

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
AQUICULTURA**

Giulia Helena Martins Pereira

**CULTIVO DA MICROALGA *Nannochloropsis oculata* EM
BATELADA ALIMENTADA**

Florianópolis
2016

Giulia Helena Martins Pereira

**CULTIVO DA MICROALGA *Nannochloropsis oculata* EM
BATELADA ALIMENTADA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia de Aquicultura, da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Aquicultura.

Orientador: Roberto
Bianchini Derner, Dr.

Coorientador: Rafael Garcia
Lopes, M. Sc.

Florianópolis
2016

Giulia Helena Martins Pereira

**CULTIVO DA MICROALGA *Nannochloropsis oculata* EM
BATELADA ALIMENTADA**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do grau de **Bacharel em Engenharia de Aquicultura**, e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 29 de Novembro de 2016.

Prof. Roberto Bianchini Derner
Orientador

Banca Examinadora:

Biol. Rafael Garcia Lopes, M. Sc.
Universidade Federal de Santa Catarina

Biol. Jaqueline de Araújo, M. Sc.
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado aos
meus pais, irmãos e amigos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus pela vida e pela oportunidade de nascer na família que nasci.

Aos meus pais acima de tudo.

À minha mãe Heloiza pelos momentos de afeto e carinho, por suas palavras de força nos momentos difíceis e por fazer eu me sentir muito amada e importante.

Ao meu pai Edison por me ensinar a enfrentar os problemas com honestidade e empatia. Por sempre me apoiar em todas as minhas decisões pessoais e profissionais com parceria e empolgação.

Aos meus irmãos Rodolfo, Gustavo e Vinícius, que, apesar da distância, sempre foram importantes na minha formação como pessoa, me ensinando a ser solidária e amiga.

Aos meus amigos e vizinhos de porta do Itacorubi II que se tornaram minha família em Florianópolis e estiveram comigo em todos os momentos felizes e tristes da minha jornada durante os cinco anos de graduação.

Às minhas amigas Ana Carolina e Fernanda pela amizade que durou um ensino médio e uma graduação. Por enfrentarem comigo todas as aulas, viagens, trabalhos, festas, coisas boas e ruins, mas sempre com sorrisos, força de vontade e alto astral.

Aos amigos que conquistei durante a Graduação que tornaram esta fase da minha vida muito mais leve e divertida.

Aos amigos de laboratório (LMM e LCA) pelo conhecimento repassado e amizade compartilhada.

Ao Professor Roberto por ter sido receptivo comigo desde a primeira conversa sobre a possibilidade de realizar o TCC no LCA, pela orientação e pelo comprometimento em ensinar.

Ao Rafael Lopes por todos os momentos de ensinamento e vivências dentro do laboratório, foram fundamentais para a realização deste trabalho.

A todo o corpo docente e aos técnicos do Departamento de Aquicultura pelos cinco anos de aprendizado e colaboração.

“- É possível ter fé em si mesmo, numa ideia, num conjunto de valores. Fé é a capacidade que se tem de acreditar no abstrato, no intangível, mesmo quando todo mundo diz que aquilo não existe ou vai dar errado.”

Pedro Salomão, 2016.

RESUMO

No presente trabalho foi desenvolvido um estudo de comparação entre dois meios de cultura (Guillard f/2 e LCA-AM) e dois métodos de cultivo (Batelada Simples e Batelada Alimentada) da microalga *Nannochloropsis oculata*. Foram realizados quatro tratamentos com três repetições, totalizando 12 unidades experimentais com um volume útil de 2.000 mL cada e mantidas a uma temperatura de $23 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. O estudo contou com duas etapas de pré-condição de cultivo: experimento de curva P_{XI} e período de aclimação das microalgas. A biomassa inicial do cultivo foi de 200 mg/L. A cada três dias foram analisados valores de: densidade celular ($\text{cel} \times 10^4/\text{mL}$), biomassa (g/L em peso seco), clorofila a (mg/g), carotenoides totais (mg/g), nitrato (μM), turbidez (NTU), salinidade e pH. A cada dois dias foi realizada a reposição dos nutrientes nas culturas em batelada alimentada. Em 31 dias de cultivo a maior biomassa alcançada foi de $7,2 \pm 1,1$ g/L no tratamento de Batelada Alimentada com o emprego do meio de cultura LCA-AM. Sendo assim, o método de cultivo em batelada alimentada utilizando o meio de cultura LCA-AM ocasionaram maior crescimento da microalga *N. oculata*.

