvialis* sob diversas condições de cultivo (Cifuentes et al. 2003, Fabregas et al. 2000, Göksan et al. 2011, Kaewpintong et al. 2007). Para o cultivo comercial de *H. pluvialis* é utilizado como estratégia de produção um sistema dividido em duas fases: a primeira denominada fase verde, onde obtém-se o máximo crescimento celular em menor tempo de cultivo; e a segunda fase denominada de indução, onde ocorre a síntese e acúmulo de astaxantina. Nesta fase as células crescem lentamente, mas podem acumular grande quantidade de astaxantina em relação ao peso seco (Aflalo et al. 2007).

A biossíntese de astaxantina é diretamente afetada pela intensidade luminosa de cultivo, alta luminosidade reduz o crescimento, porém estimula o acúmulo de astaxantina (Boussiba, 2000, Zhekisheva et al. 2005). No entanto a indução ao acúmulo de astaxantina em *Haematococcus pluvialis* não é decorrente apenas da maior intensidade luminosa; a deficiência de nitrogênio também induz a carotenogênese nesta espécie (Del Campo et al. 2004, Orosa et al. 2001). Sendo assim, para obter alta produção de astaxantina e alta produtividade, inicialmente as microalgas são cultivadas em meios contendo nitrogênio e luminosidade favorável para produção de biomassa, seguido de uma fase de indução (Zhang et al. 2009). Entender as características que influenciam o crescimento e desenvolvimento de determinada espécie de microalga possibilita a otimização dos sistemas de cultivo, uma vez que, é de grande importância manter o crescimento desta espécie em estado vegetativo para o máximo acúmulo de biomassa algal fornecendo os nutrientes necessários e reduzindo os custos de produção.

OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos deste estudo:

- ❖ Avaliar o crescimento e desenvolvimento da microalga *Haematococcus pluvialis* em sistema fototrófico utilizando fertilizante inorgânico, verificando qual proporção do meio é a mais adequada;
- ❖ Avaliar o crescimento e desenvolvimento de *H. pluvialis* em sistema mixotrófico utilizando melaço de cana-de-açúcar como fonte alternativa de carbono, avaliando se esse componente é importante no crescimento dessa espécie em meio a base de fertilizante;
- ❖ Determinar sobre o valor nutricional da espécie em função das condições de cultivo testadas;
- ❖ Comparar através dos resultados obtidos as características e benefícios dos diferentes sistemas utilizados para o cultivo de *H. pluvialis*.

DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTUDO

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), Jaboticabal, SP. Um dos setores do laboratório é o de cultivo de microalgas, que possui uma área total de 28,43 m² compreendendo uma sala de assepsia e um cepário, no qual foi realizado o experimento e onde são mantidas as culturas de microalgas.

O cepário foi construído com pisos de cerâmica de cor gelo, paredes revestidas de azulejos brancos, contendo prateleiras de estrutura vazada que permitem a máxima passagem da luz e um sistema de cultivo com condições artificiais de iluminação, aeração e temperatura. A iluminação é composta por lâmpadas fluorescentes, evitando interferência na temperatura do local, e são distribuídas de forma intercalada atingindo todos os ângulos do cepário. A refrigeração é mantida de forma constante por um ar condicionado e a aeração é fornecida por um sistema artificial de compressores e filtros de ar diminuindo o risco de contaminação das culturas.



Fonte: Imagem do autor

Figura 2. Cultivo de microalgas evidenciando as condições de cultivo.

Todo laboratório é abastecido com água proveniente de nascente, localizada na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP- Campus de Jaboticabal. Após a captação a água é armazenada em reservatório, atuando como um tanque de decantação de particulados sólidos provenientes da nascente e como reserva d'água para funcionamento do laboratório em casos de falha na captação e bombeamento. Antes de abastecer o laboratório, a água passa por um sistema de dupla filtragem por filtros CUNO (5 e 1 μm) reduzindo a perda de pressão da água no processo, sendo que as tubulações por onde a água passa (canos/torneiras) é feita de materiais plásticos para evitar possíveis contaminantes.

PREPARO DOS MEIOS DE CULTURA

Para realização dos experimentos sob condição fototrófica, foi utilizado meio comercial WC (Guillard e Lorenzen, 1972), este meio apresenta em sua composição vários reagentes químicos que possuem altos custos de produção, dificultando sua aplicação em larga escala. A tabela abaixo mostra os reagentes que compõem este meio e a forma de preparo.

Tabela 2. Forma de diluição das soluções constituintes do meio de cultura WC (Guillard e Lorenzen, 1972).

Soluções	Reagentes
Solução A- diluir em 1 L de água destilada	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 18,36 g.
Solução B- diluir em 1 L de água destilada	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 18,47 g.
Solução C- diluir em 1L de água destilada	NaHCO_3 - 6,30 g.
Solução D- diluir em 1 L de água destilada	H_3BO_3 - 3,50 g.
Solução E	TRIS (Hydroximetil Amino-Metano) - 200 g. HCL (P.A) - 70 mL Água destilada - 930 mL
Solução F- Fosfato –diluir em 1 L de água destilada	KH_2PO_4 - 67,8 g. Biotina – $\text{B}_6^{(1)}$ - 1,0 mL** Tiamina $^{(1)}$ - 1,0 mL**
Solução G- Nitrato- diluir em 1 L de água destilada	NaNO_3 - 470,0 g. $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 18,32 g. Na_2EDTA - 8,7 g. Traços de Metais-soluções estoque $^{(2)}$ - 1,0 mL

⁽¹⁾ solução estoque de Biotina e Tiamina xx/100 mL de água destilada.

** Depende da quantidade de vitamina pesada.

⁽²⁾ Soluções estoque de traços de metais:

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2,00 g.

$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 36,9 g.
 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2,00 g.
 ZnCl_2 2,00 g.
 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,20 g.
 Solução diluída para 100 ml.

Posteriormente, para o preparo do meio WC as soluções foram diluídas seguindo a ordem e volume como mostrado na tabela 3.

Tabela 3. Preparo do meio de cultura WC (Guillard e Lorenzen, 1972).

Componentes	Volume (ml)
Água destilada	5.000
Solução A	10,0
Solução B	10,0
Solução C	10,0
Solução D	10,0
Solução E	25,0
Solução de Fosfato	2,5
Solução de Nitrato	2,5

Além do meio comercial WC, foi utilizado o meio a base de fertilizante inorgânico NPK em quatro relações (Figura 3). O meio NPK é um fertilizante químico, composto por uréia (fonte de nitrogênio), superfosfato simples (fonte de fósforo) e sulfato de potássio (fonte de potássio). Para o seu preparo, cerca de 50 g de fertilizante inorgânico foram pesados, posteriormente triturados, diluídos em 1 litro de água destilada e autoclavados a 120°C durante 20 minutos.

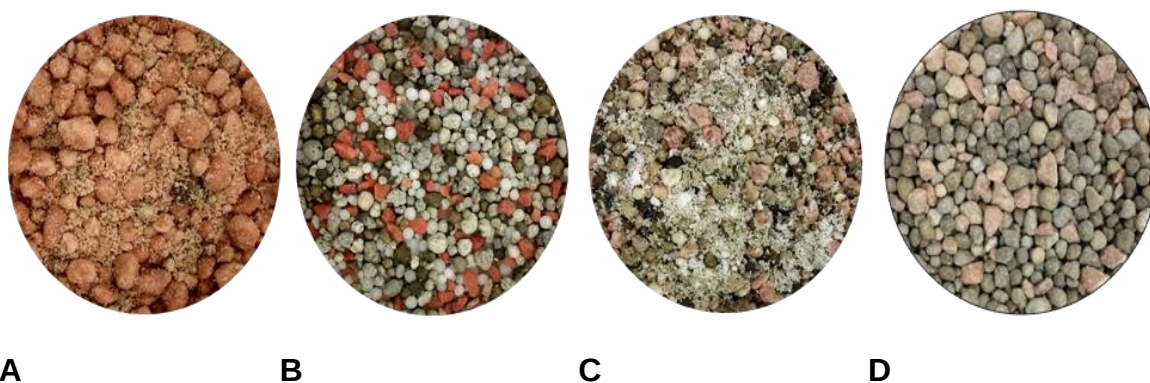


Figura 3. Fertilizante inorgânico NPK nas seguintes relações: 20:5:20 (A); 12:6:12 (B); 10:10:10 (C), 4:14:8 (D).

Para realização dos experimentos sob condição mixotrófica foi utilizado melaço de cana de açúcar “in natura” como fonte alternativa de carbono orgânico, posteriormente o melaço foi pesado em seis concentrações 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25 e 1,5 g L⁻¹ e diluído em água destilada (Figura 4).

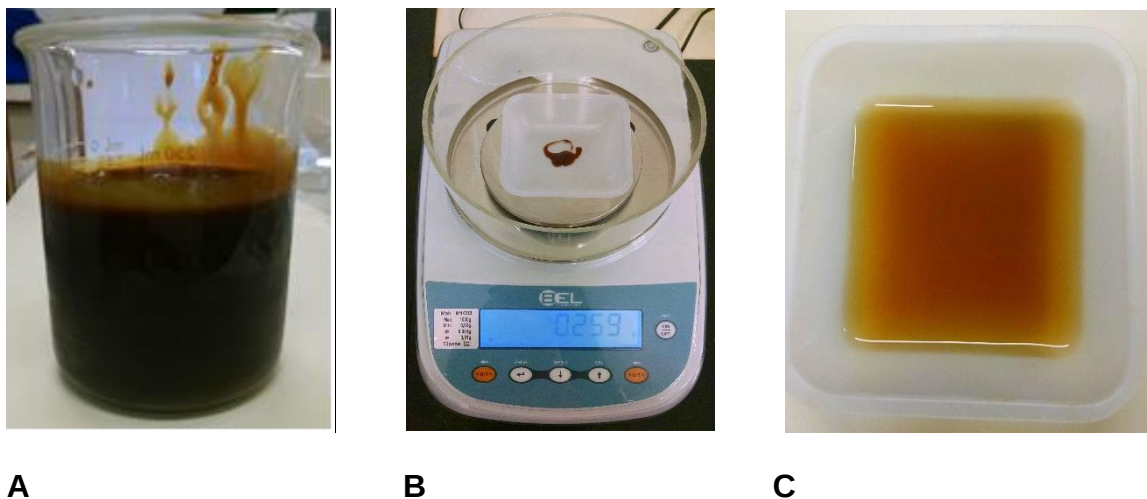


Figura 4. Preparo da solução de melaço utilizado no cultivo sob condições mixotróficas, onde: melaço “in natura” (A), pesagem do melaço (B) e melaço diluído (C).

Após diluído, o melaço foi adicionado nos diferentes tratamentos em 1400 litros de água destilada e autoclavados a 120°C durante 20 minutos (Figura 5).

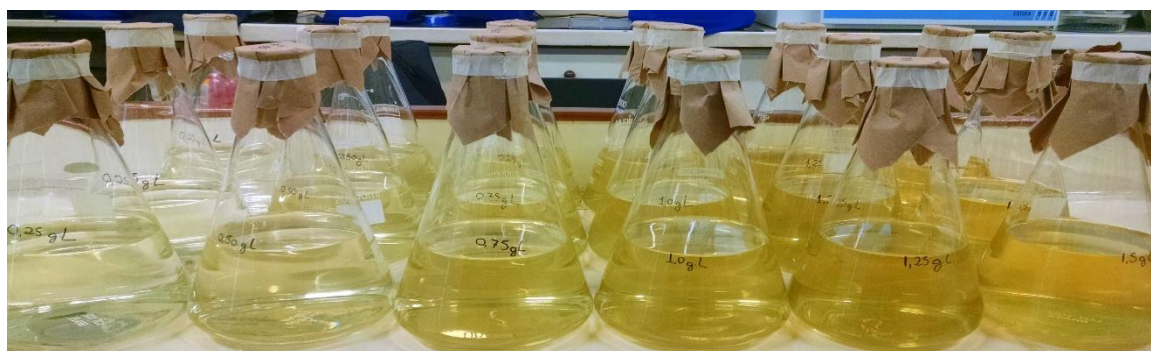


Figura 5. Meios contendo a solução de melaço diluída nas diferentes proporções.

REFERÊNCIAS

- Adesanya VO, Davey MP, Scott SA, Smith AG (2014) Kinetic modelling of growth and storage molecule production in microalgae under mixotrophic and autotrophic conditions. *Bioresource Technology* 157:293-304
- Aflalo C, Meshulam Y, Zarka A, Boussiba S (2007) On the relative efficiency of two- vs. one-stage production of astaxanthin by the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol Bioeng* 98:300–305
- Antelo FS, Costa JAV, Kalil SJ (2008) Thermal degradation kinetics of the phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochemical Engineering Journal* 41:43- 47
- Becker W (2004) Microalgae for aquaculture – The nutritional value of microalgae for aquaculture. In: RICHMOND, A. (Ed.) *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Publishing, p. 380 – 391
- Bhatnagar A, Chinnasamy S, Singh M, Das KC (2011) Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy* 88:3425-3431
- Boussiba S (2000) Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiol Plant* 108:111–117
- Brennan L e Owende P (2010) Biofuels from microalgae – A review of a technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:557-577
- Campaña-Torres A, Martínez-Córdova LR, Martínez-Porchas M, López-Elías JA, Porchas-Cornejo MA (2012) Productive response of *Nannochloropsis oculata*, cultured in different media and their efficiency as food for the rotifer *Brachionus rotundiformis*. *International Journal of Experimental Botany* 81:45-50
- Cerón-García MC, Fernández-Sevilla JM, Acien-Fernández FG, Molina-Grima E, García-Camacho F (2000) Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: Growth rate and fatty acid profile. *Journal of Applied Phycology* 12:239-248
- Cheirsilp B e Torpee S (2012) Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology* 110:510-516
- Chen M, Tang H, Ma H, Holland TC, Ng KYS, Salley SO (2011) Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology* 102:1649–1655
- Chien YH e Shiau WC (2005) The effects of dietary supplementation of algae and synthetic astaxanthin on body astaxanthin, survival, growth, and low dissolved oxygen stress resistance of kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus* Bate. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 318:201–211
- Chisti Y (2004) Microalgae: our marine forests. Book reviews. RICHMOND, A. (Ed.) *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science, 566 p.
- Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25:294-306
- Cifuentes AS, González MA, Vargas S, Hoeneisen M, González N (2003) Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus*

- pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biological Research* 36:343-357
- Cuzon G, Lawrence A, Gaxiola G, Rosas C, Guillaume J (2004) Nutrition of *Litopenaeus vannamei* reared in tanks or in ponds. *Aquaculture* 235:513-551
- Del Campo JÁ, Rodriguez H, Moreno J, Vargas MA, Rivas J, Guerrero MG (2004) Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *Appl. Microbiol. Biotechnol* 64:848-854
- Demirbas A e Demirbas MF (2010) Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Conversion and Management* 52:163-170
- Fábregas J, Dominguez A, Regueiro M, Maseda A, Otero A (2000) Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 53:530–535
- Gim GH, Kim JK, Kim HS, Kathiravan MN, Yang H, Jeong SH, Kim SW (2014) Comparison of biomass production and total lipid content of freshwater green microalgae cultivated under various culture conditions. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 37:99-106
- Girard JM, Roy ML, Hafsa MB, Gagnon J, Faucheux N, Heitz M, Tremblay R, Deschênes JS (2014) Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedesmus obliquus* on cheese whey permeate for biodiesel production. *Algal Research* 5:241-248
- Göksan T, Ak İ, Kiliç C (2011) Growth characteristics of the alga *Haematococcus pluvialis* Flotow as affected by nitrogen source, vitamin, light and aeration. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 11:377-383
- Hoek VD, Mann DG, Jahns HM (1995) *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 623 p.
- Holtin K, Kuehnle M, Rehbein J, Schuler P, Nicholson G, Albert K (2009). Determination of astaxanthin and astaxanthin esters in the microalgae *Haematococcus pluvialis* by LC-(APCI) MS and characterization of predominant carotenoid isomers by NMR spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* 395:1613– 1622
- Huang G, Chen F, Wei D, Zhang X, Chen G (2010) Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy* 87:38-46
- Illman AM, Scragg AH, Shales SW (2000) Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology* 27:631-635
- Imamoglu E, Sukan FV, Dalay MC (2007) Effect of different culture media and light intensities on growth of *Haematococcus pluvialis*, *International Journal of Natural and Engineering Sciences* 3:5-9
- Imamoglu E, Dalay MC, Sukan FV (2009) Influences of different stress media and high light intensities on accumulation of astaxanthin in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *New Biotechnol* 26:199-204
- Janssen M, Slenders P, Winter M, Tramper LRM, Wijffels RH (2001) Photosynthetic efficiency of *Dunaliella tertiolecta* under short light/dark cycles. *Enzyme and Microbial Technology* 29:298-305
- Ju ZY, Forster I, Dominy W (2009) Effects of supplementing two species of marine algae or their fractions to a formulated diet on growth, survival and composition of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 292:237–243

- Junying Z, Junfeng R, Baoning Z (2013) Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel. *Chinese Journal of Catalysis* 34:80–100
- Kaewpintong K, Shotipruk A, Powtongsook S, Pavasant P (2007) Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. *Bioresource Technology* 98:288-295
- Khondker M, Bhuiyan RA, Yeasmin J, Alam M, Sack RB, Huq A, Colwell RR (2007) New records of phytoplankton for Bangladesh. 2. Cryptophyceae, Xanthophyceae and Synurophyceae. *Bangladesh Journal of Botany* 36:53-59
- Krzemińska I, Pawlik-Skowrońska B, Trzcińska M, Tys J (2014) Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 37:735-741
- Lam MK, Lee KT, Mohamed AR (2012) Current status and challenges on microalgae-based carbon capture. *International Journal of Greenhouse Gas Control* 10:456-469
- Lee RE (2008) *Phycology*. Ed. Cambridge University Press, New York, US, 4th edition, 547 p.
- Lee Y e Shen H (2004) Basic culturing techniques. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied Phycology*, pp. 40-56
- Li J, Zhu D, Niu J, Shen S, Wang G (2011). An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol. Adv* 29: 568–574
- Liang Y (2013) Production liquid transportation fuels from heterotrophic microalgae. *Applied Energy* 104:860–868
- Liang Y, Sarkany N, Cui Y (2009) Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Lett* 31:1043-1049
- Liu J, Sommerfeld M, Hu Q (2013) Screening and characterization of *Isochrysis* strains and optimization of culture conditions for docosahexaenoic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:4785-4798
- Lorenz RT, Cysewski GR (2000) Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin, *Trends Biotechnol.* 18:160–167
- Mata TM, Martins AA, Caetano NS (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:217-232
- Miao X e Wu Q (2004) High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *Journal of Biotechnology* 110:85- 93
- Munoz R e Guieysse B (2006) Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Research* 40:2799–2815
- Oncel SS e Akpolat O (2006) An integrated photobioreactor system for the production of *Spirulina platensis*. *Biotechnology* 5:365–372
- Orosa M, Valero JF, Herrero C, Abalde J (2001) Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N-starvation and high light conditions. *Biotechnol Lett* 23:1079-1085
- Paniangua LM (2003) El Tecnitatl, Concentrado de algas *Spirulina* frente de proteínas comestibles Del pueblo de los Aztecas. México, p. 1-8

- Pérez-Garcia O, Escalante FME, De-Bashan LE, Bashan Y (2011) Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Research* 45:11-36
- Pulz O e Gross W (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology Biotechnology* 65:635-648
- Rashid N, Rehmanb MSU, Sadiqd M, Mahmood T, Hanb J (2014) Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 40:760-778
- Reviers B (2006) *Biologia e Filogenia das Algas*. Artmed, 280 p
- Richmond A (2004) (Ed). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phyecology*. Oxford: Blackwell Science, 566 p.
- Riquelme CE e Avendaño-Herrera RE (2003) Microalgae and bacteria interaction in the aquatic environment and their potential use in aquaculture. *Revista chilena de história natural* 76:725-736
- Rocha MSJ, Garcia JEC, Henriques MHF (2003) Growth aspects of the marine microalga *Nannochloiropsis gadiana*. *Biomolecular Engineering* 20:237-242
- Rossi F, Olguín EJ, Diels L, De Philippis R (2015) Microbial fixation of CO₂ in water bodies and in drylands to combat climate change, soil loss and desertification. *New Biotechnology* 32:109–120
- Sarada R, Bhattacharya S, Ravishankar GA (2002). Optimization of culture conditions for growth of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *World J Microbiol Biotechnol* 18: 517–521
- Schenk PM, Thomas-Hall SR, Stephens E, Marx UC, Mussnug, JH, Posten C, Kruse O, Hankamer B (2008) Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *Bioenergy Research* 1:20-43
- Sheikhzadeh N, Heidariehb M, Pashakia AK, Nofouzi K, Farshbafic MA, Akbarib M (2012) Hilyses®, fermented *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the growth performance and skin non-specific immune parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology* 32:1083–1087
- Shi XM, Zhang XW, Chen F (2000) Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. *Enzyme Microb Technol* 27:312-318.
- Singh J e Gu S (2010) Commercialization potential of microalgae for biofuels production. *Renew. Sustain. Energy Rev* 14:2596-2610
- Sipaúba-Tavares LH e Braga FMS (2007) Feeding activity of *Colossoma macropomum* larvae (tambaqui) in fish pond with water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) fertilizer. *Brazilian Journal of Biology* 67:454-466
- Sipaúba-Tavares LH e Pereira AML (2008) Large scale laboratory cultures of *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) and *Diaphanosoma birgei* Korinek (Cladocera). *Brazilian Journal of Biology* 68:875-883
- Sipaúba-Tavares LH e Rocha O (2001) Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos. Rima, São Carlos, 106 p.
- Sipaúba-Tavares LH, Bachion MA (2002) Population growth and development of two species of cladocera, *Moina micrura* and *Diaphanosoma birgei*, in laboratory. *Brazilian Journal of Biology* 62:701-711

- Sipaúba-Tavares LH, Ibarra LC, Fioresi TB (2009) Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (REISCH) Korsikov (Chlorophyceae) em laboratório utilizando meio CHU₁₂ e de macrófita com NPK. Boletim do Instituto de Pesca 35:111-118
- Sipaúba-Tavares LH, Millan RN, Berchielli-Morais FA, Braga FMS (2011) Use of alternative media and different types of recipients in a laboratory culture of *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korsikov (Chlorophyceae). Acta Scientiarum Biological Sciences 33:427-253
- Sipaúba-Tavares LH, Pelicioni LC, Olivera A (1999) Use of inorganic (NPK) and the CHU₁₂ medium for cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) in laboratory. Brazilian Journal of Ecology 1:10-15
- Spolaore P, Cassan CJ, Duran E, Isambert A (2006) Commercial Applications of Microalgae. Journal of Bioscience and Bioengineering 101:87- 96
- Su Y, Mennerich A, Urban B (2012) Coupled nutrient removal and biomass production with mixed algal culture: Impact of biotic and abiotic factors. Bioresource Technology 118:469-476
- Teo CL, Atta M, Bukhari A, Taisir M, Yusuf AM, Idris A (2014) Enhancing growth and lipid production of marine microalgae for biodiesel production via the use of different LED wavelengths. Bioresource Technology 162:38-44
- Wang J, Yang H, Wang F (2014) Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: Status and prospects. Applied Biochemistry and Biotechnology 172:3307-3329
- Wang Y, Liu Z, Qin S (2013) Effects of iron on fatty acid and astaxanthin accumulation in mixotrophic *Chromochloris zofingiensis*. Biotechnol Lett 35:351-357
- Xia L, Ge H, Zhou X, Zhang D, Hu C (2013) Photoautotrophic outdoor two-stage cultivation for oleaginous microalgae *Scenedesmus obtusus* XJ-15. Bioresource Technology 144:261-267
- Yeh KL e Chang JS (2012). Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. Bioresource Technology 105:120-127
- Yoo C, Jun SY, Lee JY, Ahn CY, Oh HM (2010) Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. Bioresource Technology 101:71-74
- Zeng X, Danquah MK, Chena XD, Lu Y (2011) Microalgae bioengineering: from CO₂ fixation to biofuel production. Renewable and Sustainable Energy Reviews 15:3252– 3260
- Zhang BY, Geng YH, Li ZK, Hu HJ, Li YG (2009) Production of astaxanthin from *Haematococcus* in open pond by two-stage growth one-step process. Aquaculture 295:275-281
- Zhekisheva M, Zarka A, Khozin-Goldberg I, Cohen Z, Boussiba S (2005) Inhibition of astaxanthin synthesis under high irradiance does not abolish triacylglycerol accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). J Phycol 41:819-826

CAPÍTULO II

FONTES DE MACROMINERAIS DE FERTILIZANTE INORGÂNICO NO CRESCIMENTO DE *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* FLOTOW (CHLOROPHYCEAE)

*Manuscrito formatado nas normas da revista “Journal of Applied Phycology”

RESUMO

O estudo investigou o efeito do uso de fertilizante inorgânico em concentrações de macrominerais no crescimento e variáveis fisiológicas da microalga *Haematococcus pluvialis* em cultivo estático (2 L) em relação ao meio comercial WC. Os resultados demonstraram elevada densidade celular em meio a base de fertilizante inorgânico ($4,6 \times 10^5$ cels mL⁻¹) em relação ao meio comercial WC ($3,2 \times 10^5$ cels mL⁻¹). As concentrações de macrominerais influenciaram nas variáveis fisiológicas e de crescimento, e o balanço de nitrogênio e fósforo favoreceu maior crescimento algal. A composição bioquímica desta espécie apresentou elevados teores de proteína na presença de altas concentrações de nitrogênio ou de fósforo. O consumo destes nutrientes foi influenciado pelo meio de cultura adotado e nos meios a base de fertilizante inorgânico, a produção de aminoácidos totais foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que em meio comercial. O custo de produção do meio à base de fertilizante inorgânico é 65% menor comparado ao meio comercial testado. O cultivo de *H. pluvialis* em meio contendo fertilizante inorgânico é uma alternativa adequada na substituição de meios comerciais apresentando satisfatória composição bioquímica e menor custo de produção.

Palavras-chave: cultivo alternativo, NPK, perfil de aminoácidos, cultivo de microalgas.

ABSTRACT**Macrominerals sources of inorganic fertilizer in the growth of *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae)**

Current analysis investigates the effect of inorganic fertilizers at different macromineral concentrations in the growth and physiological variables of the microalga *Haematococcus pluvialis* under static culture (2 L^{-1}) compared to WC commercial medium. Results showed high cell density in the inorganic fertilizer-based medium ($4.6 \times 10^5\text{ cells mL}^{-1}$) when compared to WC commercial medium ($3.2 \times 10^5\text{ cells mL}^{-1}$). Different macromineral concentrations affected the physiological variables and growth and nitrogen and phosphorus balanced higher algae growth. The biochemical composition of the species revealed high protein levels with high nitrogen and phosphorus concentrations. Intake of nutrients was affected by the culture medium used. The production of total amino acids in inorganic fertilization-based media was significantly higher ($p < 0.05$) than that in the commercial medium. Production costs of inorganic fertilization-based medium was 65% lower when compared with the commercial medium tested. The culture of *H. pluvialis* in a medium with inorganic fertilization is an adequate alternative to replace commercial media due to satisfactory biochemical compositions and lower production costs.

Keywords: alternative culture, NPK, profile of amino acids, culture of microalgae.

INTRODUÇÃO

Os nutrientes possuem grande importância no crescimento e desenvolvimento das microalgas. O fornecimento de uma única fonte nutricional afeta a adaptação fisiológica e a composição bioquímica das microalgas (Liu et al. 2013). As microalgas podem assimilar diversas fontes de nutrientes, no entanto a taxa de absorção depende das condições de cultivo (Perez-Garcia et al. 2011). O fósforo e o nitrogênio são os principais elementos que limitam a produção primária nas algas (Villar-Argaiz e Sterner 2002), e quando cultivadas em diversas relações desses elementos, o crescimento algal depende das exigências fisiológicas para cada nutriente e varia entre as espécies (Lagus et al. 2004). Além do nitrogênio e fósforo outros micronutrientes são fundamentais para o crescimento das microalgas, tais como cálcio, magnésio, ferro, enxofre e elementos traços (Junying et al. 2013).

Os custos operacionais no cultivo de microalgas são representados em grande parte pelos nutrientes utilizados no preparo dos meios de cultura. A escolha do meio de cultura a ser adotado para o crescimento das microalgas depende das exigências nutricionais das algas, qualidade do produto e custo de produção (Borowitzka 2005), uma vez que, suprir as exigências nutricionais contribui para o crescimento eficiente promovendo alta produção de biomassa (Alkhamis e Qin 2015). Uma solução para reduzir o custo e tempo de cultivo é o uso de fontes alternativas de nutrientes na composição dos meios de cultura, tais como: sulfato de amônia (Rodrigues et al. 2010), uréia (Matsudo et al. 2009), esterco suíno (Olguín et al. 2003), plantas aquáticas (Sipaúba-Tavares et al. 2009), entre outros.

Alguns estudos têm enfatizado sobre a relação de N:P em meio comercial F/2 (Rasdi e Qin 2015) e o uso de fertilizantes agrícolas no cultivo de microalgas

(Dalay et al. 2007), porém poucas pesquisas são específicas no efeito de fontes alternativas de nitrogênio e fósforo em relações de concentração no desenvolvimento e composição bioquímica (especialmente perfil de aminoácidos) da microalga *Haematococcus pluvialis*. O conteúdo de aminoácidos na biomassa algal também depende de diversos fatores, como espécie de alga, condições ambientais e principalmente de cultivo (Masojídek e Prášil 2010).

Haematococcus pluvialis Flotow é uma microalga verde unicelular comumente usada em aplicações comerciais para produzir astaxantina, importante fonte nutricional para a aquicultura (Pan e Chien 2009) e consumo humano (Guerin et al. 2003). Atualmente as microalgas são cultivadas como fonte convencional de nutrição em função dos elevados teores de aminoácidos e proteínas, sendo aplicada na indústria de fármacos, cosméticos, biocombustíveis e aquicultura (Pulz e Gross 2004, Harun et al. 2010).

Dentre os constituintes dos meios de cultura para o crescimento de *Haematococcus pluvialis*, o nitrogênio e fósforo são importantes, e em altas concentrações, induzem a maior produção de células vegetativas e maior acúmulo de biomassa (Cifuentes et al. 2003). A limitação destes dois elementos desacelera as taxas de crescimento e induz as células a acúmulos de compostos, como ácidos graxos e astaxantina (Zhekisheva et al. 2002). O potássio é um macronutriente necessário para as atividades metabólicas relacionadas ao crescimento (Sivakumar e Arunkumar 2009).

