

Avaliação do uso de fertilizantes minerais no cultivo de *Chlorella sorokiniana*

Alessa Bembom Garcia¹, Luiz Fernando Roncaratti Júnior², Gabriela Cunha Possa³, Wellington Rangel dos Santos⁴, Lucio Scartezini Lopes⁵, Leticia Jungmann Cançado⁶

Resumo

O potencial das microalgas para realizar a fotossíntese e acumular grandes quantidades de lipídeos, além de vários outros compostos de alto valor agregado, tal como carotenoides e biopolímeros, as torna uma fonte promissora para fins biotecnológicos. Entretanto, o alto custo de produção de biomassa e os problemas relacionados à contaminação por outros microrganismos dificultam o escalonamento do cultivo, desafiando significativamente a comercialização dos bioprodutos gerados. Em estudos anteriores, nosso grupo de pesquisa propôs a formulação de um novo meio de cultivo, denominado *Blue Green Nitrogen Mix* (BGNIM), feito com fertilizante mineral, o qual tornou o cultivo de *Chlorella sorokiniana* 95% mais barato do que quando cultivado no meio padrão (*Blue Green 11*) BG11. O presente estudo tem como objetivo propor dois novos meios de cultivo, a partir da formulação inicialmente proposta para o meio BGNIM, também feitos à base de fertilizantes minerais. Os resultados obtidos demonstram que um dos meios propostos, BGNIM-Fetrilon, foi capaz de produzir mais biomassa de *C. sorokiniana* do que o meio padrão BG11. O outro meio proposto, BGNIM-CXK, produziu biomassa de forma similar ao BGNIM.

Termos para indexação: *Chlorella sorokiniana*, microalgas, meio de cultivo, fotobiorreatores automatizados.

Introdução

Por causa do aumento da população mundial e da melhoria dos padrões de vida, a demanda global por tecnologias inovadoras que auxiliem no aumento do rendimento da produção agrícola e reduzam os impactos ambientais está cada vez mais em alta (Gatamaneni Loganathan et al., 2020). Nesse contexto, as microalgas destacam-se como a nova fonte mais promissora de biomassa (Chisti, 2018), tanto pelo fato de poderem ser utilizadas como fonte de alimento, cosméticos e fármacos (Lee et al., 2017) quanto por poderem atuar na biorremediação de águas contaminadas, logrando gerar bioprodutos, como biofertilizantes e biocombustíveis (Saral et al., 2022).

O fato de o cultivo de microalgas possuir um pequeno ciclo de crescimento, quando comparado aos de culturas vegetais, não precisar de terra arável, não competindo, portanto, por terras, e apresentar, ao longo de todo o ano, uma produtividade dez vezes maior que vegetais superiores (Morocho-Jácome et al., 2020; Hu et al., 2008), confere a esses microrganismos uma grande vantagem para fins biotecnológicos. Além disso, as microalgas são capazes de sintetizar e acumular grandes quantidades de lipídio/óleo (de 20% a 50% do peso seco), possuem menos compostos estruturais, como lignina e celulose, e produzem diversos coprodutos ou subprodutos de alto valor agregado, como biopolímeros, pigmentos e fitormônios (Fontenelle et al., 2017).

¹ Biotecnologista, mestre em Ciências Biológicas, alessa.bembom@gmail.com

² Físico, doutor em Química, Universidade de Brasília, roncaratti@unb.br

³ Física, doutora em Física, Universidade de Brasília, possa@unb.br

⁴ Cientista da computação, mestre em Educação Física, Embrapa Agroenergia, wellington.santos@embrapa.br

⁵ Cientista da computação, Embrapa Agroenergia, lucio.scartezini@embrapa.br

⁶ Bióloga, doutora em Genética e Biologia Molecular, Embrapa Agroenergia, leticia.jungmann@embrapa.br

Entretanto, estima-se que de 50% a 65% do custo de produção de microalgas esteja relacionado aos processos de cultivo e colheitas (Chen et al., 2018), representando esses os principais gargalos para a viabilização do escalonamento das produções de microalgas de formas lucrativa e competitiva (Vandamme, 2013).

Estudos anteriores propuseram um meio de cultivo, chamado *Blue Green Nitrogen Mix* (BGNIM), capaz de reduzir o custo de produção de *Chlorella sorokiniana* em 95%, além de apresentar similaridade de produtividade algal, quando comparado com o meio de cultivo padrão BG11 (Ribeiro et al., 2020). Nesse meio, foi utilizado um coquetel de micronutrientes comercial, Rexolin-BRA, que, após a publicação do trabalho, teve sua comercialização descontinuada pelo fabricante e substituída por um coquetel de micronutrientes com composição distinta, denominado Rexolin-CXK. O objetivo deste trabalho consistiu em avaliar o desempenho da microalga *C. sorokiniana* em meios de cultura formulados com outros coquetéis de micronutrientes comumente disponíveis no mercado, comparando-os com o meio padrão BG11 e o BGNIM proposto.