Palavras-chave: *Nannochloropsis oculata*. Meio de cultura. Método de cultivo. Nutrientes. Crescimento.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Microalga <i>Nannochloropsis oculata</i>	24
Figura 2: Esterilização dos nutrientes por filtração a vácuo.	30
Figura 3: Frascos contendo microalga <i>Nannochloropsis oculata</i> dispostos em diferentes distâncias em relação a fonte luminosa durante o experimento de Curva P _x I.	31
Figura 4: Gráfico dos resultados da Curva P _x I.....	32
Figura 5: Culturas de <i>Nannochloropsis oculata</i> em período de aclimatação aos meios de cultura utilizados nos experimentos. .	33
Figura 6: Unidades experimentais no início do experimento (T ₀).	33
Figura 7: Processo de centrifugação da biomassa dos inóculos de <i>Nannochloropsis oculata</i>	34
Figura 8: Valores de pH no cultivo de <i>Nannochloropsis oculata</i> com diferentes meios de cultura e sistemas de cultivo. f/2 – Guillard f/2; LCA – LCA-AM; BS – Batelada Simples; BA – Batelada Alimentada.....	37
Figura 9: Densidade celular no cultivo de <i>Nannochloropsis oculata</i> em relação ao tempo de cultivo em diferentes tratamentos de cultivo e meio de cultura. f/2 – Guillard f/2; LCA – LCA-AM; BS – Batelada Simples; BA – Batelada Alimentada.....	38
Figura 10: Biomassa no cultivo de <i>Nannochloropsis oculata</i> em relação ao tempo de cultivo em diferentes tratamentos de cultivo e meio de cultura. f/2 – Guillard f/2; LCA – LCA-AM; BS – Batelada Simples; BA – Batelada Alimentada.	39
Figura 11: Coloração das culturas de <i>Nannochloropsis oculata</i> em Batelada Alimentada (verdes) e em Batelada Simples (amareladas).....	41
Figura 12: Valores de Clorofila a no cultivo da microalga de <i>Nannochloropsis oculata</i> em relação ao tempo de cultivo em diferentes tratamentos de cultivo e meio de cultura. f/2 – Guillard f/2; LCA – LCA-AM; BS – Batelada Simples; BA – Batelada Alimentada.....	41
Figura 13: Quantidade de carotenoides presentes na microalga <i>Nannochloropsis oculata</i> em relação ao tempo de cultivo em diferentes tratamentos e meio de cultura. f/2 – Guillard f/2; LCA – LCA-AM; BS – Batelada Simples; BA – Batelada Alimentada.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentrações em mg/L de N e P nos meios de cultura utilizados.....	29
Tabela 2: Componentes do meio de cultura Guillard f/2 (Guillard, 1975) e meio de cultura LCA-AM.....	29
Tabela 3: Parâmetros de crescimento de <i>Nannochloropsis oculata</i> empregando dois meios de cultura (f/2 e LCA-AM) e dois métodos de cultivo (batelada simples - BS e batelada alimentada - BA).	40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Microalgas e Aplicações.....	21
1.1.1 Aquicultura	22
1.1.2 Biocombustíveis.....	22
1.3 Espécie e Importância	23
1.4 Meio de Cultura.....	24
1.5 Métodos de Cultivo	25
2 OBJETIVO GERAL	27
2.1 Objetivos Específicos.....	27
3 METODOLOGIA.....	29
3.1 Microalga e pré-condições de cultivo.....	29
3.2 Aclimação das microalgas	32
3.3 Condições de Cultivo	33
3.4 Métodos analíticos.....	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5 CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 Microalgas e Aplicações

Microalgas fazem parte de um grupo bastante diverso de micro-organismos fotossintetizantes e que contêm clorofila a. São encontrados principalmente em ambientes aquáticos, dessa forma, com acesso facilitado à água, CO₂ e nutrientes, o que promove uma maior eficiência na conversão de energia luminosa em biomassa (GOUVEIA, 2011; MARQUES et al., 2011).

As microalgas marinhas apresentam grande capacidade fotossintética e são facilmente cultivadas, pois possuem mecanismos de fixação de CO₂ e conversão de biomassa em combustíveis líquidos, o que faz desses organismos excelentes alternativas para remoção de CO₂ da atmosfera (TAGAKI, 2000 apud CHIU et al. 2009).

Nos últimos anos, as microalgas vêm sendo mundialmente utilizadas para diversas aplicações, incluindo a nutrição animal e humana, indústria de cosméticos, farmacêutica, uso para fixação de CO₂, produção de bioenergia e remoção de nutrientes em tratamento de águas residuais. Suas propriedades biológicas e seus componentes são bastante estudadas com aplicações nas seguintes áreas de pesquisas: antioxidantes, compostos antimicrobianos, agentes anticancerígenos, anti-inflamatórios, com efeitos na e proteção cardiovascular, anti-obesidade, e no combate à diabetes (DOMINGUEZ, 2013; HARRISON; BERGES, 2005). Outra importante aplicação das microalgas é a produção de compostos bioativos como polímeros, peptídeos, ácidos graxos, carotenoides, toxinas e esteróis (PREISIG; ANDERSEN, 2005).

Microalgas também são utilizadas para produção de biomassa, pois possuem uma composição química que, dependendo da espécie, pode apresentar grandes quantidades de proteínas ou ter uma composição balanceada de lipídios, carboidratos e proteínas (RAJA; VIPIN; AIYAPPAN, 2013). Além disso, esses organismos possuem rápido crescimento e eficiência fotossintética, sendo uma excelente alternativa para produção de biomassa em larga escala (MIAO; WU; YANG, 2004).

Outra aplicação importante ocorre na aquicultura, onde as microalgas são utilizadas para a alimentação direta ou indireta de algumas espécies de peixes, moluscos, crustáceos e de diversos organismos de interesse econômico (DERNER et al., 2006).

1.1.1 Aquicultura

Segundo a Food and Agriculture Organization of the United Nations (2016), em 2014 a produção mundial da aquicultura foi de 73,8 milhões de toneladas, sendo que, 27% deste valor refere-se à produção de macroalgas e microalgas.

Em aquicultura, as microalgas são utilizadas na alimentação de organismos de cultivo, e que tem como principal função atender às necessidades nutricionais dos animais em suas fases larvais (ZITELLI et al., 1999). Em geral, são utilizadas como alimento para peixes, moluscos, larvas de crustáceos e zooplâncton. Alguns organismos alimentam-se de microalgas em determinadas fases, enquanto outros necessitam do fitoplâncton em todo seu ciclo de vida, a exemplo dos moluscos bivalves. Sendo assim, a produção de biomassa microalgal de alta qualidade é de grande valia na aquicultura (SILVA et al., 2003).

As microalgas são consideradas de extrema importância no desenvolvimento dos animais na aquicultura, pois aparecem como principais fontes de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LC-PUFA) como, por exemplo, o ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) e o ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n- 3) (VELENZUELA, 2015). Portanto, a presença de LC-PUFA nas microalgas, fornecidas direta ou indiretamente aos animais de cultivo, desempenha papel vital no desenvolvimento do sistema nervoso, crescimento e qualidade dos organismos cultivados, além de apresentarem maior eficiência do que a utilização do óleo de peixe (ERYALCIN; YILDIZ, 2015).