Para o cultivo economicamente viável de microalgas, a produção a baixo custo com elevada biomassa e valor nutricional é uma ferramenta a ser adotada em virtude do custo dos meios comerciais, visando diminuir a dependência dos mesmos e aumentar a rentabilidade operacional. Assim, o objetivo deste estudo foi

investigar os efeitos do uso de fertilizante inorgânico em diferentes concentrações de macrominerais como principal constituinte do meio de cultura para cultivo da microalga *Haematococcus pluvialis* em relação ao meio comercial WC, através da avaliação das variáveis de crescimento, composição bioquímica e perfil de aminoácidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepa da microalga e condições de cultivo

A cepa da microalga *Haematococcus pluvialis* (CMEA 227 C1) foi obtida do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Brasil) e cultivada em meio comercial WC (Guillard e Lorenzen 1972), mantida sob condições controladas de intensidade de luz ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$).

Dois meios de cultura foram utilizados para o crescimento de *Haematococcus pluvialis*, o meio comercial WC e outro a base de fertilizante inorgânico composto por nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) nas relações 20:5:20, 12:6:12, 10:10:10 e 4:14:8 adaptado de Sipaúba-Tavares et al. (1999). Para o preparo dos meios a base de fertilizante inorgânico, cerca de 50 g L^{-1} foram dissolvidos em água destilada e esterilizados em autoclave a 1atm durante 30 minutos. Em todos os meios de cultura utilizados, vitamina do complexo B foi adicionada em todos meios na quantidade de $0,02 \text{ g L}^{-1}$ (7 mg - B1; 7 mg - B2; 5 mg - B6; 33 μg - B12) mais vitamina H (0,1 mg) (Sipaúba-Tavares et al 1999). A composição do meio à base de fertilizante inorgânico NPK é mostrada na Tabela 1.

Todos os experimentos foram realizados em frascos com volume de 2 L, mantidos em temperatura de 22°C, aeração constante e iluminação contínua, fornecida a uma intensidade média de $30 \text{ umol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ por lâmpadas brancas fluorescentes. Apenas células verdes a partir da fase de crescimento exponencial foram utilizadas como inóculo em todos os experimentos.

Crescimento algal nos diferentes meios de cultura

As culturas foram pré-cultivadas em frascos de 250 mL, com densidade algal de $0,40 \times 10^5 \text{ cels mL}^{-1}$ em meio comercial WC. Quando as culturas atingiram a fase exponencial de crescimento (7-dias), cerca de 200 mL a uma densidade de $0,2 \times 10^5 \text{ cels mL}^{-1}$ foram transferidas para frascos com volume de 2 litros. Após 7-dias (fase exponencial de crescimento), 20% (v/v) das culturas algais foram inoculadas em frascos esterilizados com capacidade para 2 litros, contendo 1,4 L do meio comercial WC e 1,4 L de água destilada nas diferentes relações de N, P e K do fertilizante inorgânico na proporção de 3% (v/v). As amostras do crescimento algal, variáveis fisiológicas e bioquímicas foram analisadas semanalmente (1, 7, 14, 21 e 28 dias) e o perfil de aminoácidos, avaliado ao final do experimento (28 dias).

O crescimento celular foi monitorado durante o período de 28 dias. Alíquotas de 1 mL^{-1} em triplicata foram removidas diariamente das culturas algais e um mínimo de $2 \times 1 \text{ } \mu\text{L}^{-1}$ de sub-amostra foi utilizada para a quantificação de células com o auxílio de câmara de Neubauer. Taxa de crescimento (k) foi calculada através da fórmula: $k = (3,322/t_2-t_1 \times \log N_2/N_1)$ (t = tempo; N = número de células; números subscritos indicam valores em diferentes tempos) (Guillard 1973). Tempo de duplicação (tempo de divisão celular) foi calculado a partir dos resultados obtidos da taxa de crescimento através da fórmula: $T_d = 1/k$ (T_d = tempo de duplicação, $1/k$ = divisões por dia) (Guillard 1973). Peso seco foi determinado em triplicata

após filtrar 10 mL de amostra da cultura em filtros previamente pesados (Whatman GF/C), os filtros contendo a biomassa foram secos a uma temperatura de 60°C segundo metodologia proposta por Vollenweider (1974). Para avaliação do comprimento total, 50 células foram medidas em microscópio de luz Leica DFC 295 analisando as imagens em sistema Las Core (LAS V3.8), com um objetiva micrométrica resultante em 400x. O volume celular foi obtido através do cálculo do tamanho médio das células, utilizando a forma geométrica mais correspondente (forma de esfera) (Hillebrand et al. 1999). Carbono orgânico total (TOC) foi calculado através da fórmula $C = 0,1204.V^{1.051}$ (C = conteúdo de carbono em pg cel⁻¹; V = volume celular) por meio de regressão de acordo com Rocha e Duncan (1985). A clorofila-a foi determinada por análise colorimétrica utilizando espectrofotômetro (Femto 700 plus), após extração em etanol a 90% (Nusch 1980).

As variáveis físicas dos meios de cultura foram mensurados semanalmente. O oxigênio dissolvido, pH e condutividade foram avaliados com auxílio de sonda multiparâmetros YSI 556 MPS. As concentrações de amônia (NH₃) foram determinadas espectrofotometricamente de acordo com Koroleff (1976) e fósforo total, nitrato (NO₃⁻) e nitrito (NO₂⁻) foram determinados como descrito por Golterman et al. (1978).

Análise bioquímica e perfil de aminoácido

Para avaliação dos teores de proteína e lipídeos, a biomassa das microalgas foi colhida semanalmente, centrifugada e liofilizada para posterior análise (A.O.A.C 1990). O perfil de aminoácidos foi determinado por meio de hidrólise ácida e cromatografia de troca iônica por cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC), para aminoácidos totais foi utilizado coluna LUNA C18 100Å 5u (250x4,6mm) 00G-

4252-EQ e para as determinações de aminoácidos livres coluna Luna 3u C18(2) 100A (250x4,6mm) 00G-4251-E0 de acordo com modificações na metodologia proposta por White et al. (1986).

Análise de custo dos meios de cultura

Os custos de produção dos meios de cultura foram obtidos através dos preços dos fertilizantes inorgânicos, vitamina do complexo B e reagentes analíticos utilizados para produzir o meio comercial WC. O custo foi avaliado para a produção de 50 litros de meio de cultura.

Análise estatística

Os dados deste estudo foram expressos como médias $\pm$ desvio padrão, e os resultados avaliados em triplicata. ANOVA One-way foi aplicada para simples verificação entre as médias das variáveis dos meios de cultura e para comparar diferenças entre a produção máxima de células (Fowler et al., 1998). Na ocorrência de diferenças entre os resultados obtidos foi aplicado o teste de Tukey ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa Statistica 10.0 (StatSoft Inc.).

RESULTADOS

De acordo com os resultados de crescimento celular (Figura 1), durante a fase inicial de cultivo (4 ao 12º dia) a maior densidade de *Haematococcus pluvialis* foi obtida no meio comercial WC, variando de $1,3$ a $3,2 \times 10^5$ cels mL⁻¹, a partir do 12º dia de cultivo foi observado maior densidade no meio à base de fertilizante inorgânico NPK 10:10:10, com máxima densidade de $4,6 \times 10^5$ cels mL⁻¹ e a menor

densidade no meio NPK 4:14:8, com $1,7 \times 10^5$ cels mL⁻¹. Diferenças significativas ocorreram entre os meios de cultura ($p < 0,01$), nos meios alternativos NPK 20:5:20 e 12:6:12 o crescimento foi similar ao meio comercial WC, sendo superior no NPK 10:10:10, exceto para NPK 4:14:8 que apresentou drástica redução na densidade celular a partir do 19º dia ocasionando a morte celular (Figura 1).

Os valores máximos de densidade celular foram obtidos em diferentes tempos para cada meio de cultura estudado, variando entre o 13º e 28º dia de cultivo, sendo maior no 20º dia ($4,6 \times 10^5$ cels mL⁻¹) para o meio NPK 10:10:10. Os meios NPK 4:14:8 e o meio comercial WC foram os que apresentaram densidades máximas em menor tempo de cultivo no 13º e 16º dia de cultivo respectivamente, no entanto, em meio a base de fertilizante inorgânico a densidade foi significativamente inferior ($p < 0,05$) ao meio comercial. Os meios NPK 12:6:12 e 20:5:20 apresentaram máxima densidade celular após período maior de cultivo 27º e 28º dia, com $3,1$ e $3,3 \times 10^5$ cels mL⁻¹, respectivamente, porém deve-se destacar que no meio NPK 20:5:20 o crescimento celular foi crescente o qual não ocorreu com os outros meios (Figura 1).

A relação N:P apresentou influência direta sob o crescimento de *Haematococcus pluvialis*, quando a relação $N > P$ (NPK 20:5:20) foi observado elevado crescimento, quando a relação de P foi 50% de N (NPK 12:6:12) ocorreu um ligeiro aumento no crescimento e na relação $N < P$ (NPK 4:14:8) foi observada redução significativa ($p < 0,01$) do crescimento. Já o balanço da relação N:P (NPK 10:10:10) favoreceu o crescimento da microalga *H. pluvialis* ($4,6 \times 10^5$ cels mL⁻¹) quando comparado aos outros meios que variaram entre $1,7$ a $3,3 \times 10^5$ cels mL⁻¹.

Nos meios utilizados a média do comprimento total das células de *H. pluvialis* foi similar variando de $18,1$ a $25,7$ µm. O tempo de duplicação mais curto (4,83 dias)

foi obtido no meio comercial WC, influenciando na maior taxa de crescimento ($k=0,21$) para *H. pluvialis* neste meio. Com exceção do meio NPK 10:10:10 que apresentou tempo de duplicação de (5,51 dias), nos demais meios de cultura foram acima de 9 dias. O tempo de duplicação nos meios NPK foi elevado e a taxa de crescimento foi menor variando de $k=0,08$ a $k=0,11$, exceto para o NPK 10:10:10 ($k=0,18$). Quando as proporções de nutrientes (NPK) foram iguais, foi observado os maiores valores de densidade celular com $4,6 \times 10^5$ cels mL⁻¹ comparado com os outros meios utilizados. O mesmo foi observado para o peso seco, que no meio NPK 10:10:10 foi maior ($p<0,05$) que nos outros meios e similar ao NPK 4:14:8 ($2272,1 \pm 635$ pg cel⁻¹), com o menor valor médio ($1595,2 \pm 297$ pg cel⁻¹) no meio NPK 20:5:20.

O volume celular foi maior no meio NPK 20:5:20 ($p<0,05$) e similar nos demais meios a base de fertilizante inorgânico. O teor de proteína foi mais elevado ($p<0,05$) no meio com fertilizante inorgânico (NPK 20:5:20 e 4:14:8) e os teores de lipídeos nos meios WC e NPK 10-10-10 ($p<0,05$). O teor de clorofila-a foi mais elevado no meio NPK 20:5:20 e menor no meio NPK 4:14:8 ($p<0,05$). Os meios WC, NPK 12:6:12 e 10:10:10 as concentrações médias de clorofila-a foram similares. O carbono orgânico total foi similar nos meios WC e NPK 20:5:20 e menor no meio NPK 12:6:12 ($p<0,05$) (Tabela 2).

Os teores de aminoácidos totais foram mais elevados ($p<0,01$) quando *H. pluvialis* foi cultivada em meios a base de fertilizante inorgânico do que no meio comercial WC. O meio NPK 20:5:20 foram obtidas as maiores concentrações de aminoácidos totais (44,9g 100 g do peso seco) e no meio WC as menores (15,1g 100 g do peso seco) ($p<0,01$). O ácido glutâmico e a leucina foram os que apresentaram maior ($p<0,01$) conteúdo e a cisteína o menor ($p<0,01$) não

ultrapassando 1% da produção total de aminoácidos. Em relação a produção de alanina, arginina e ácido aspártico foram encontrados em concentrações variando entre 0,97 a 3,78 g 100g e, metionina, treonina, tirosina e histidina que são aminoácidos essenciais foram encontradas em quantidades inferiores, máxima de 2,12 g 100g. Os teores de aminoácidos foram elevados quando a relação N:P é de 75% N e 25% P (Tabela 3).

Dentre as variáveis físicas avaliadas no presente estudo, oxigênio dissolvido manteve-se ao redor de 7,4 a 8,7 mg L⁻¹ e o pH variando de 6,3 a 8,5 (p<0,01). A condutividade elétrica foi mais elevada nos meios a base de fertilizante inorgânico atingindo valores médios de 1,950 µS cm⁻¹, já no meio comercial WC estes valores não ultrapassaram 650 µS cm⁻¹ (p<0,01). A temperatura variou entre os meios de cultura mantendo-se em média de 19,5 a 22,2°C (p<0,05).

Os níveis de nitrogênio nas formas de amônia, nitrato e nitrito e o fósforo total apresentaram diferenças significativas (p<0,01) entre os meios de cultura utilizados. As concentrações de amônia foram mais elevadas em meio a base de fertilizante inorgânico NPK 20:5:20 e 12:6:12, variando de 596,5 a 1207,8 µg L⁻¹ e 311,5 a 567,5 µg L⁻¹, respectivamente e reduzidas (p<0,01) no meio WC (0,9-15,6 µg L⁻¹). Nos meios NPK 10:10:10 e 4:14:8 as concentrações média de amônia foram similares, aproximadamente 130 µg L⁻¹ e no meio comercial WC foi de 7 µg L⁻¹ (p<0,01). Nitrito foi encontrado em baixas concentrações em todos os meios de cultura, em média de 4 a 150 µg L⁻¹, com exceção do meio NPK 20:5:20 que variou de 6,8 a 263,8 µg L⁻¹.

O nitrato foi o oposto com as menores concentrações no meio NPK 20:5:20 e as maiores concentrações no NPK 10:10:10 e 4:14:8 variando de 975 a 1111 µg

L^{-1} e 1259,4 a 1274,1 $\mu g L^{-1}$, respectivamente ($p < 0,01$). As concentrações de fósforo nos meios a base de fertilizante inorgânico foram mais elevadas ($p < 0,01$) quando comparada ao meio comercial WC, variando de 1897 a 3216 $\mu g L^{-1}$ e 465 a 1492 $\mu g L^{-1}$, respectivamente (Tabela 4). Os diferentes tipos de fontes de nitrogênio (amônia, nitrato e nitrito) nos meios de cultura utilizados influenciaram o consumo por *Haematococcus pluvialis*, demonstrando que esta espécie consumiu preferencialmente nitrato e fósforo quando cultivada no meio comercial WC, e nos meios a base de fertilizante inorgânico o maior consumo foi de amônia (Figura 2).

Foi obtida uma diferença de quase 65% mais elevada para produção do meio comercial WC quando comparado aos meios a base de fertilizante inorgânico NPK. O custo dos meios de cultura para produção de 50 L^{-1} de microalga cultivada foi de: WC= R\$17,45; NPK 20:5:20= R\$7,35; NPK 12:6:12= R\$6,28; NPK 10:10:10= R\$7,03 e NPK 4:14:8 R\$6,68.