Materiais e métodos

Cepa microalga

A microalga *C. sorokiniana* Embrapa_LBA#39, isolada na Fazenda Chapada Imperial (Brasília, DF) e identificada por Hadi et al. (2016), foi a cepa escolhida para os estudos comparativos em diferentes meios de cultivo. Tal linhagem compõe a Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias (CMMAABio), da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) (Brasília, DF) e é preservada segundo os protocolos descritos por Fernandes et al. (2019).

Meios de cultivo

Quatro meios de cultivo foram utilizados a fim de avaliar o perfil de crescimento da cepa *C. sorokiniana* Embrapa_LBA#39. O meio padrão utilizado foi o *Blue Green* 11 (BG11), produzido a partir de reagentes com grau analítico. Os demais meios foram o BGNIM BRA, descrito por Ribeiro et al. (2020), e suas variações BGNIM CXK e BGNIM Fetrilon, os quais possuem a mesma composição de macronutrientes: 510 mg/L de ureia, 35 mg/L de fosfato monoamônico (MAP), 75 mg/L de sulfato de magnésio hepta-hidratado e 40 mg/L de nitrato de cálcio; e a mesma concentração de micronutrientes: 100 mg/L, sendo os micronutrientes de cada meio fertilizantes comerciais de diferentes marcas: Rexolin-BRA, YaraTera, Brasil (produto descontinuado pela empresa); Rexolin-CXK, YaraTera, Brasil (substituto do Bra) e Fetrilon Comb 1, Compo Expert, Brasil; respectivamente.

Experimentos

A microalga *C. sorokiniana* Embrapa_LBA#39 foi cultivada nos fotobiorreatores automatizados descritos por Ribeiro et al. (2020), os quais são compostos, resumidamente, por três frascos de vidro Duran GL80 com volume de 1 L, sendo que cada um deles contém, individualmente, agitador magnético, painel de LED, sensores de luz, temperatura, pH e oxigênio dissolvido.

Foram conduzidos quatro experimentos distintos, um para cada meio de cultivo, tendo sido cada experimento realizado em triplicata, adotando-se as seguintes condições: fotoperíodo de 12 horas claro/12 horas escuro, temperatura de 24 ± 1 °C, aeração 2 L/min de ar atmosférico contendo 0,1% (v/v) de CO₂ (1.000 ppm). A concentração inicial dos inóculos foi em média 1×10^5 células/mL. O pH de todos os meios foi ajustado para 7,0. Os experimentos foram conduzidos por 21 dias, e os parâmetros foram monitorados a cada 1 hora.

Após o 21º dia, os cultivos de cada biorreator foram centrifugados separadamente a 10.000 x g por 5 min. O sobrenadante foi descartado, os pellets foram congelados utilizando-se

nitrogênio líquido e liofilizados por 48 horas para obtenção da biomassa seca. O conteúdo foi, em seguida, pesado com auxílio de uma balança de precisão, a fim de calcular a produção de biomassa algal em cada meio de cultivo.

Análise estatística

A análise estatística dos resultados obtidos foi feita por meio de análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Tukey, utilizando-se o *software* GraphPad Prism® 4.0 (San Diego, CA, USA), sendo o nível de significância fixado em $p < 0,05$. Os dados foram apresentados em média \pm desvio padrão ($n = 3$).

Resultados e discussão

A linhagem de *C. sorokiniana* foi capaz de crescer em todos os meios de cultivos testados (Figura 1). Análises estatísticas, calculadas no 21º dia de experimento, evidenciaram que não houve diferença significativa no crescimento, em células/mL, de *C. sorokiniana* nos meios BRA e CXK, o que indica que o fertilizante Rexolin-CXK, mesmo apresentando porcentagens diferentes de compostos químicos, é um bom substituto para o Rexolin-BRA, o qual foi descontinuado pelo fabricante (Tabela 1). Tanto o crescimento em meio BG11 quanto em Fetrilon apresentaram diferenças significativas entre si e em relação aos demais meios. O meio Fetrilon apresentou maior crescimento.