1.1.2 Biocombustíveis

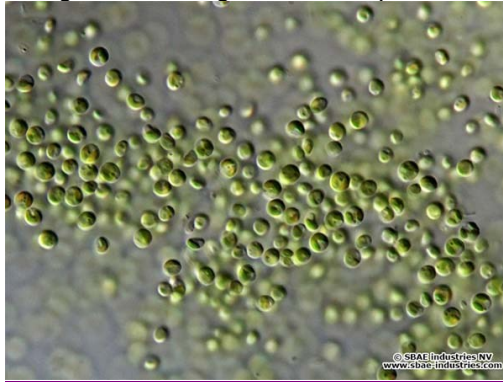
A biomassa de microalgas pode ser empregada na elaboração de diferentes tipos de biocombustíveis renováveis, e é considerada a matéria-prima mais promissora para este fim (CHISTI, 2007). Entre eles, estão: a produção de metano através

da digestão anaeróbica da biomassa (PRIYADARSHANI; RATH, 2012); produção de bioetanol, que pode ser produzido através da fermentação de carboidratos, especificamente açúcar e amido (BALAT, 2009), pois algumas espécies de microalgas acumulam grande quantidade de carboidratos nas células (VENKATESAN; MANIVASAGAN; KIM, 2015), e produção de biodiesel, através da grande capacidade de produção de lipídios das microalgas (LAM; LEE, 2012), em especial, triglicerídeos (GAO, 2010).

1.3 Espécie e Importância

A espécie utilizada no presente estudo foi a microalga marinha *Nannochloropsis oculata* (Droop) D.J. Hibberd 1981 (Figura 1), da Classe Eustigmatophyceae. Esse grupo (eustigmatofíceas) compreende 8 gêneros e 15 espécies, todas unicelulares, podendo ser encontradas em ambientes marinhos, de água doce e terrestres. São predominantemente planctônicas. Os organismos dessa Classe possuem parede celular rígida, e, acredita-se que são organismos fotoautotróficos obrigatórios com estrutura química de reserva ainda desconhecida (LOURENÇO, 2006). Segundo Rocha et al. (2003), as células do gênero *Nannochloropsis* apresentam tamanho entre 2 e 4 µm de diâmetro.

Nannochloropsis é considerado o principal gênero com aplicações comerciais (HEIMANN; HUERLIMANN, 2015). Espécies desse gênero são principalmente utilizadas nas atividades aquícolas devido a sua facilidade de cultivo, tamanho reduzido, alta velocidade de crescimento e alto teor de ácidos graxos poli-insaturados (LOURENÇO et al., 2002). Entretanto, também podem ser utilizadas para a produção de biocombustíveis (PASSELL et al., 2013).

Figura 1: Microalga *Nannochloropsis oculata*.

Fonte: SBAE Industries NV. Disponível em:

http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Eustigmatophyceae/NANNOCHLOROPSIS/Nannochloropsis_key.html. Acessado em: 13/11/2016.

1.4 Meio de Cultura

Para que haja adequado desempenho das microalgas em cultivo é necessário o conhecimento de suas necessidades nutricionais. Nutrientes inorgânicos como o nitrogênio e o fósforo são fundamentais para organismos marinhos, pois são utilizados pelas microalgas para síntese da matéria orgânica na fotossíntese. Apresentam ainda função essencial na constituição estrutural das biomoléculas, das membranas e do meio intracelular. Fazem parte dos processos de troca de energia, regulam atividades metabólicas, e diversas outras funções necessárias ao funcionamento celular. A deficiência desses nutrientes pode comprometer o desenvolvimento das células durante o cultivo (LOURENÇO, 2006).

Diversos fatores podem gerar interferência no crescimento das microalgas, na absorção de nutrientes e na acumulação de lipídios. Um desses fatores é a concentração de nutrientes disponível no ambiente de cultivo (ASLAN; KAPDAN, 2006; XIN et al., 2010; FERNANDES et al., 2016).

O nitrogênio é o segundo componente fundamental de estruturas celulares como, por exemplo, os pigmentos fotossintetizantes. Sendo assim, quando este elemento é

abundante em cultivo verifica-se o aumento nas concentrações de proteínas e clorofilas. Entretanto, quando se apresenta baixas concentrações, nota-se menor taxa de divisão celular e redução na produção de proteínas e clorofilas. Dessa forma, ocorre um aumento dos produtos de reservas, podendo gerar mudanças na coloração das culturas, que podem apresentar aspecto amarelado (LOURENÇO, 2006).

1.5 Métodos de Cultivo

Diferentes métodos de cultivo interferem na taxa de crescimento e na produção de biomassa microalgal. O método usualmente empregado para o cultivo de microalgas é o sistema de **Batelada Simples (BS)**, no qual os nutrientes são integralmente adicionados à cultura no início do cultivo. Uma alternativa para aumentar a produtividade é a regulação da concentração de nutrientes a partir do método de **Batelada Alimentada (BA)**, que funciona renovando (adicionando) a concentração dos nutrientes como, por exemplo, o nitrogênio. Este método tem como objetivo a melhora na produção de lipídios e na composição bioquímica das microalgas (HSIEH; WU, 2009).

Neste estudo, foi proposta a comparação do método de cultivo em batelada alimentada, uma vez que, conforme a literatura, este método pode apresentar efeitos positivos no crescimento das culturas em relação à densidade celular e ao aumento da biomassa no cultivo, quando comparado com o método de batelada simples (CHEN; ZHANG, 1997).