DISCUSSÃO

Neste estudo foi testado o uso de fertilizante inorgânico como fonte alternativa de N, P e K obtendo resultados similares e/ou superiores ao meio comercial WC. Altas densidades celulares foram observadas nos meios a base de fertilizante inorgânico, exceto na relação NPK 4:14:8. O elevado crescimento algal foi devido à disponibilidade de nutrientes e de condições favoráveis de cultivo, como luminosidade, níveis de oxigênio dissolvido e pH moderado. Estudos indicam que o uso de baixa luminosidade para *Haematococcus pluvialis* nas faixas entre 30-60 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$ é fundamental para aumentar a produtividade de biomassa (Zhang et al. 2014). Manter os níveis de oxigênio dissolvido na cultura acima de 4 $mg L^{-1}$ e abaixo de 10 $mg L^{-1}$, também acelera os processos fotossintéticos e *H. pluvialis*

quando cultivada sob condições moderadas de pH, entre 7 e 8 a produção de células vegetativas são maiores (Sarada et al. 2002). Neste estudo os níveis de oxigênio dissolvido (7,4 a 8,7 mg L⁻¹) e pH (6,4 a 8,4) foram similares às condições descritas na literatura.

Em meios comerciais altas densidades foram reportadas para *Haematococcus pluvialis*, como aquelas obtidas por Dominguez-Bocanegra et al. (2004) testando o meio BBM com 3,5 x 10⁵ cels mL⁻¹ e Göksan et al. (2011) com o meio BG-11 e adição de diferentes fontes de nitrogênio, a densidade celular máxima foi de 2,6 x 10⁵ cels mL⁻¹. Neste estudo, no meio comercial WC a densidade celular foi similar aos outros meios comerciais testados (3,2 x 10⁵ cels mL⁻¹), porém no meio de fertilizante inorgânico (NPK 10:10:10) a densidade de 4,6 x 10⁵ cels mL⁻¹ foi mais elevada do que as obtidas pelos autores acima citados. Dalay et al. (2007) estudando a mesma espécie obtiveram maior produção de biomassa (0,90 g L⁻¹) em meio a base de fertilizante inorgânico (NPK 20:5:20).

Diferenças entre taxas de crescimento indicam que, além de nitrogênio e fósforo, outros nutrientes também limitam o crescimento algal (Rocha et al. 2015), como por exemplo os micronutrientes Ca, Mg, B, Cu, Fe e Zn. O nitrogênio e o fósforo são nutrientes importantes para o cultivo das microalgas e em alguns meios de cultura a disponibilidade pode se tornar um fator limitante, como observado no meio NPK 4:14:8 onde a relação N:P foi baixa. Já o potássio, mesmo presente em altos níveis nos meios de cultura, não apresenta influência no desempenho algal (Tocquin et al. 2012).

O estado nutricional das células afeta diretamente o consumo dos nutrientes pelas microalgas. Espécies como *Chlorella* sp., em presença de diferentes fontes de nitrogênio consome primeiramente a amônia. Enquanto que, espécies como

Chlorella protothecoides, *Nitzschia laevis* e *Phaeodactylum tricornutum* preferem o consumo de nitratos ou ureia invés de amônia (Perez-Garcia et al. 2011).

Neste estudo, nos meios a base de fertilizante inorgânico a amônia foi preferencialmente consumida por *Haematococcus pluvialis* ao invés do nitrato. Em meios a base de fertilizante inorgânico a depleção dos níveis de nitrato por *H. pluvialis* é baixa (Tocquin et al. 2012). Isso pode estar relacionado com o baixo gasto energético requerido para assimilação da amônia, que dentre outros tipos de fontes de nitrogênio é energeticamente mais eficiente (Shi et al. 2000; Wilhem et al. 2006).

Em relação ao fósforo, Tocquin et al. (2012) observaram melhor desempenho da microalga *H. pluvialis* nos meios que continham baixa relação N:P, indicando que altos níveis de fósforo podem ser benéficos para o crescimento algal. No entanto, quando a concentração de fósforo se torna mais elevada que 50% dos níveis de nitrogênio, ocorre uma redução no crescimento (Ashraf et al. 2011). Este padrão foi observado neste estudo no meio de cultura NPK 4:14:8.

Haematococcus pluvialis, quando cultivada sob baixa luminosidade e disponibilidade de nutrientes como nitrogênio e fósforo, comumente apresenta maior produção de proteína ao invés de lipídeos, uma vez que o acúmulo de lipídios por esta espécie está relacionado a condições de estresse, como alta luminosidade e baixos níveis de nitrogênio (Damiani et al. 2010). Em geral, o nitrogênio e fósforo tem efeito positivo sobre o crescimento algal, mas efeito negativo no acúmulo de lipídios (Ganuza et al. 2008). Neste estudo o efeito da luminosidade no acúmulo de lipídios foi mais efetivo do que as concentrações de nitrogênio, visto que o meio NPK 10:10:10 os teores de lipídios foram similares ao meio comercial WC enquanto no meio NPK 4:14:8 apresentou os menores teores.

A alta disponibilidade de nitrogênio também influencia maior produção de clorofila-a nas células algais, uma vez que o nitrogênio está presente em grandes quantidades nessa molécula (Rangel-Yagui et al. 2004) e o fósforo não só afeta a produção de clorofila-a, como também, altos níveis diminuem a síntese deste composto (Celekli et al. 2009). De acordo com os resultados observados neste estudo, a relação NPK 20:5:20 apresenta as maiores concentrações de clorofila-a, enquanto na relação 12:6:12 as concentrações de clorofila-a foram similares aos demais meios.

O conteúdo de aminoácidos das microalgas está diretamente relacionado com as condições de cultivo e composição química do meio de cultura. A elevada produção de ácido glutâmico e leucina e baixa produção de cisteína dentre os aminoácidos é um padrão comum na maioria das microalgas (Brown 1991). O mesmo foi observado neste estudo em relação ao ácido glutâmico e leucina, que apresentaram proporções elevadas quando comparados aos outros aminoácidos.

Espécies de microalgas Chlorophyceae são reportadas como excelentes fontes produtoras de aminoácidos, *Dunaliella* sp. e *Scenedesmus* sp. obtiveram níveis de aminoácidos totais de 34,1 e 30,9 g 100g peso seco, respectivamente (Kent et al. 2015). Kim et al. (2015) analisando o perfil de aminoácidos de *Haematococcus* sp. em meio comercial BG-11 observaram que o conteúdo de aminoácidos totais ao redor de 10 g 100g por peso seco, sendo este resultado similar ao observado neste estudo em meio comercial WC, porém não observou arginina, cisteína, metionina e prolina. Já comparando estes resultados aos obtidos neste estudo, no meio à base de fertilizante inorgânico a produção de aminoácidos totais foi superior ($22,44 \pm 0,1$ a $44,91 \pm 0,5$ g 100g por peso seco).

A disponibilidade e maior assimilação de amônia nos meios alternativos podem ter influenciado diretamente nestes resultados. No perfil de aminoácidos de *H. pluvialis* em meio WC e de fertilizante inorgânico, foi encontrado cisteína, arginina, metionina e prolina com maiores teores no meio NPK 20:5:20 e os menores no meio comercial WC, sendo cisteína com a mais baixa concentração, evidenciando a importância dos meios de cultura a base de fertilizante inorgânico no cultivo de *H. pluvialis*. O uso de fertilizante inorgânico apresenta baixo custo, cerca de 65% mais barato que o meio comercial WC.

CONCLUSÃO

O meio a base de fertilizante inorgânico NPK 10:10:10 é o mais indicado para obtenção de maior densidade celular de *Haematococcus pluvialis*. Esta microalga pode apresentar preferências no consumo dos nutrientes em relação ao meio de cultura e a composição do meio que também influencia diretamente na composição bioquímica desta espécie. O teor de proteína e o perfil de aminoácidos foram maiores quando cultivada em meios a base de fertilizante inorgânico. O uso de fertilizante inorgânico é uma ferramenta que pode melhorar o desenvolvimento algal em relação ao meio comercial WC, diminuindo o custo no cultivo de microalgas, aumentando a produtividade tanto de biomassa, quanto de compostos de alto valor comercial. Os resultados deste estudo evidenciaram que o uso de fertilizante inorgânico, principalmente nas proporções 20:5:20 e 10:10:10 proporcionaram elevado valor nutricional a baixo custo para cultivo de *Haematococcus pluvialis*.

REFERÊNCIAS

- Alkhamis Y, Qin JG (2015) Comparison of N and P requirements of *Isochrysis galbana* under phototrophic and mixotrophic conditions. *J Appl Phycol* 27:2231–2238
- A.O.A.C. (1990) Association of official analytical chemists. Official methods of analysis. 15TH. ED., Washington D. C.
- Ashraf M, Javaid M, Rashid T, Ayub M, Zafar A, Ali S, Naeem M (2011) Replacement of expensive pure nutritive media with low cost comercial fertilizer for mass culture of freshwater algae, *Chlorella vulgaris*. *International Journal of Agriculture & Biology* 13: 484-490
- Borowitzka MA (2005) Culturing microalgae in outdoor ponds. In: Anderson RA (ed) *Algal culturing techniques*, 1st edn. Elsevier, Burlington, pp 205–219
- Brown MR (1991) The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *J Exp Mar Biol Ecol* 145: 79–99
- Çelekli A, Yavuzatmaca M, Bozkurt H (2009) Modeling of biomass production by *Spirulina platensis* as function of phosphate concentrations and pH regimes. *Bioresour Technol* 100:3625–3629
- Cifuentes AS, González MA, Vargas S, Hoeneisen M, González N (2003) Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biological Research* 36: 343-357
- Dalay MC, Imamoglu E, Demirel Z (2007) Agricultural fertilizers as economical alternative for cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17:393–397
- Damiani MC, Popovich CA, Constenla D, Leonardi PI (2010) Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. *Bioresource Technology* 101:3801–3807
- Dominguez-Bocanegra AR, Ponce-Noyola T, Torres-Munoz JA (2007) Astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma* and *Haematococcus pluvialis*: a comparative study. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75:783-791
- Fowler J, Cohen L, Jawis P (1998) *Practical statistics for field biology*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons. 259 p
- Ganuza E, Anderson AJ, Ratledge C (2008) High-cell-density cultivation of *Schizochytrium* sp. in an ammonium/pH- auxostat fed-batch system. *Biotechnol Lett* 30: 1559 -1564
- Golterman HL, Clymo RS, Ohnstad MAM (1978) *Methods for physical and chemical analysis of fresh water*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publication. 213 p. IBP Handbook, no. 8
- Göksan T, Ak İ, Kiliç C (2011) Growth characteristics of the alga *Haematococcus pluvialis* Flotow as affected by nitrogen source, vitamin, light and aeration. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 11:377-383
- Guerin M, Huntley ME, Olaizola M (2003) *Haematococcus* astaxanthin: applications for human health and nutrition. *Trends Biotechnol* 21:210–216

- Guillard RRL, Lorenzen CJ (1972) Yellow-green algae with chlorophyllide. *Journal of Phycology* 8:10-14
- Guillard RRL (1973) Division rates. In Stein JR. *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements*. London: Cambridge University Press. p. 289-311
- Harun R, Singh M, Forde GM, Danquah MK (2010) Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renew Sust Energ Rev* 14:1037-47
- Hillebrand H, Dürselen CD, Kirschtel D, Pollinger U, Zohary T (1999) Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology* 35: 403-424
- Junying Z, Junfeng R, Baoning Z (2013) Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel. *Chinese Journal of Catalysis* 34:80–100
- Kent M, Welladsen HM, Mangott A, Li Y (2015) Nutritional evaluation of australian microalgae as potential human health supplements. *PLoS ONE* 10(2): e0118985. doi:10.1371/journal.pone.0118985
- Kim JH, Affan MA, Jang J, Kang MH, Ko AR, Jeon SM, Oh C, Heo SJ, Lee YH, Ju SJ, Kang DH (2015) Morphological, Molecular, and Biochemical Characterization of Astaxanthin-Producing Green Microalga *Haematococcus* sp. KORDI03 (Haematococcaceae, Chlorophyta) Isolated from Korea. *J Microbiol Biotechnol* 25:238–246
- Koroleff F (1976) Determination of ammonia. In Grashoff E, Kremling E (eds.) *Methods of seawater analysis*. German: Verlag Chemie Weinheim. p. 126-133
- Lagus A, Suomela J, Weithoff G, Heikkilä K, Helminen H, Sipura J (2004) Species-specific differences in phytoplankton responses to N and P enrichments and the N:P ratio in the Archipelago Sea, northern Baltic Sea. *J Plankton Res* 26:779–798
- Liu Y, Song X, Cao X, Yu Z (2013) Responses of photosynthetic characters of *Skeletonema costatum* to different nutrient conditions. *J Plankton Res* 35:165–176
- Masojídek J, Prášil O (2010). The development of microalgal biotechnology in the Czech Republic. *J Ind Microbiol Biotechnol* 37:1307-1317.
- Matsudo MC, Bezerra RP, Sato S, Perego P, Converti A, Carvalho JCM (2009) Repeated fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* using urea as nitrogen source. *Biochem Eng J* 43:52–57
- Nusch EA (1980) Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. *Archives für Hydrobiologie* 14:4-36
- Olguín EJ, Galicia S, Mercado G, Pérez T (2003) Annual productivity of *Spirulina (Arthrospira)* and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. *J Appl Phycol* 15:249–257
- Pan, CH, Chien YH (2009) Effects of dietary supplementation of alga *Haematococcus pluvialis* (Flotow), synthetic astaxanthin and β -carotene on survival, growth, and pigment distribution of red devil, *Cichlasoma citrinellum* (Günther). *Aquaculture Research* 40:871–879
- Perez-Garcia O, Escalante FME, De-Bashan LE, Bashan Y (2011) Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Research* 45:11-36

- Pulz O, Gross W (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 65:635–648
- Rangel-Yagui CO, Danesi EDG, de Carvalho JCM et al. (2004) Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. *Bioresour Technol* 92:133–141
- Rasdi NW, Quin JG (2015) Effect of N:P ratio on growth and chemical composition of *Nannochloropsis oculata* and *Tisochrysis lutea*. *J Appl Phycol* 27:2221–2230
- Rocha O, Duncan A (1985) The relationship between cell carbon and cell volume in freshwater algae species used in zooplankton studies. *Journal of Plankton Research* 7:279-294
- Rocha GS, Pinto FHV, Melão MGG, Lombardi AT (2015) Growing *Scenedesmus quadricauda* in used culture media: is it viable? *J Appl Phycol* 27:171-178
- Rodrigues MS, Ferreira LS, Converti A, Sato S, Carvalho JC (2010) Fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. *Bioresour Technol* 101:4491–4498
- Sarada R, Bhattacharya S, Ravishankar GA (2002). Optimization of culture conditions for growth of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *World J Microbiol Biotechnol* 18: 517–521
- Shi XM, Zhang XW, Chen F (2000) Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. *Enzyme and Microbial Technology* 27:312-318
- Sivakumar SR, Arunkumar K (2009) Sodium, Potassium and sulphate composition in some seaweeds occurring along the coast of gulf of Mannar, India. *Asian Journal of Plant Sciences* 8:500-504
- Sipaúba-Tavares LH, Pelicioni LC, Olivera A (1999) Use of inorganic (NPK) and the CHU₁₂ medium for cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) in laboratory. *Brazilian Journal of Ecology* 1:10-15
- Sipaúba-Tavares LH, Ibarra LC, Fioresi TB (2009) Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (REISCH) Korsikov (Chlorophyceae) em laboratório utilizando meio CHU₁₂ e de macrófita com NPK. *Boletim do Instituto de Pesca* 35:111-118
- Tocquin P, Fratomico A, Franck F (2012) Screening for a low-cost *Haematococcus pluvialis* medium reveals an unexpected impact of a low N:P ratio on vegetative growth. *J Appl Phycol* 24:365-373
- Villar-Argaiz M, Sterner RW (2002) Life history bottlenecks in *Diaptomus clavipes* induced by phosphorus-limited algae. *LimnolOceanog* 47:1229–1233
- Vollenweider RA (1974) A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 225 p. IBP, Handbook no. 12
- White JA, Hart RJ, Fry JC (1986) An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. *J Clin Lab Auto* 8:170–177
- Wilhelm C, Büchel C, Fisahn J, Goss R, Jakob T, Laroche J, Lavaud J, Lohr M, Riebesell U, Stehfest K, Valentin K, Kroth PG (2006) The regulation of carbon and nutrient assimilation in diatoms is significantly different from green algae. *Protist* 157:91- 124