2 OBJETIVO GERAL

Determinar o efeito dos meios de cultura e dos métodos de cultivo (oferta dos nutrientes) em culturas de *Nannochloropsis oculata*.

2.1 Objetivos Específicos

- Comparar o efeito dos meios de cultura Guillard_f/2 e LCA-AM sobre o crescimento (densidade celular e biomassa) da microalga *Nannochloropsis oculata*;
- Comparar o efeito dos métodos de cultivo batelada simples e batelada alimentada sobre o crescimento (densidade celular e biomassa) da microalga *Nannochloropsis oculata*.

3 METODOLOGIA

3.1 Microalga e pré-condições de cultivo

No presente trabalho foi utilizada a cepa da microalga marinha *Nannochloropsis oculata* mantida no Banco de Cepas do Laboratório de Cultivo de Algas (LCA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), localizado na Barra da Lagoa, Florianópolis, Santa Catarina. A cepa de *N. oculata* foi mantida em meio de cultura Guillard f/2 (Guillard, 1975), em câmara de germinação a uma temperatura de 18°C, com irradiância de 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ e fotoperíodo de 8 h de luz e 16 h de escuro (8:16).

Os meios de cultura utilizados no estudo foram o Guillard f/2 e LCA-AM (Tabela 1 e 2). A preparação dos meios consistiu na utilização de água do mar esterilizada em autoclave, sendo os nutrientes sensíveis ao calor esterilizados por filtração a vácuo para evitar precipitação dos sais no processo de autoclavação. Foram utilizados filtros esterilizados individuais descartáveis (diâmetro de poro 0,2 μm) com capacidade de volume filtrado de até 500 mL (Figura 2). Os nutrientes foram adicionados à água do mar assepticamente, procedimento realizado na câmara de fluxo laminar.

Tabela 1: Concentrações em mg/L de N e P nos meios de cultura utilizados.

Nutrientes	f/2 (mg/L)	LCA-AM (mg/L)
Nitrogênio	150	255
Fósforo	16	27

Tabela 2: Componentes do meio de cultura Guillard f/2 (Guillard, 1975) e meio de cultura LCA-AM.

Componentes	f/2 (mL)	LCA-AM (mL)
Água do Mar	1	1
Nitrato (solução estoque)	1	2

Fosfato (solução estoque)	1	2
Metais-traço (solução estoque)	1	1
Vitaminas (solução estoque)	1	1

Figura 2: Esterilização dos nutrientes por filtração a vácuo.



Fonte: Giulia Helena Martins Pereira (2016)

Para o adequado crescimento das microalgas fotoautotróficas são necessários, além dos nutrientes do meio de cultura, uma fonte luminosa que emita apropriada intensidade luminosa em uma faixa com determinados comprimentos de onda, pois estes são elementos chaves no processo de fotossíntese, e afetam o crescimento e a composição dos ácidos graxos das microalgas (RA et al., 2016). Sendo assim, a qualidade e a quantidade de luz fornecida durante o cultivo é o parâmetro mais importante para esses organismos, pois é fator essencial para a fotossíntese e para a regulação de diversos processos no desenvolvimento das microalgas (SCHULZE et al., 2016).

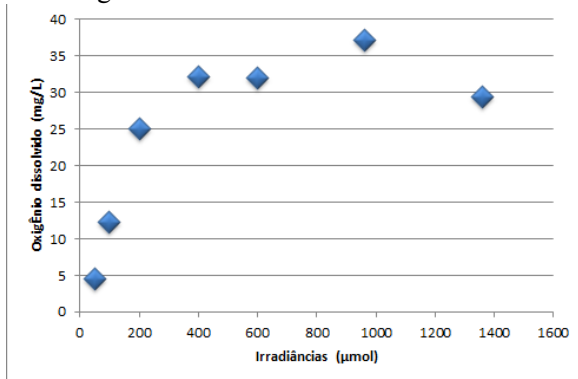
Para se determinar a melhor irradiância em relação à fotossíntese, foi realizada uma etapa anterior ao cultivo que consistiu em um experimento de Curva P_xI (fotossíntese *versus* irradiância), com o objetivo de se determinar a melhor irradiância em $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ para o cultivo de *N. oculata*. Foram empregados valores de irradiâncias: 50, 100, 200, 400, 600, 960 e 1360 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$; onde frascos contendo 250 mL de cultura foram dispostos de acordo com as irradiâncias (Figura 3).

Figura 3: Frascos contendo microalga *Nannochloropsis oculata* dispostos em diferentes distâncias em relação a fonte luminosa durante o experimento de Curva P_xI.



Fonte: Giulia Helena Martins Pereira

De acordo com o experimento de Curva P_xI, a irradiância que apresentou maior produção de oxigênio dissolvido (Figura 4) - que é indicativo de maior atividade fotossintética - correspondeu a 400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

Figura 4: Gráfico dos resultados da Curva P_{xI}

Fonte: Desenvolvido pelo autor

3.2 Aclimação das microalgas

Uma vez que as microalgas estavam sendo cultivadas há bastante tempo utilizando o meio de cultura Guillard f/2, foi necessário um período de aclimação ao meio de cultura LCA-AM. Esse processo se fez necessário para que as propriedades fisiológicas da espécie se ajustassem à nova fonte de nutrientes, pois sem essa etapa as microalgas poderiam apresentar maior desempenho nos tratamentos contendo meio Guillard f/2, tornando os resultados questionáveis (VOLTOLINA; NIEVES; NAVARRO, 1998).

A microalga *N. oculata* foi mantida em período de aclimação durante 7 dias, na sala de Cultivo Experimental do LCA. Foram utilizados 6 frascos cilíndricos de borossilicato com volume de 1.000 mL (Figura 5), sendo, três unidades com meio de cultura f/2 e três unidades com meio de cultura LCA-AM. Para a aeração (agitação) das culturas foi empregado ar atmosférico enriquecido com 0,5% de CO₂, e temperatura mantida em 23°C.

Figura 5: Culturas de *Nannochloropsis oculata* em período de aclimação aos meios de cultura utilizados nos experimentos.



Fonte: Giulia Helena Martins Pereira (2016)

3.3 Condições de Cultivo

Posteriormente à aclimação, as culturas do experimento foram distribuídas em 12 unidades experimentais (Figura 6). Foram realizados quatro tratamentos com três repetições cada em sistema bifatorial: meios de cultura f/2 e LCA-AM; e os métodos de cultivo Batelada Simples (nutrientes adicionados apenas no início do cultivo) e Batelada Alimentada (nutrientes adicionados a cada 2 dias às culturas).

Figura 6: Unidades experimentais no início do experimento (T0).



Fonte: Giulia Helena Martins Pereira (2016)

Antes da inoculação das 12 unidades experimentais, foi iniciado o processo de centrifugação da biomassa dos 6 inóculos aclimatados (Figura 7). Estes foram centrifugados separadamente de acordo com cada meio de cultura. Após a primeira centrifugação, a biomassa foi lavada com água marinha estéril para retirada dos resíduos de nutrientes que permaneceram na cultura após aclimação e novamente centrifugada para a retirada total da água de lavagem. Após esse processo, ocorreu a ressuspensão da biomassa em água marinha estéril mais uma vez, e por fim a inoculação de 500 mL da cultura de *N. oculata* em 1.500 mL de meio de cultura das unidades experimentais.

Figura 7: Processo de centrifugação da biomassa dos inóculos de *Nannochloropsis oculata*.



Fonte: Giulia Helena Martins Pereira (2016)

O cultivo foi desenvolvido na sala de Cultivo Experimental do LCA, com uma irradiância de $400 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, temperatura de 23°C , fotoperíodo de 24:0, aeração constante empregando ar atmosférico enriquecido com 0,5% de CO_2 , durante 31 dias.

3.4 Métodos analíticos

As análises padrões do laboratório incluíram valores de: pH, turbidez, salinidade, biomassa, fosfato, nitrato, clorofila a e carotenoides. Essas análises foram feitas nos quatro primeiros dias de experimento (T0, T1, T2 e T3) e posteriormente a cada 3 dias. Também foi realizada a reposição dos nutrientes N e P a cada 2 dias para as 6 unidades experimentais dos tratamentos em batelada alimentada.

A concentração de nitrato foi determinada a partir do meio filtrado das amostras da cultura das unidades experimentais, seguindo o método colorimétrico (HACH®). Para isso foi utilizado o reagente Permachem Reagent® NitraVer 5 adicionado a 10 mL do meio filtrado, homogeneizado durante 2 min e mantido em repouso por 13 min para posteriormente ser medido em espectrofotômetro (410 nm).

Para as unidades de batelada alimentada, foi calculado o valor de nitrato consumido pela cultura e determinada a quantidade de reposição dos nutrientes, a cada dois dias.

A concentração de biomassa (em peso seco) foi determinada pelo método gravimétrico (APHA, 2005) empregando filtros de fibra de vidro GF-1 (0,45 micrometros). Foram filtrados 15 mL de cultura e o filtro foi mantido em estufa (60 °C) durante 24 h (até peso constante), depois foi deixado esfriar em um dessecador em vácuo durante 30 min. A biomassa foi determinada pela diferença do peso final e inicial do filtro, dividido pelo volume filtrado.

Para a determinação da densidade celular (cel/mL) foi utilizada Câmara de Neubauer e microscópio óptico. O teor de clorofila (mg/g) e carotenoides totais (mg/g) foi determinado a partir da amostra de 5 mL. A amostra foi filtrada (Fibra de vidro GF-6), e o filtro congelado. Ao final do período de cultivo os filtros foram macerados e o material foi ressuspensionado em acetona 90%. A clorofila a e os carotenoides totais foram determinados com auxílio de espectrofotômetro nos comprimentos de onda 664, 647 nm (clorofila a e b), 480 nm e 510 nm (carotenoides totais).

Os parâmetros de pH e turbidez foram analisados através do aparelho pHmetro e turbidímetro, respectivamente.

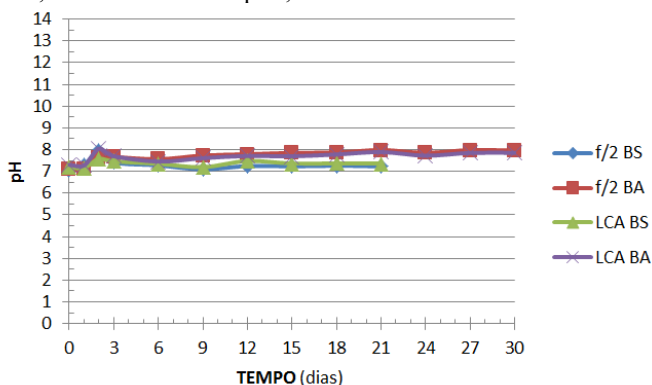
Para as análises estatísticas foi utilizado o método ANOVA bifatorial.

Os experimentos com os diferentes meios de cultura foram mantidos até que se alcançasse a fase estacionária, assim, o experimento com os tratamentos em batelada simples durou 22 dias e em batelada alimentada, 31 dias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, o pH foi mantido dentro da faixa considerada ótima para o cultivo de microalgas (7,0 e 8,0) através da mistura de 0,5% de CO₂ ao ar, inserido às culturas (Figura 8). Pois, segundo Razzak (2015), a oferta de CO₂ ao cultivo interfere no pH da cultura, bem como no crescimento de microalgas. Algumas espécies apresentam pH ótimo em torno de 7,0.