- Zhekisheva M, Boussiba S, Khozin-Goldberg I, Zarka A, Cohen Z (2002) Accumulation of oleic acid in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) under nitrogen starvation or high light is correlated with that of astaxanthin esters. *Journal Phycology* 38:325-331
- Zhang W, Wang J, Wang J, Liu T (2014) Attached cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production. *Bioresource Technology* 158:329–335

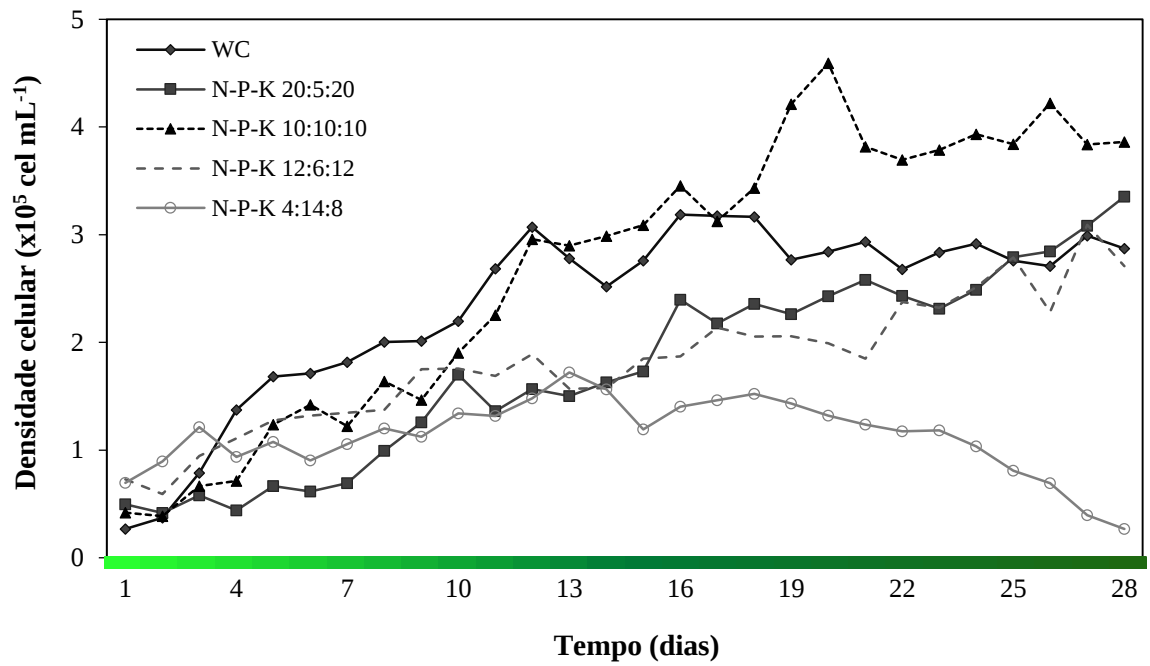


Figura 1. Crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* em diferentes meios de cultura durante o período experimental.

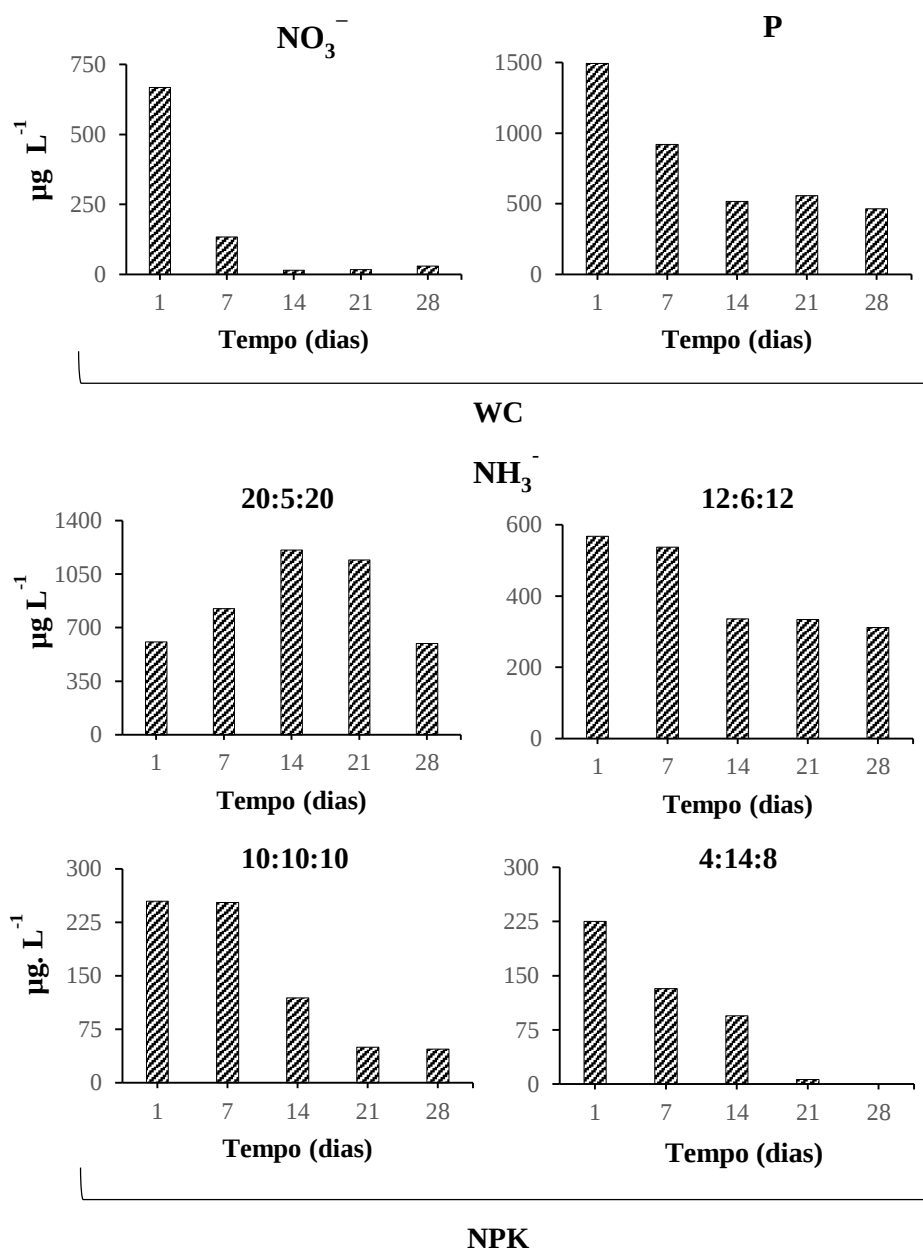


Figura 2. Concentrações de nitrato (NO_3^-) e fósforo total (PT) em meio comercial WC e amônia (NH_3) no meio de cultura a base de fertilizante inorgânico NPK (20:5:20, 12:6:12, 10:10:10 e 4:14:8) durante o período de 28 dias no cultivo de *Haematococcus pluvialis*.

Tabela 1. Composição dos diferentes fertilizantes inorgânicos

NPK	Composição química									
	%			$\mu\text{g L}^{-1}$						
	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	S	Ca	Mg	B	Cu	Fe	Zn
20:5:20	21,3	5,2	19,8	0,05	70,5	4,4	0,06	0,03	0,5	0
12:6:12	12,1	6,2	11,8	0,01	104,4	6,5	0,1	0,06	0,6	0,01
10:10:10	10,5	1,7	10,7	0,01	134,6	8,4	0,2	0,1	0,6	0,02
4:14:8	4,2	14,3	7,9	0,01	334,6	21	0,1	0,06	0,5	0,03

Tabela 2. Variáveis fisiológicas da microalga *Haematococcus pluvialis* em diferentes meios de cultivo.

Variáveis	Comercial	NPK			
	WC	20:5:20	12:6:12	10:10:10	4:14:8
Densidade celular máxima (cel mL ⁻¹)	3,2 x10 ^{5b}	3,3 x10 ^{5b}	3,1 x10 ^{5b}	4,6 x10 ^{5a}	1,7 x10 ^{5c}
Taxa de crescimento (k)	0,21	0,10	0,08	0,18	0,11
Tempo de duplicação (dias)	4,83	9,79	12,48	5,51	9,19
Peso seco (pg cel ⁻¹)	1966±1086 ^b	1597±297 ^b	1720±842 ^b	2798±735 ^a	2272±635 ^a
Comprimento total (µm)	23,7±2 ^a	23,5±2 ^a	20,5±2 ^a	21,7±3 ^a	21,5±1 ^a
Volume celular (µm ³)	7707±1976 ^b	8039±2336 ^a	4994±1196 ^c	6051±2685 ^c	5861±567 ^c
Carbono Orgânico total (pg cel ⁻¹)	1479±400 ^a	1557±481 ^a	936±236 ^c	1148±541 ^b	1108±108 ^b
Proteína (% PS)	36,7±16 ^{ab}	45,5±1 ^a	25,2±3 ^b	31,6±5 ^{ab}	41,3±1 ^{ab}
Lipídeo (% PS)	6,3±3 ^a	3,5±1 ^{ab}	3,1±2 ^{ab}	6±2 ^{ab}	2,1±1 ^{ab}
Clorofila-a (mg L ⁻¹)	728±548 ^b	1061±739 ^a	619±338 ^b	741±545 ^b	475±275 ^c

Todos os valores são médias ± desvio padrão (n=3). Letra minúscula na mesma linha representa diferença significativa entre os meios de cultivo (p<0,05).

Tabela 3. Conteúdo de aminoácidos (g 100g peso seco) da microalga *Haematococcus pluvialis* nos diferentes meios de cultura. Todos os valores são médias $\pm$ desvio padrão (n=2).

Aminoácidos	Comercial	NPK			
	WC	20:5:20	12:6:12	10:10:10	4:14:8
Alanina	1,32 $\pm$ 0,0 ^e	3,73 $\pm$ 0,02 ^a	2,16 $\pm$ 0,0 ^d	2,68 $\pm$ 0,02 ^c	3,27 $\pm$ 0,01 ^b
Arginina	1,09 $\pm$ 0,0 ^e	3,51 $\pm$ 0,04 ^a	2,11 $\pm$ 0,01 ^d	2,86 $\pm$ 0,01 ^c	3,06 $\pm$ 0,07 ^b
Ácido aspártico	1,25 $\pm$ 0,02 ^d	3,78 $\pm$ 0,03 ^a	0,97 $\pm$ 0,02 ^e	1,69 $\pm$ 0,06 ^c	3,36 $\pm$ 0,02 ^b
Cisteína*	0,11 $\pm$ 0,0 ^e	0,41 $\pm$ 0,0 ^a	0,17 $\pm$ 0,0 ^d	0,21 $\pm$ 0,0 ^c	0,36 $\pm$ 0,0 ^b
Ácido glutâmico	1,72 $\pm$ 0,0 ^e	5,2 $\pm$ 0,05 ^a	2,07 $\pm$ 0,0 ^d	3,17 $\pm$ 0,02 ^c	4,37 $\pm$ 0,0 ^b
Glicina	0,95 $\pm$ 0,04 ^e	2,65 $\pm$ 0,08 ^a	1,38 $\pm$ 0,0 ^d	1,83 $\pm$ 0,01 ^c	2,31 $\pm$ 0,02 ^b
Hidroxiprolina	0,45 $\pm$ 0,01 ^{cd}	0,62 $\pm$ 0,0 ^{ab}	0,37 $\pm$ 0,0 ^d	0,54 $\pm$ 0,04 ^{bc}	0,66 $\pm$ 0,02 ^a
Histidina*	0,24 $\pm$ 0,0 ^e	0,76 $\pm$ 0,01 ^a	0,43 $\pm$ 0,01 ^d	0,60 $\pm$ 0,01 ^c	0,66 $\pm$ 0,0 ^b
Isoleucina*	0,61 $\pm$ 0,01 ^e	1,86 $\pm$ 0,01 ^a	0,95 $\pm$ 0,02 ^d	1,39 $\pm$ 0,0 ^c	1,66 $\pm$ 0,01 ^b
Leucina*	1,49 $\pm$ 0,02 ^e	4,47 $\pm$ 0,02 ^a	2,41 $\pm$ 0,04 ^d	3,35 $\pm$ 0,06 ^c	3,90 $\pm$ 0,06 ^b
Lisina*	0,93 $\pm$ 0,02 ^e	2,94 $\pm$ 0,04 ^a	1,39 $\pm$ 0,01 ^d	2,05 $\pm$ 0,04 ^c	2,54 $\pm$ 0,02 ^b
Metionina*	0,23 $\pm$ 0,0 ^e	0,91 $\pm$ 0,01 ^a	0,46 $\pm$ 0,0 ^d	0,58 $\pm$ 0,0 ^c	0,74 $\pm$ 0,0 ^b
Fenilalanina*	0,89 $\pm$ 0,01 ^e	2,59 $\pm$ 0,08 ^a	1,40 $\pm$ 0,02 ^d	2,01 $\pm$ 0,01 ^c	2,27 $\pm$ 0,02 ^b
Prolina	0,85 $\pm$ 0,01 ^e	2,45 $\pm$ 0,02 ^a	1,34 $\pm$ 0,02 ^d	1,83 $\pm$ 0,04 ^c	2,12 $\pm$ 0,01 ^b
Serina	0,82 $\pm$ 0,01 ^e	2,21 $\pm$ 0,03 ^a	1,17 $\pm$ 0,01 ^d	1,53 $\pm$ 0,0 ^c	2,01 $\pm$ 0,01 ^b
Treonina*	0,70 $\pm$ 0,01 ^e	2,12 $\pm$ 0,06 ^a	1,18 $\pm$ 0,0 ^d	1,56 $\pm$ 0,01 ^c	1,91 $\pm$ 0,03 ^b
Tirosina*	0,45 $\pm$ 0,01 ^e	1,69 $\pm$ 0,0 ^a	0,89 $\pm$ 0,01 ^d	1,20 $\pm$ 0,12 ^c	1,40 $\pm$ 0,0 ^b
Valina*	0,97 $\pm$ 0,01 ^e	2,95 $\pm$ 0,03 ^a	1,51 $\pm$ 0,01 ^d	2,14 $\pm$ 0,13 ^c	2,64 $\pm$ 0,0 ^b
Total	15,14 $\pm$ 0,04 ^e	44,91 $\pm$ 0,5 ^a	22,44 $\pm$ 0,1 ^d	31,28 $\pm$ 0,3 ^c	39,32 $\pm$ 0,2 ^b

(*) indica os aminoácidos essenciais

Letras na mesma linha representam diferenças significativas (p<0,05).

Tabela 4. Variáveis dos meios de cultura ao longo do período experimental.

Variáveis	Comercial	NPK			
	WC	20:5:20	12:6:12	10:10:10	4:14:8
Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	8,1±0,6 ^a	8,7±1 ^a	7,5±0,8 ^a	7,8±0,3 ^a	7,4±0,1 ^a
pH	7,7±1 ^{ab}	6,6±1 ^b	8,4±1 ^a	6,7±1 ^{ab}	6,39±1 ^b
Condutividade (μS cm ⁻¹)	616,9±93 ^c	1950,8±325 ^a	1009,3±147 ^b	797,6±159 ^{bc}	943,5±219 ^{bc}
Temperatura (°C)	22,2±1 ^a	19,9±1 ^b	19,5±1 ^b	20,3±1 ^{ab}	22,1±1 ^a
Amônia (μg L ⁻¹)	7,1±6 ^c	875,8±288 ^a	417,1±124 ^{ab}	144,5±103 ^{bc}	114,4±90 ^{bc}
Nitrato (μg L ⁻¹)	172±281 ^b	28,1±27 ^b	62,2±46 ^b	1053,9±55 ^a	1270,1±10 ^a
Nitrito (μg L ⁻¹)	12,9±6 ^b	148,5±92 ^a	41,2±23 ^b	88,7±51 ^{ab}	4,8±2 ^b
Fósforo Total (μg L ⁻¹)	790±431 ^c	2267±161 ^b	2986±60 ^a	2253±358 ^b	3078±111 ^a

Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas (<0,05).

CAPITULO III

COMPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA MICROALGA *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* FLOTOW (CHLOROPHYCEAE) EM CONDIÇÕES FOTOTRÓFICA E MIXOTRÓFICA UTILIZANDO FONTES ALTERNATIVAS DE CULTIVO

*Manuscrito formatado nas normas da revista “Journal of Applied Phycology”

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* em meio comercial WC e a base de fertilizante inorgânico NPK sob condição fototrófica e mixotrófica utilizando melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono orgânico. Os resultados obtidos demonstraram elevada densidade celular da microalga *H. pluvialis* cultivada em condição fototrófica, com $4,6 \times 10^5$ cels mL⁻¹ em meio NPK e $3,2 \times 10^5$ cels mL⁻¹ em meio comercial WC. Em condição mixotrófica os resultados foram opostos à condição fototrófica, a máxima densidade celular ocorreu em meio comercial WC, com $3,6 \times 10^5$ cels mL⁻¹ e em meio NPK a densidade foi de $2,4 \times 10^5$ cels mL⁻¹. Comparando as condições de cultivo, sob cultivo fototrófico a densidade celular de *H. pluvialis* foi cerca de 22% maior do que em condição mixotrófica ($p < 0,01$). A adição de melaço fornece ao meio maiores concentrações de nitrogênio e fósforo. Em cultivo fototrófico ocorreu elevada síntese de proteína e baixo acúmulo de lipídeo, no entanto, a adição de melaço em cultivo mixotrófico reduziu os teores tanto de proteína quanto de lipídios de *H. pluvialis*, porém estimulou a produção de aminoácidos. Neste estudo constatou-se que a microalga *H. pluvialis* apresenta melhor crescimento em condição fototrófica de cultivo, porém também é capaz de desenvolver-se em cultivo mixotrófico, sendo seu crescimento influenciado pelo meio de cultura. O melaço pode ser uma alternativa na substituição de outras fontes de carbono orgânico e para aumentar a produção de determinado composto de interesse.

Palavra-chave: Melaço de cana-de-açúcar, fertilizante inorgânico, aminoácidos

ABSTRACT

Comparison and evaluation of microalga *Haematococcus pluvialis* growth in phototrophic and mixotrophic conditions with alternative culture sources

Current investigation evaluates the growth of the microalga *Haematococcus pluvialis* in WC commercial medium and in NPK inorganic fertilization-based medium under phototrophic and mixotrophic conditions with sugar cane molasses as a source of organic carbon. Results showed high cell density of the microalga *H. pluvialis* cultivated under phototrophic conditions, with 4.6×10^5 cells mL⁻¹ in NPK medium and 3.2×10^5 cells mL⁻¹ in a WC commercial medium. Results under mixotrophic conditions contrasted those under phototrophic conditions. Maximum cell density in WC commercial medium was 3.6×10^5 cells mL⁻¹ and density of 2.4×10^5 cells mL⁻¹ in NPK medium. When culture conditions were compared, cell density of *H. pluvialis* under phototrophic culture was approximately 22% greater than that in mixotrophic conditions ($p < 0.01$). The addition of molasses provides the medium with greater concentrations of nitrogen and phosphorus. Under phototrophic culture, a high protein synthesis and low lipid accumulation were reported, even though the addition of molasses in mixotrophic culture decreased protein and lipid rates in *H. pluvialis*, but triggered the production of amino acids. Current study revealed that microalga *H. pluvialis* had a higher growth in phototrophic culture conditions. It may also develop in a mixotrophic culture and its growth affected by culture. Molasses may be an alternative to replace other organic carbon sources and to increase the production of the compound.

Keywords: sugar cane molasses; inorganic fertilizer; amino acids.

INTRODUÇÃO

As microalgas são consideradas fontes promissoras em diversas áreas, como na produção de antioxidantes naturais, proteínas, ácidos graxos poli-insaturados e como fonte alimentar na aquicultura (Mata et al. 2010). Estes microrganismos desenvolvem-se comumente em regimes fototróficos, podendo em condições controladas de cultivo desenvolver-se sob condições heterotróficas e mixotróficas (Fernandes et al. 2015).

Sob condições de cultivo fototrófico, as células algais absorvem energia através da luminosidade e utilizam CO₂ como fonte de carbono (Perez-Garcia et al. 2011). O cultivo em regime mixotrófico é uma variação do regime heterotrófico, onde CO₂ e carbono orgânico são assimilados simultaneamente e ambos os processos de respiração e fotossíntese são realizados (Lee 2004). Este tipo de cultivo tem sido reportado como uma importante ferramenta para aumentar a produção de algumas espécies de microalgas (Andruleviciute et al. 2014). Recentemente, pesquisas sob as condições de cultivo mixotrófico vem recebendo grande atenção, sendo possível associar fontes de carbono orgânico na ausência ou sob baixa luminosidade, obtendo-se produtividade máxima igual ou até mesmo superior (Wang et al. 2013).

Um dos maiores problemas relacionados a produção em larga escala no cultivo de microalgas, tanto em condições fototróficas quanto mixotróficas, é o alto custo dos meios de cultura, comumente preparados através de soluções compostas por reagentes de grau analítico. No cultivo mixotrófico ainda há a adição de fontes orgânicas de carbono que podem representar 50% dos custos de produção (Chen et al. 2009). Uma alternativa é a utilização de matérias primas de baixo custo que

proporcionem aumento na produção de biomassa algal com alto valor nutricional (Dalay et al. 2007).

O melaço de cana de açúcar é uma matéria prima que apresenta em sua composição alto teor de carbono e baixo custo principalmente nos países produtores desta matéria-prima, como o Brasil. O fertilizante inorgânico NPK também é uma fonte alternativa de baixo custo e contém elevada disponibilidade de elementos como nitrogênio, fósforo, potássio e outros micromineirais considerados essenciais para o desenvolvimento algal (Sipaúba-Tavares et al. 1999).

Haematococcus pluvialis é uma microalga cultivada comercialmente, que sintetiza e acumula grandes quantidades de astaxantina, além de apresentar composição química diversificada (Kamath et al. 2008). Esta espécie é capaz de desenvolver em diversas condições de cultivo, como em regime fototrófico, mixotrófico e heterotrófico (Kobayashi et al. 1992, Hata et al. 2001, Orosa et al. 2005). Alguns estudos avaliaram seu crescimento em condições mixotróficas utilizando fontes de carbono, principalmente o acetato de sódio (Kobayashi et al. 1992, Orosa et al. 2005, González et al. 2009). No entanto, pesquisas voltadas à adição de melaço como fonte alternativa de carbono, determinando níveis ótimos de inclusão e efeitos no crescimento e composição desta microalga ainda não foram descritas.

O objetivo deste estudo foi cultivar a microalga *Haematococcus pluvialis* em meio comercial WC e a base de fertilizante inorgânico NPK sob condição fototrófica e mixotrófica utilizando melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono orgânico, avaliando o desenvolvimento e crescimento desta espécie em resposta às

condições de cultivo, verificando a redução dos custos de produção com uma matéria prima de alto valor nutricional e comercial.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepa da microalga e condições de cultivo

A cepa da microalga *Haematococcus pluvialis* (CMEA 227 C1) foi obtida do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro e cultivada em meio comercial WC (Guillard e Lorenzen 1972), mantida sob condições controladas de intensidade de luz ($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e temperatura ($22 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

Para o cultivo em condições fototróficas, as microalgas foram cultivadas e inoculadas em meio comercial WC e em meio a base de fertilizante inorgânico composto por nitrogênio, fósforo e potássio (NPK) na relação 10:10:10. Esta relação de fertilizante foi escolhida em estudo prévio, onde foi obtido maior densidade celular nesta proporção. Para o preparo dos meios a base de fertilizante inorgânico, cerca de 50 g L^{-1} foram dissolvidos em água destilada e esterilizados em autoclave a 1atm durante 30 minutos.

Para o cultivo em condição mixotrófica foram utilizadas as mesmas condições de cultivo e meios de cultura descritos acima e $0,75 \text{ g L}^{-1}$ de melaço de cana-de-açúcar foi adicionado como fonte alternativa de carbono. Todos os experimentos foram realizados em frascos com volume de 2 L, mantidos sob temperatura de 22°C e aeração constante. Em todos os meios de cultura utilizados, vitamina do complexo B foi adicionada em todos meios na quantidade de $0,02 \text{ g L}^{-1}$ (7 mg - B1; 7 mg - B2; 5 mg - B6; $33 \mu\text{g}$ - B12) mais vitamina H (0,1 mg) (Sipaúba-Tavares et al 1999). Iluminação contínua foi fornecida a uma intensidade média de $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por lâmpadas brancas fluorescente. Apenas células verdes a partir

da fase de crescimento exponencial foram utilizadas como inóculo em todos os experimentos.

Melaço de cana

O melaço de cana utilizado neste estudo, foi obtido através da empresa Melaços Brasileiros LTDA (Brasil). Sua composição baseia-se em 20% (p/p) de água, 8% (p/p) frutose, 7% (p/p) de glicose e íons metálicos tais como cálcio, potássio, sódio, ferro, magnésio, cobre, entre outros. O melaço bruto foi diluído em água destilada e esterilizado em autoclave a 1atm durante 30 minutos. Esta solução foi utilizada posteriormente nos experimentos em condições mixotróficas.

Determinação da concentração de melaço

Para determinar a melhor concentração de melaço de cana de açúcar foram testadas concentrações de 0,25 a 10 g L⁻¹, no entanto, entre 1,5 e 5 g L⁻¹ o crescimento foi inibido e acima desta concentração não houve crescimento celular, sendo selecionadas para este estudo seis concentrações (0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,25 e 1,5 g L⁻¹). As microalgas foram cultivadas em frascos de 2 L em meio comercial WC sob as mesmas condições descritas acima. O crescimento celular em todos os tratamentos foi avaliado em triplicata (n=3) durante 15 dias. Os resultados obtidos estão demonstrados na Figura 1.

Crescimento algal nas diferentes condições de cultivo

As culturas foram pré-cultivadas em frascos de 250 mL, com densidade algal de $0,40 \times 10^5$ cels mL⁻¹ em meio comercial WC. Quando as culturas atingiram a fase exponencial de crescimento (7-dias), cerca de 200 mL a uma densidade de

$0,2 \times 10^5$ cels mL^{-1} foram transferidas para frascos com volume de 2 L. Após 7-dias (fase exponencial de crescimento), 20% (v/v) das culturas algais foram inoculadas em frascos esterilizados com capacidade para 2 L, contendo 1,4 L do meio comercial WC e 1,4 L de água destilada com o fertilizante inorgânico (NPK 10:10:10) na proporção de 3% (v/v). Para os experimentos avaliando as condições mixotróficas foram adicionados a solução de melaço previamente preparada na proporção de 0,75 g L^{-1} . As amostras de crescimento da microalga, parâmetros fisiológicos e bioquímicos foram analisadas semanalmente (1, 7, 14, 21 e 28 dias) durante o período de estudo, exceto o perfil de aminoácidos, que foi avaliado ao final do experimento (28 dias).

O crescimento celular foi monitorado durante o período de 28 dias. Alíquotas de 1 mL^{-1} foram removidas de três treplicas diariamente das culturas algais e um mínimo de $2 \times 1 \mu\text{L}^{-1}$ de sub-amostra foi utilizado para a quantificação de células com o auxílio de câmara de Neubauer. Taxa de crescimento (k) foi calculada através da fórmula: $k = (3,322/t_2 - t_1 \times \log N_2/N_1)$ (t = tempo; N = número de células; números subscritos indicam valores em diferentes tempos) (Guillard 1973). Tempo de duplicação (tempo de divisão celular) foi calculado a partir dos resultados obtidos da taxa de crescimento através da fórmula: $T_d = 1/k$ (T_d = tempo de duplicação, $1/k$ = divisões por dia) (Guillard 1973). Peso seco foi determinado em triplicata após filtrar 10 mL^{-1} de amostra da cultura em filtros previamente pesados (Whatman GF/C), os filtros contendo a biomassa foram secos a uma temperatura de 60°C segundo metodologia proposta por Vollenweider (1974). Para avaliação do comprimento total, 50 células foram medidas com auxílio de microscópio óptico Leica DFC 295 analisando as imagens em sistema Las Core (LAS V3.8), com um objetiva micrométrica 40x. O volume celular foi obtido através do cálculo do

tamanho médio das células, utilizando a forma geométrica mais correspondente (forma de esfera) (Hillebrand et al. 1999). Carbono orgânico total (TOC) foi calculado através da fórmula $C = 0,1204.V^{1.051}$ (C = conteúdo de carbono em pg cel⁻¹; V = volume celular) por meio de regressão de acordo com Rocha e Duncan (1985). A clorofila-a foi determinada por análise colorimétrica utilizando espectrofotômetro, após extração em etanol a 90% (Nusch 1980). Nitrogênio amoniacal total (TAN) e fósforo total (TP) foram determinados espectrofotometricamente de acordo com Koroleff (1976) e Golterman et al. (1978), ambos avaliados ao início e final do experimento.

Análise bioquímica e perfil de aminoácido

Para avaliação dos teores de proteína e lipídeos, a biomassa das microalgas foi colhida semanalmente, centrifugada e liofilizada para posterior análise (A.O.A.C 1990). O perfil de aminoácidos foi determinado por meio de hidrólise ácida e cromatografia de troca iônica por cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC), para aminoácidos totais foi utilizado coluna LUNA C18 100Å 5u (250x4,6mm) 00G-4252-EQ e para as determinações de aminoácidos livres coluna Luna 3u C18(2) 100A (250x4,6mm) 00G-4251-E0 de acordo com modificações na metodologia proposta por White et al. (1986).

Análise estatística

Os dados deste estudo foram expressos como médias $\pm$ desvio padrão, e os resultados avaliados em triplicata. ANOVA One-way (análise de variância) foi aplicada para verificação entre as condições de cultivo e para comparar diferenças entre a produção máxima de células (Fowler et al. 1998). Na ocorrência de

diferenças significativas entre os resultados obtidos foi aplicado o teste de Tukey ao nível de 5% de significância ($P < 0,05$). Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa Statistica 10.0 (StatSoft Inc.).