Figura 8: Valores de pH no cultivo de *Nannochloropsis oculata* com diferentes meios de cultura e sistemas de cultivo. f/2 – Guillard f/2; LCA – LCA-AM; BS – Batelada Simples; BA – Batelada Alimentada.

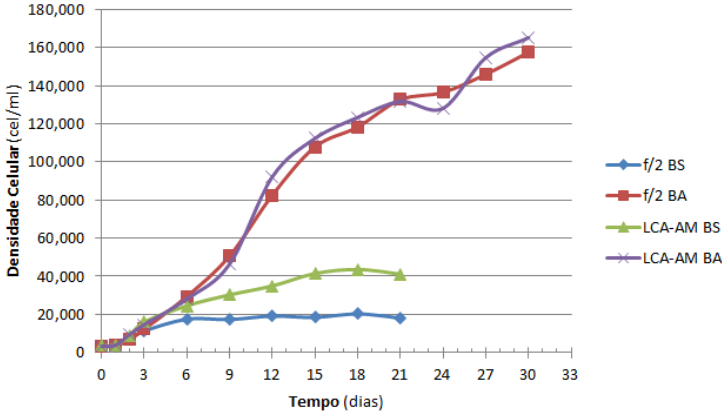


Fonte: Desenvolvido pelo autor

Em relação à densidade celular, os maiores valores foram encontrados —para os tratamentos em batelada alimentada, alcançando média de $165.166,70 \pm 10.797,4$ cel/mL para o meio LCA-AM, e 157.000 ± 16.225 cel/mL para o meio f/2.

Nos tratamentos em batelada simples, os valores de densidade celular foram menores para o meio de cultura f/2, com média de $18.066,7 \pm 2.055,1$ cel/mL (Figura 9). Segundo Converti et al. (2012), esse resultado pode ser justificado pela redução na concentração de Nitrato durante o cultivo, fator que ocasiona diminuição na taxa de crescimento de *N. oculata*.

Figura 9: Densidade celular no cultivo de *Nannochloropsis oculata* em relação ao tempo de cultivo em diferentes tratamentos de cultivo e meio de cultura. f/2 – Guillard f/2; LCA – LCA-AM; BS – Batelada Simples; BA – Batelada Alimentada.

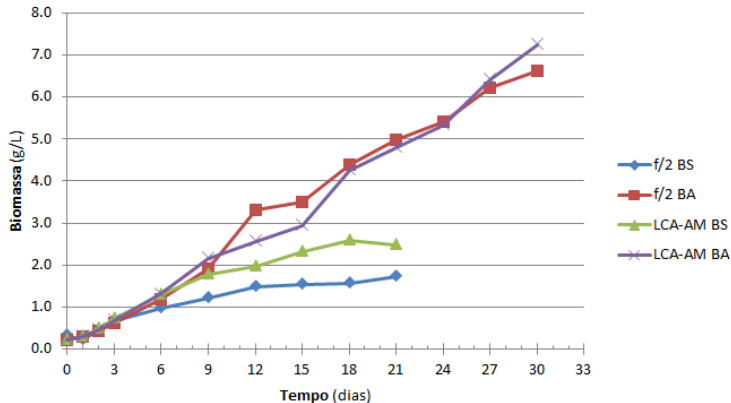


Fonte: Desenvolvido pelo autor

Resultados obtidos em Yeh e Chang (2012) mostram que a produção de biomassa depende tanto das condições de crescimento como também do meio de cultura utilizado.

Neste estudo, a biomassa da microalga *Nannochloropsis oculata* apresentou valores mais elevados nos tratamentos em batelada alimentada quando comparados aos tratamentos em batelada simples. Com média de $6,6 \pm 0,5$ g/L utilizando o meio f/2 e $7,2 \pm 1,1$ g/L utilizando o meio LCA-AM (Figura 10). Resultado similar foi demonstrado em Wang (2015), onde *N. oculata* apresentou maiores valores de biomassa quando cultivadas em batelada alimentada.

Figura 10: Biomassa no cultivo de *Nannochloropsis oculata* em relação ao tempo de cultivo em diferentes tratamentos de cultivo e meio de cultura. f/2 – Guillard f/2; LCA – LCA-AM; BS – Batelada Simples; BA – Batelada Alimentada.



Fonte: Desenvolvido pelo autor

Segundo as análises estatísticas (ANOVA) para os parâmetros de crescimento analisados, houve diferença significativa na densidade celular entre os métodos de cultivo de batelada alimentada e batelada simples, e com diferença significativa também entre os meios f/2 e LCA-AM apenas no método BS, que apresentou melhor resultado com o meio LCA-AM.

Os valores de biomassa apresentaram diferenças significativas entre os métodos batelada simples e batelada alimentada, mas sem diferença significativa entre os meios de cultura.

A produtividade volumétrica apresentou diferença significativa entre os métodos de cultivo e diferença significativa entre os meios de cultura apenas no método batelada simples, apresentando maiores valores no meio LCA-AM (Tabela 3).

Esses resultados ocorreram devido a uma maior concentração de nitrato inicial presente no meio LCA-AM. Uma tendência similar foi observado por Xie et al. (2013), onde houve maior produção de biomassa microalgal cultivada a partir de uma maior concentração de nitrato inicial.

Tabela 3: Parâmetros de crescimento de *Nannochloropsis oculata* empregando dois meios de cultura (f/2 e LCA-AM) e dois métodos de cultivo (batelada simples - BS e batelada alimentada - BA).