RESULTADOS

Os resultados obtidos de densidade celular da microalga *Haematococcus pluvialis* são demonstrados na Figura 2. Quando cultivada em condição fototrófica o meio comercial WC apresentou máxima densidade celular no 16º dia de cultivo, com $3,2 \times 10^5$ cels mL⁻¹. Em meio à base de fertilizante inorgânico está densidade foi mais elevada, com $4,6 \times 10^5$ cels mL⁻¹ no 20º dia. Ambos os meios de cultura mantiveram seu crescimento estacionário após a máxima densidade celular ($p < 0,01$). Durante a fase exponencial de crescimento até o 12º dia a biomassa algal foi ligeiramente mais elevada no meio comercial WC e a partir do 13º dia de cultivo o crescimento algal foi mais elevado no meio NPK.

Em condição mixotrófica os resultados foram opostos a condição fototrófica, a máxima densidade celular foi observada em meio comercial WC, com $3,6 \times 10^5$ cels mL⁻¹ obtida no 25º dia, sendo esta superior ao meio a base de fertilizante inorgânico, com densidade máxima de $2,4 \times 10^5$ cels mL⁻¹ no 19º dia e após este período observou-se redução gradual na densidade celular ($p < 0,01$). Comparando os resultados obtidos entre as condições de cultivo, sob cultivo fototrófico a densidade celular de *Haematococcus pluvialis* foi cerca de 22% maior do que em condição mixotrófica (Figura 2).

A taxa de crescimento e tempo de duplicação apresentaram melhores resultados sob condição fototrófica, os maiores valores foram obtidos em meio comercial WC, com $k=0,21$ influenciando em um tempo de duplicação mais curto,

de 4,83 dias. Em condição mixotrófica, no meio WC a taxa de crescimento e tempo de duplicação apresentaram características mais lentas de desenvolvimento. No meio à base de fertilizante inorgânico, estas variáveis foram similares entre as condições de cultivo fototróficas e mixotróficas. Em relação a densidade celular em meio WC o crescimento foi similar nas duas condições de cultivo e, em meio NPK foi mais elevada ($p < 0,05$) sob condição fototrófica (Tabela 1).

O peso seco da microalga variou entre as condições de cultivo, os maiores valores ($p < 0,05$) foram observados em condição mixotrófica, no meio WC e no meio NPK. O comprimento celular, clorofila-a e o teor de proteínas foi similar ($p > 0,05$) nos dois meios de cultura sob as duas condições de cultivo (Tabela 1). O volume celular e o carbono orgânico total de *Haematococcus pluvialis* cultivada em condição mixotrófica foi mais elevado ($p < 0,05$) do que em condição fototrófica (Tabela 1).

O conteúdo total de lipídios de *Haematococcus pluvialis* variou de 1% a 9,6% em ambas condições de cultivo. O teor máximo (9,6%) ocorreu em cultivo fototrófico em meio NPK e o conteúdo mínimo (1%) foi observado sob cultivo mixotrófico em ambos os meios de cultura. Os baixos teores de lipídios na biomassa algal foram influenciados pelas concentrações elevadas de nitrogênio presente nos meios utilizados, uma vez que o meio comercial WC e o meio NPK são ricos em nitrogênio, principalmente nitrogênio amoniacal. Em condição mixotrófica o conteúdo lipídico foi menor (abaixo de 3% PS) comparado a condição fototrófica de cultivo ($p < 0,05$), estes valores podem ser atribuídos a adição de melaço ao meio de cultura (Tabela 1).

Haematococcus pluvialis contem níveis elevados de aminoácidos essenciais (EAA) e não essenciais (NEAA) como apresentado na Tabela 2. O conteúdo de

aminoácidos variou entre as condições de cultivo e a maior produção de aminoácidos totais foi observada sob condição mixotrófica em meio a base de fertilizante inorgânico, cerca de 37 g 100g peso seco ($p < 0,05$). Em meio comercial WC a produção de aminoácidos totais foi baixa, cerca de 15 g 100g peso seco em cultivo fototrófico ($p < 0,05$), porém em cultivo mixotrófico a adição de melaço aumentou a produção de aminoácidos totais, quase duplicando este conteúdo (28 g 100g peso seco).

Nos EAA a leucina foi predominante para ambas condições, fototrófica e mixotrófica ($p < 0,05$), e cisteína foi observada em concentrações mais baixas, não ultrapassando 1% da produção total de aminoácidos ($p < 0,05$). Dentre os NEAA o ácido glutâmico e alanina foram encontrados em maiores concentrações para ambas as condições de cultivo, representando em média 20% da produção total de AA ($p < 0,05$). Em contrapartida, a hidroxiprolina apresentou as menores concentrações (abaixo 3% da produção total de AA) por peso seco sob as condições de cultivo utilizadas (Tabela 2).

A adição de melaço aumentou os níveis de TAN, em condição fototrófica variou de 675,5 a 1237,1 mg L⁻¹ e em condição mixotrófica variando de 1316,9 a 3241,6 mg L⁻¹ para o meio WC e para o meio a base de fertilizante inorgânico, respectivamente ($p < 0,05$). Tanto sob condições fototróficas quanto condições mixotróficas, o maior consumo de TAN foi observado no meio comercial WC. Nos meios a base de fertilizante inorgânico o consumo de TAN foi baixo em condição fototrófica e mais elevado em condição mixotrófica, o aparente aumento no consumo de TAN sob condição mixotrófica foi influenciado pelo aumento dos níveis de nitrogênio ocasionado pela adição de melaço (Figura 3).

Os níveis iniciais de TP foram elevados, em condição fototrófica as maiores concentrações foram observadas em meio NPK (2,7 mg L⁻¹) e relativamente menor no meio comercial WC (1,5 mg L⁻¹). Em condição mixotrófica, a adição de melaço elevou as concentrações de TP para ambos os meios WC e NPK, com níveis de 2,7 e 3,2 mg L⁻¹ respectivamente ($p < 0,01$). Maior consumo de TP foi observado em condição fototrófica para ambos os meios de cultura. Estes resultados indicam que tanto as condições de cultivo como o meio de cultura influenciam o consumo dos nutrientes (Figura 3).

O custo do meio de cultura a base de fertilizante inorgânico para a produção de 50 litros (R\$7,03), foi inferior ao custo de produção do meio comercial WC (R\$17,45). A adição de melaço no cultivo mixotrófico apresentou baixo acréscimo nos custos para produção de 50 litros dos meios (R\$0,04), uma vez que esta matéria prima é de fácil obtenção no Brasil.

DISCUSSÃO

A densidade celular mais elevada ocorreu em meio NPK 10:10:10 sob condição fototrófica; no entanto, em condição mixotrófica este meio apresentou redução na densidade. Em meio comercial WC o crescimento de *Haematococcus pluvialis* foi menor quando comparado ao meio NPK 10:10:10 em condição fototrófica, porém superior ao cultivo sob condição mixotrófica.

Estudos comparando as condições fototróficas e mixotróficas no cultivo de *Haematococcus pluvialis* relatam melhores produções sob condição mixotrófica (Kobayashi et al. 1992, González et al. 2009, Orosa et al. 2005). Maior densidade celular quando as microalgas são cultivadas em condições mixotróficas de cultivo é devido à suplementação de fontes orgânicas de carbono (Liang et al. 2009, Lee 2001). Andruleviciute et al. (2014) obtiveram melhores resultados de *H. pluvialis* em

condição mixotrófica quando utilizaram 2 g L^{-1} de glicerol comparado ao cultivo fototrófico em meio BG-11, com máxima produtividade de 2,33 e $1,48 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. No entanto Wan et al. (2011) em estudo com clorófitas obtiveram a densidade celular reduzida sob condições mixotróficas de cultivo, como observado neste estudo em meio a base de fertilizante NPK.

A taxa de crescimento e o peso seco comparando o cultivo fototrófico e mixotrófico apresentaram variações durante o período experimental. González et al. (2009) atribuem estas variações às características algais, como linhagem da microalga e concentração do substrato orgânico utilizado sob condição mixotrófica, podendo aumentar ou reduzir estes parâmetros. Diferenças na densidade celular e taxa de crescimento em condições mixotróficas também podem ser atribuídas às impurezas do substrato orgânico utilizado, inibição ou disponibilidade (Liang et al. 2010). O melaço utilizado neste estudo foi “in natura”, apenas esterilizado, não sendo retiradas suas impurezas ou realizados métodos de tratamento. O uso de métodos que ajudem a disponibilização do substrato, como resinas de troca iônica, são indicados para aumentar a produção de biomassa (Liu et al. 2013).

As células algais quando cultivadas em novos substratos requerem um período de adaptação maior para que desenvolvam seus sistemas de transporte específicos de assimilação (Perez-Garcia et al. 2011). A baixa assimilação de determinado substrato pode ser relacionada à preferência pela absorção de outro substrato (Narang e Pilyugin 2005). Neste estudo, a baixa densidade celular sob condição mixotrófica em meio a base de fertilizante deve ter sido ocasionada pela preferência da microalga *Haematococcus pluvialis* a um substrato com maior facilidade de absorção, dificultando o consumo do substrato alternativo.

As condições de cultivo e fontes de nitrogênio influenciam o crescimento das microalgas, assim como as exigências de nitrogênio e fósforo total são diferentes sob condição fototrófica e mixotrófica (Alkhamis e Qin 2015). O consumo de nitrogênio e de fósforo total é mais elevado em condições fototróficas do que em condições mixotróficas de cultivo (Kim et al. 2013). Neste estudo, o consumo de N e P por *Haematococcus pluvialis* apresentou a mesma característica, sendo mais elevado em meio WC sob condição fototrófica de cultivo.

As concentrações de nutrientes presentes nos meios de cultura alteram o crescimento e a composição bioquímica das algas, maior síntese de proteína é observada quando as microalgas são cultivadas em meios ricos em nitrogênio, no entanto a limitação deste elemento reduz o acúmulo de lipídeos (Martínez et al. 2000, Adesanya et al. 2014). Neste estudo, em condição fototrófica foi observada elevada síntese de proteínas e baixo acúmulo de lipídeos; no entanto, a adição de melaço como substrato em cultivo mixotrófico reduziu os teores tanto de proteína quanto de lipídeos de *H. pluvialis*. O consumo de substratos orgânicos pode diminuir o acúmulo de proteínas e lipídios, assim como de todas as atividades enzimáticas, em pelo menos 20% (Reed et al. 2010).

Estudos voltados à avaliação de aminoácidos em microalgas ainda são limitados, e em espécies como *Haematococcus pluvialis* estes dados são ainda mais reduzidos. Esta espécie de microalga apresenta elevada produção de aminoácidos essenciais e não-essenciais como leucina e ácido glutâmico, e baixa produção de outros, como metionina, histidina e cisteína. Na maioria das espécies de microalgas a leucina e o ácido glutâmico constituem grande parte do teor dos aminoácidos totais, enquanto metionina, histidina e cisteína representam apenas uma pequena proporção (Brown 1991). Lorenz (1999) descrevendo esta espécie

de microalga obteve padrões de síntese de aminoácidos similares, com maior produção de leucina (1,84 g 100g) entre os EAA e ácido glutâmico (2,39 g 100g) e alanina (1,92 g 100g) entre os NEAA, sendo estas concentrações de aminoácidos inferiores as obtidas neste estudo em condição mixotróficas e fototrófica, exceto no meio comercial WC sob condição fototrófica.

A produção de aminoácidos totais em *Haematococcus pluvialis* pode ser estimulada ao adicionar fontes de carbono orgânico como melaço de cana-de-açúcar. No meio à base de fertilizante inorgânico a produção de aminoácidos totais quando cultivada em condição mixotrófica aumentou de 31,28 g para 36,56 g 100g e, em meio comercial WC o aumento foi mais elevado, de 15,14 g para 27,90 g 100g. Ji et al. (2014) também constataram que a adição de uma fonte orgânica de carbono aumenta a produção de aminoácidos totais em microalgas clorofíceas, ao testar a adição de glutamato monossódico obteve produção máxima de aminoácidos de 50,39 g 100g em condição mixotrófica e em condição fototrófica a produção foi de 37,12 g 100g.

Sendo assim, o uso de melaço como fonte alternativa de carbono orgânico no cultivo de *Haematococcus pluvialis* pode ser indicado para aumentar a produção de aminoácidos totais além de não elevar os custos de produção dos meios, uma vez que esta matéria prima é de fácil obtenção em países como o Brasil. O melaço de cana de açúcar é uma alternativa de viabilidade econômica na substituição de matérias primas de alto valor como acetato de sódio e glicose, entre outras comumente utilizadas em cultivos mixotróficos. Porém, seu uso deve ser avaliado, sendo que aumento da produção de biomassa foi também influenciado pelo meio de cultura adotado.

CONCLUSÃO

A microalga *Haematococcus pluvialis* apresenta maior densidade celular quando cultivada sob condição fototrófica de cultivo. O meio a base de fertilizante inorgânico NPK 10:10:10 é o mais indicado para obter elevada densidade celular em condição fototrófica em *H. pluvialis*. Em condição mixotrófica o meio de cultura influencia diretamente a densidade celular, podendo reduzir (NPK) ou aumentar a produção como observado em meio comercial WC. A adição de melaço não interferiu nas variáveis físico-químicas do cultivo, no entanto, proporcionou aumento na produção de aminoácidos totais. Outros compostos de alto valor comercial como proteína e lipídios são mais elevados sob condição fototrófica de cultivo. Para a produção desta espécie de microalga, a condição de cultivo a ser adotada deve ser levada em consideração dependendo da finalidade e dos objetivos de interesse.