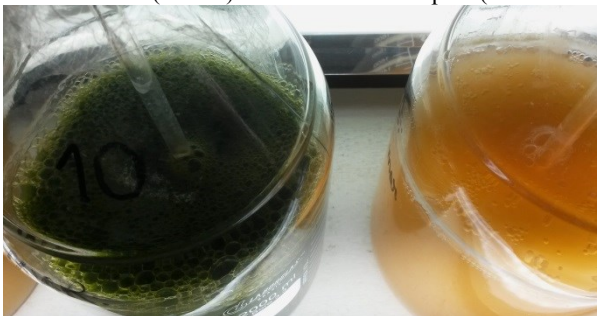
Meios	Métodos	Densidade	Biomassa (mg/L)	Produtividade (mg/L/d)
		Celular (cel/mL x 10 ⁴)		
f/2	BS	20.833±1.659 ^c	1,73± 0,45 ^b	0,08 ± 0,02 ^c
	BA	159.833±3.156 ^a	6,61 ± 0,48 ^a	0,22 ± 0,02 ^a
LCA-AM	BS	45.133±4.910 ^b	2,58± 0,24 ^b	0,14 ± 0,02 ^b
	BA	171.000±17.685 ^a	7,24 ± 1,10 ^a	0,24 ± 0,04 ^a

Dados médios ± desvio padrão, n = 3. ANOVA bifatorial. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas significativas (Teste de Duncan, p<0,05).

Foi obtida maior produção de clorofila a e carotenoides em batelada alimentada (Figura 12 e 13). Este resultado ocorreu devido as concentrações de nitrogênio, as quais levaram a um aumento no teor de clorofila, assim como no teor de carotenoides, que apresentaram tendência similar às clorofilas, sendo que resultados equivalentes foram observados em Lourenço et al. (2002).

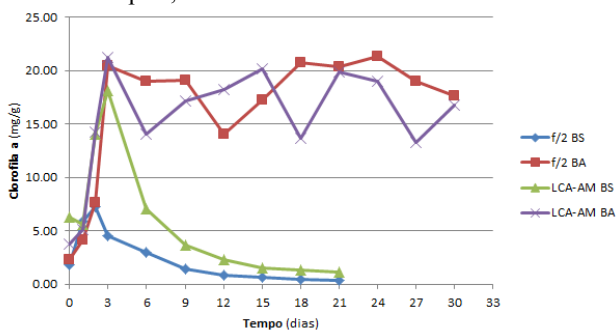
No sistema de batelada simples, a produção destes componentes celulares foi notoriamente reduzida durante o cultivo. Segundo estudos de Li et al. (2008), esse decréscimo ocorreu devido a utilização da clorofila a como fonte de nitrogênio intracelular nas culturas que apresentaram limitação de nitrato, apresentando aspecto mais amarelado às culturas (Figura 11).

Figura 11: Coloração das culturas de *Nannochloropsis oculata* em Batelada Alimentada (verdes) e em Batelada Simples (amareladas).



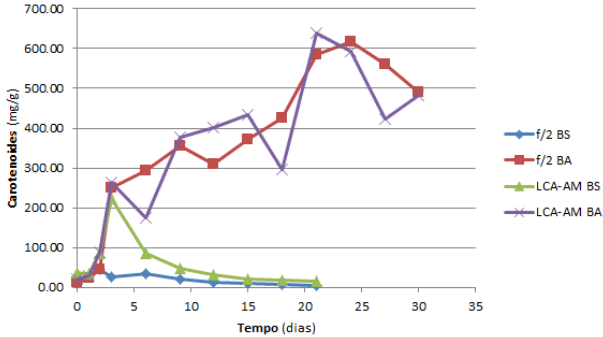
Fonte: Giulia Helena Martins Pereira (2016)

Figura 12: Valores de Clorofila a no cultivo da microalga de *Nannochloropsis oculata* em relação ao tempo de cultivo em diferentes tratamentos de cultivo e meio de cultura. f/2 – Guillard f/2; LCA – LCA-AM; BS – Batelada Simples; BA – Batelada Alimentada.



Fonte: Desenvolvido pelo autor

Figura 13: Quantidade de carotenoides presentes na microalga *Nannochloropsis oculata* em relação ao tempo de cultivo em diferentes tratamentos e meio de cultura. f/2 – Guillard f/2; LCA – LCA-AM; BS – Batelada Simples; BA – Batelada Alimentada.



Fonte: Desenvolvido pelo autor

5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, a microalga *Nannochloropsis oculata* demonstrou maior crescimento através do método de cultivo batelada alimentada, utilizando meio de cultura LCA-AM.

Os resultados também apresentaram valores crescentes para clorofila a e carotenoides nos tratamentos em batelada alimentada, independente do meio de cultura utilizado.

Para produtividade, os valores foram maiores no método batelada alimentada, utilizando tanto o meio f/2 quanto o LCA-AM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APHA. American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. **21^oed**, n. 1, p. 1085, 2005.

ASLAN, S.; KAPDAN, I. K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. **Ecological Engineering**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.64-70, nov. 2006. Elsevier BV.

BALAT, M. Bioethanol as a Vehicular Fuel: A Critical Review. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, [s.l.], v. 31, n. 14, p.1242-1255, 14 ago. 2009.

CHEN, F.; ZHANG, Y. High cell density mixotrophic culture of *Spirulina platensis* on glucose for phycocyanin production using a fed-batch system. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 20, n. 3, p.221-224, fev. 1997.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.294-306, maio 2007.

CHIU, S. et al. Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 100, n. 2, p.833-838, jan. 2009.

CONVERTI, A. et al. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering And Processing: Process Intensification**, [s.l.], v. 48, n. 6, p.1146-1151, jun. 2009.

DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p.1959-1967, 2006.

DOMINGUEZ, H. (Ed.). **Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals**. Vigo: Woodhead Publishing, 2013.

ERYALCIN, K. M.; YILDIZ, M. Effects of Long-Term Feeding with Dried Microalgae Added Microdiets on Growth and Fatty Acid Composition of Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L., 1758). **Turkish Journal Of Fisheries And Aquatic Sciences**, [s.l.], v. 15, n. 4, p.905-915, 2015.

FAO. 2016. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2016**. Contributing to food security and nutrition for all. Rome. 200 pp.

FERNANDES, T. et al. Changes in fatty acid biosynthesis in marine microalgae as a response to medium nutrient availability. **Algal Research**, [s.l.], v. 18, p.314-320, set. 2016.

GAO, Chunfang et al. Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides*. **Applied Energy**, [s.l.], v. 87, n. 3, p.756-761, mar. 2010.

GOUVEIA, L. Microalgae and Biofuels Production. In: GOUVEIA, L. **Microalgae as a Feedstock for Biofuels**. Lisboa: Springerbriefs In Microbiology, 2011. Cap. 2. p. 2-20.

GUILLARD, R.R.L. 1975. **Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates**. pp 26-60. In Smith W.L. and Chanley M.H (Eds.) *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, USA.

HARRISON, P. J.; BERGES, J. A. Marine culture media. In: ANDERSEN, A. R. (Ed.). **Algal Culturing Techniques**. New York: Academic Press, 2005. Cap. 3. p. 21-33.

HEIMANN, K.; HUERLIMANN, R. Microalgal Classification: Major Classes and Genera of Commercial Microalgal Species. In: KIM, S. (Ed.). **Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances**. Busan: Academic Press, 2015. Cap. 3. p. 25-42.

HSIEH, C.; WU, W. Cultivation of microalgae for oil production with a cultivation strategy of urea limitation. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 100, n. 17, p.3921-3926, set. 2009.

LAM, M. K.; LEE, K. T. Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 30, n. 3, p.673-690, maio 2012.

LI, Y. et al. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. **Applied Microbiology And Biotechnology**, [s.l.], v. 81, n. 4, p.629-636, 16 set. 2008.

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

LOURENÇO, S. O. et al. Effects of different nitrogen sources on the growth and biochemical profile of 10 marine microalgae in batch culture: an evaluation for aquaculture. **Phycologia**, [s.l.], v. 41, n. 2, p.158-168, mar. 2002.

MARQUES, A. E. et al. Microalgae Biotechnological Applications: Nutrition, Health and Environment. In: JOHANSEN, M. N. (Ed.). **Microalgae: Biotechnology, Microbiology and Energy**. New York: Nova, 2011. Cap. 1. p. 1-60.

MIAO, X.; WU, Q.; YANG, C. Fast pyrolysis of microalgae to produce renewable fuels. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, [s.l.], v. 71, n. 2, p.855-863, jun. 2004.

PASSELL, H. et al. Algae biodiesel life cycle assessment using current commercial data. **Journal of Environmental Management**, [s.l.], v. 129, p.103-111, nov. 2013.

PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and industrial applications of micro algae: A review. **J. Algal Biomass Utln**, Sriram Chandra Vihar, v. 4, n. 3, p.89-100, 2012.

RA, C. et al. Effects of light-emitting diodes (LEDs) on the accumulation of lipid content using a two-phase culture process with three microalgae. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 212, p.254-261, jul. 2016.

RAJA, A.; VIPIN, C.; AIYAPPAN, A. Biological importance of Marine Algae: An overview. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Tiruchirapalli, v. 2, n. 5, p.222-227, 2013.

RAZZAK, S. A. et al. Effects of CO₂ Concentration and pH on Mixotrophic Growth of *Nannochloropsis oculata*. **Appl Biochem Biotechnol**, [s.l.], v. 176, n. 5, p.1290-1302, 30 abr. 2015.

SBAE Industries NV. Disponível em:
http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Eustigmatophyceae/NANNOCHLOROPSIS/Nannochloropsis_key.html. Acessado em: 13/11/2016.

SCHULZE, P. S. C. et al. Effect of light quality supplied by light emitting diodes (LEDs) on growth and biochemical profiles of *Nannochloropsis oculata* and *Tetraselmis chuii*. **Algal Research**, [s.l.], v. 16, p.387-398, jun. 2016. Elsevier BV.

SILVA, F. C. da et al. Cultivo de Microalgas Marinhas. In: POLI, C. R.; POLI, A. B. **Aquicultura: Experiências Brasileiras**. Florianópolis: Multitarefa, 2003. p. 455.

VALENZUELA, A. B.; SANHUEZA, J. C.; VALENZUELA, R. B. Las microalgas: una fuente renovable para la obtención de ácidos grasos omega-3 de cadena larga para la nutrición humana y animal. **Rev. Chil. Nutr.**, [s.l.], v. 42, n. 3, p.306-310, 2015.

VENKATESAN, J.; MANIVASAGAN, P.; KIM, S. Marine Microalgae Biotechnology: Present Trends and Future Advances. In: KIM, S.(Ed.). **Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances**. Busan: Academic Press, 2015. Cap. 1. p. 1-9.

VOLTOLINA, D.; NIEVES, M.; NAVARRO, G. The importance of acclimation for the evaluation of alternative media for microalgae growth. **Aquacultural Engineering**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.7-15, nov. 1998.

WANG, T. et al. Influence of inoculum cell density and carbon dioxide concentration on fed-batch cultivation of *Nannochloropsis oculata*. **Biomass and Bioenergy**, [s.l.], v. 77, p.9-15, jun. 2015.

XIE, Y. et al. Phototrophic cultivation of a thermo-tolerant *Desmodesmus* sp. for lutein production: Effects of nitrate concentration, light intensity and fed-batch operation. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 144, p.435-444, set. 2013.

XIN, L. et al. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 101, n. 14, p.5494-5500, jul. 2010.

YEH, K.; CHANG, J. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 105, p.120-127, fev. 2012.

ZITTELLI, G. C. et al. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular photobioreactors. **Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 70, n. 1-3, p.299-312, abr. 1999.