REFERÊNCIAS

- A.O.A.C. (1990) Association of official analytical chemists. Official methods of analysis. 15TH. ED., Washington D. C.
- Adesanya VO, Davey MP, Scott SS, Smith AG (2014) Kinetic modelling of growth and storage molecule production in microalgae under mixotrophic and autotrophic conditions, *Bioresource Technology* 157:293-304
- Alkhamis Y, Qin JG (2015) Comparison of N and P requirements of *Isochrysis galbana* under phototrophic and mixotrophic conditions. *J Appl Phycol* 27:2231–2238
- Andruleviciute V, Makareviciene V, Skorupskaite V, Gumbyte M (2014) Biomass and oil content of *Chlorella* sp., *Haematococcus* sp., *Nannochloris* sp. and *Scenedesmus* sp. under mixotrophic growth conditions in the presence of technical glycerol. *J Appl Phycol* 26:83-90
- Brown MR (1991) The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *J Exp Mar Biol Ecol* 145: 79–99
- Chen P, Min M, Chen Y, Wang L, Li Y, Chen Q, Wang C, Wan Y, Wang X, Cheng Y, Deng S, Hennessy K, Lin X, Liu Y, Wang Y, Martinez B, Ruan B (2009) Review of

- the biological and engineering aspects of algae to fuels approach. *Int J Agric Biol Eng* 4:1-30
- Dalay MC, Imamoglu E, Demirel Z (2007) Agricultural fertilizers as economical alternative for cultivation of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17:393–397
- Fernandes BD, Mota A, Teixeira JA, Vicente AA (2015) Continuous cultivation of photosynthetic microorganisms: Approaches, applications and future trends. *Biotechnol Adv* 33:1228-1245
- Fowler J, Cohen L, Jawis P (1998) *Practical statistics for field biology*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons. 259 p
- Golterman HL, Clymo RS, Ohnstad MAM (1978) *Methods for physical and chemical analysis of fresh water*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publication. 213 p. IBP Handbook, no. 8
- González MA, Cifuentes AS, Gómez PI (2009) Growth and total carotenoid content of chilean strains of *Haematococcus pluvialis* Flotow, under laboratory conditions. *Gayana Botánica* 66:58-70
- Guillard RRL (1973) Division rates. In Stein JR. *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements*. London: Cambridge University Press. p. 289-311
- Guillard RRL, Lorenzen CJ (1972) Yellow-green algae with chlorophyllide. *Journal of Phycology* 8:10-14
- Hata, N, Ogbonna JC, Hasegawa Y, Taroda H, Tanaka H (2001) Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture. *J Appl Phycol* 13:395-402
- Hillebrand H, Dürselen CD, Kirschtel D, Pollinger U, Zohary T (1999) Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology* 35: 403-424
- Ji Y, Hu W, Li X, Ma G, Song M, Pei, H (2014) Mixotrophic growth and biochemical analysis of *Chlorella vulgaris* cultivated with diluted monosodium glutamate wastewater. *Bioresource Technology* 152:471–476
- Kamath SB, Vidhyavathi R, Sarada R, Gokare R (2008) Enhancement of carotenoids by mutation and stress induced carotenogenic genes in *Haematococcus pluvialis* mutants. *Bioresource Technology* 99:8667-73
- Kim S, Park JE, Cho YB, Hwang SJ (2013) Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresour Technol* 144:8-13
- Kobayashi M, Kakizono T, Yamaguchi K, Nishio N, Nagai S (1992) Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 74:17–20
- Koroleff F (1976) Determination of ammonia. In Grashoff E, Kremling E (eds.) *Methods of seawater analysis*. German: Verlag Chemie Weinheim. p. 126-133
- Lee YK (2001) Microalgal mass culture systems and methods: their limitation and potential. *J Appl Phycol* 13:307-315

- Lee YK (2004) Algal nutrition. Heterotrophic carbon nutrition. In: Richmond, A. (Ed.), Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Publishing, Oxford, UK, p. 116.
- Liang Y, Sarkany N, Cui Y, Blackburn JM (2010) Batch stage study of lipid production from crude glycerol derived from yellow grease or animal fats through microalgal fermentation. *Bioresour Technol* 101:6745–6750
- Liang YN, Sarkany N, Cui Y (2009) Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol Lett* 31:1043–1049
- Liu J, Sun Z, Zhong Y, Gerken H, Huang J, Chen F (2013) Utilization of cane molasses towards cost-saving astaxanthin production by a *Chlorella zofingiensis* mutant. *J Appl Phycol* 25: 1447-1456
- Lorenz RT. 1999. A technical review of *Haematococcus* algae. NatuRose™ Technical Bulletin #060, pp. 1-12. Cyanotech Corporation, Kailua-Kona, Hawaii.
- Martinez ME, Sánchez S, Jiménez JM, Yousfi F, Muñoz L (2000) Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology* 73:263-272
- Mata TM, Martins AA, Caetano NS (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:217-232
- Narang A, Pilyugin SS (2005.) Towards an integrated physiological theory of microbial growth: from subcellular variables to population dynamics. *Math Biosci Eng* 2:173-210.
- Nusch EA (1980) Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. *Archives für Hydrobiologie* 14:4-36
- Orosa M, Franqueira D, Cid A, Abalde J (2005) Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour Technol* 96:373-378
- Perez-Garcia O, Escalante FME, De-Bashan LE, Bashan Y (2011) Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Research* 45:11-36
- Reed MC, Lieb A, Nijhout HF (2010) The biological significance of substrate inhibition: a mechanism with diverse functions. *Bioessays* 32:422–429
- Rocha O, Duncan A (1985) The relationship between cell carbon and cell volume in freshwater algae species used in zooplankton studies. *Journal of Plankton Research* 7:279-294
- Sipaúba-Tavares LH, Pelicioni LC, Olivera A (1999) Use of inorganic (NPK) and the CHU₁₂ medium for cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) in laboratory. *Brazilian Journal of Ecology* 1:10-15
- Vollenweider RA (1974) A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 225 p. IBP, Handbook no. 12
- Wan W, Liu P, Xia J, Rosenberg JN, Oyler GA, Betenbaugh MJ, Nie Z, Qiu G (2011) The effect of mixotrophy on microalgal growth, lipid content, and expression levels of three pathway genes in *Chlorella sorokiniana*. *Appl Microbiol Biotechnol* 91:835–844

- Wang Y, Rischer H, Eriksen NT, Wiebe MG (2013) Mixotrophic continuous flow cultivation of *Chlorella protothecoides* for lipids. *Bioresour Technol* 144:608–614.
- White JA, Hart RJ, Fry JC (1986) An evaluation of the Waters Pico-Tag system for the amino-acid analysis of food materials. *J Clin Lab Auto* 8:170–177

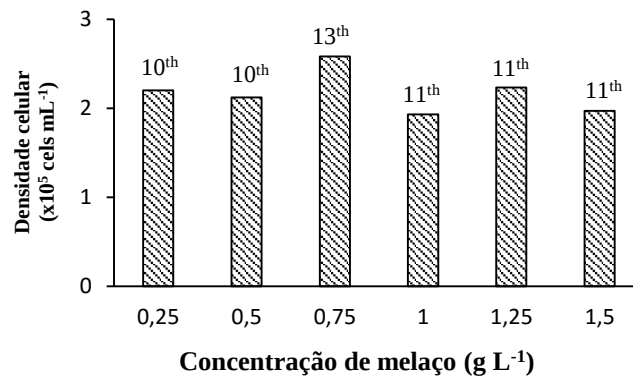


Figura 1. Densidade celular máxima de *Haematococcus pluvialis* em relação a concentração de melaço de cana de açúcar (10-13th= tempo em dias da máxima densidade celular).

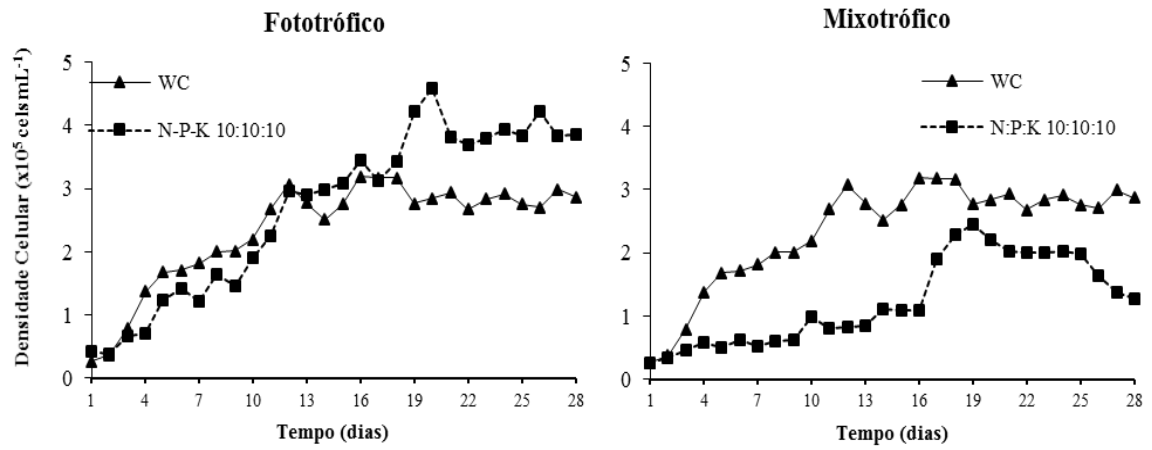


Figura 2. Crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* em condições fototróficas e mixotróficas.

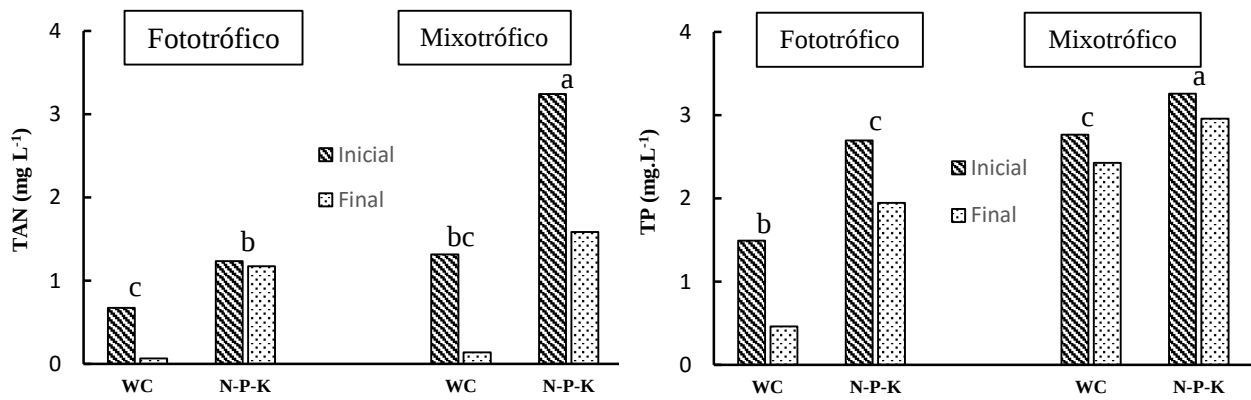


Figura 3. Concentração de Nitrogênio Amoniacal Total (TAN) e Fósforo Total (TP) nos diferentes meios de cultivo sob condições fototróficas e mixotróficas, diferentes letras minúsculas na parte superior de cada coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,01$).

Tabela 1. Variáveis fisiológicas da microalga *Haematococcus pluvialis* após o cultivo em condições fototróficas e mixotróficas.

Parâmetros	Fototrófico		Mixotrófico	
	WC	NPK	WC	NPK
Densidade celular máxima (cel ml ⁻¹)	3,2 x10 ^{5b}	4,6 x10 ^{5a}	3,6x10 ^{5ab}	2,4 x10 ^{5c}
Taxa de crescimento (k)	0,21	0,18	0,12	0,18
Tempo de duplicação (dias)	4,83	5,51	8,03	5,63
Peso seco (pg cel ⁻¹)	1966±1086 ^c	2798±735 ^{ab}	2810±822 ^b	2913±737 ^a
Comprimento total (µm)	23,7±2 ^a	21,7±3 ^a	25,3±1 ^a	25,7±2 ^a
Volume celular (µm ³)	7707±1976 ^c	6051±2685 ^c	9724±1245 ^b	12044±8314 ^a
Carbono orgânico total (pg cel ⁻¹)	1478±400 ^c	1148±541 ^c	1892±266 ^b	2395±1723 ^a
Proteína (% PS)	36,7±16 ^a	31,6±5 ^a	33,8±5 ^a	30,8±3 ^a
Lipídeo (% PS)	6,3±3 ^a	6±2 ^a	1,8±1 ^b	1,1±1 ^b
Clorofila-a (mg L ⁻¹)	728±548 ^a	741±545 ^a	721±332 ^a	830±663 ^a

Todos os valores são médias ± desvio padrão (n = 3). Letras diferentes na mesma linha representam diferenças significativas (p<0,05).

Tabela 2. Conteúdo de aminoácidos (g 100g peso seco) na microalga *Haematococcus pluvialis* após cultivo fototrófico e mixotrófico. Todos os valores são médias $\pm$ desvio padrão (n=2).

Aminoácidos	Fototrófico		Mixotrófico	
	WC	NPK	WC	NPK
Alanina	1,32 $\pm$ 0,0 ^d	2,68 $\pm$ 0,02 ^b	2,42 $\pm$ 0,01 ^c	3,14 $\pm$ 0,05 ^a
Arginina	1,09 $\pm$ 0,0 ^b	2,86 $\pm$ 0,01 ^a	1,99 $\pm$ 0,03 ^c	2,76 $\pm$ 0,07 ^a
Ácido aspártico	1,25 $\pm$ 0,02 ^d	1,69 $\pm$ 0,06 ^c	2,33 $\pm$ 0,08 ^b	2,76 $\pm$ 0,06 ^a
Cisteína*	0,11 $\pm$ 0,0 ^c	0,21 $\pm$ 0,0 ^b	0,19 $\pm$ 0,01 ^b	0,30 $\pm$ 0,0 ^a
Ácido glutâmico	1,72 $\pm$ 0,0 ^d	3,17 $\pm$ 0,02 ^c	3,39 $\pm$ 0,0 ^b	4,26 $\pm$ 0,01 ^a
Glicina	0,95 $\pm$ 0,04 ^b	1,83 $\pm$ 0,01 ^c	1,68 $\pm$ 0,0 ^c	2,18 $\pm$ 0,08 ^a
Hidroxiprolina	0,45 $\pm$ 0,01 ^a	0,54 $\pm$ 0,04 ^a	0,45 $\pm$ 0,0 ^a	0,44 $\pm$ 0,02 ^a
Histidina*	0,24 $\pm$ 0,0 ^d	0,60 $\pm$ 0,01 ^b	0,52 $\pm$ 0,0 ^c	0,70 $\pm$ 0,0 ^a
Isoleucina*	0,61 $\pm$ 0,01 ^a	1,39 $\pm$ 0,0 ^b	1,19 $\pm$ 0,01 ^c	1,53 $\pm$ 0,0 ^a
Leucina*	1,49 $\pm$ 0,02 ^d	3,35 $\pm$ 0,06 ^b	2,78 $\pm$ 0,01 ^c	3,62 $\pm$ 0,05 ^a
Lisina*	0,93 $\pm$ 0,02 ^d	2,05 $\pm$ 0,04 ^b	1,84 $\pm$ 0,0 ^c	2,59 $\pm$ 0,08 ^a
Metionina*	0,23 $\pm$ 0,0 ^d	0,58 $\pm$ 0,0 ^b	0,41 $\pm$ 0,0 ^c	0,65 $\pm$ 0,01 ^a
Fenilalanina*	0,89 $\pm$ 0,01 ^d	2,01 $\pm$ 0,01 ^b	1,64 $\pm$ 0,01 ^c	2,08 $\pm$ 0,0 ^a
Prolina	0,85 $\pm$ 0,01 ^d	1,83 $\pm$ 0,04 ^b	1,51 $\pm$ 0,02 ^c	1,99 $\pm$ 0,03 ^a
Serina	0,82 $\pm$ 0,01 ^d	1,53 $\pm$ 0,0 ^b	1,43 $\pm$ 0,0 ^c	1,87 $\pm$ 0,04 ^a
Treonina*	0,70 $\pm$ 0,01 ^d	1,56 $\pm$ 0,01 ^b	1,35 $\pm$ 0,02 ^c	1,80 $\pm$ 0,01 ^a
Tirosina*	0,45 $\pm$ 0,01 ^d	1,20 $\pm$ 0,12 ^b	0,95 $\pm$ 0,02 ^c	1,38 $\pm$ 0,02 ^a
Valina*	0,97 $\pm$ 0,01 ^d	2,14 $\pm$ 0,13 ^b	1,83 $\pm$ 0,0 ^c	2,44 $\pm$ 0,03 ^a
Total	15,14 $\pm$ 0,04 ^d	31,28 $\pm$ 0,3 ^b	27,90 $\pm$ 0,1 ^c	36,52 $\pm$ 0,6 ^a

(*) indica os aminoácidos essenciais

Letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os meios de cultivo.