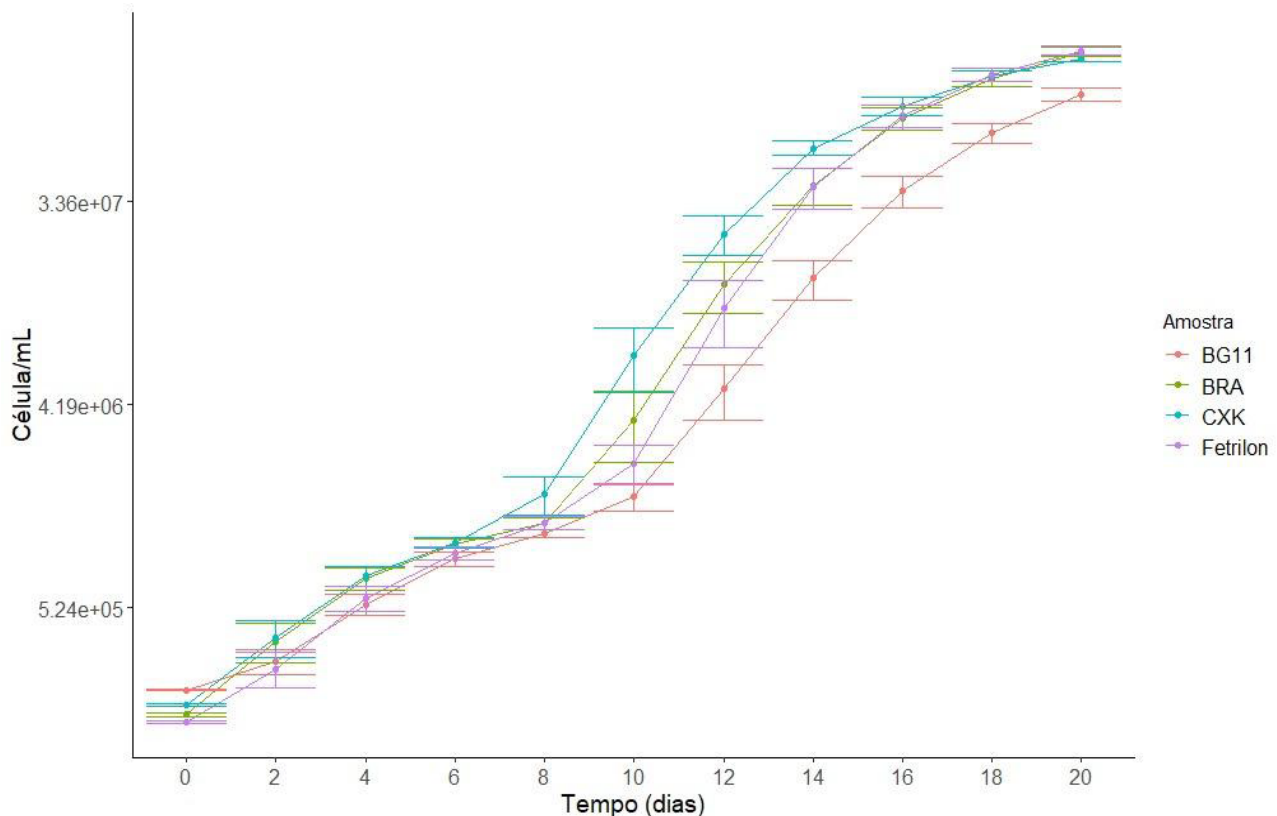


Figura 1. Curva de crescimento *Chlorella sorokiniana* em meios BG11, BRA, CXK e Fetrilon.

Em se tratando de produtividade de *C. sorokiniana*, as biomassas secas médias obtidas nos meios BG11, BRA, CXK e Fetrilon foram de 0,860 g; 0,588 g; 0,630 g e 1,030 g, respectivamente. Tais dados demonstram que a cepa de *C. sorokiniana* apresentou uma maior produtividade no Fetrilon, seguida do meio BG11. Análises estatísticas corroboram com os resultados obtidos no crescimento em células/mL, evidenciando diferença significativa na produtividade tanto no BG11 quanto no

Fetrilon em relação aos demais meios. Não houve diferença significativa entre a produtividade dos meios BRA e CXK (Figura 2).

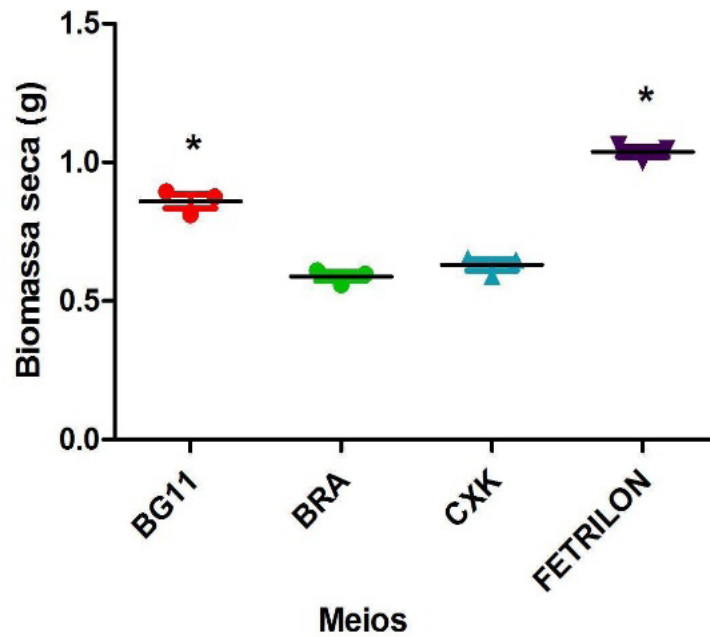


Figura 2. Produtividade algal, em g, obtida no 21º dia de cultivo de *Chlorella sorokiniana* em meios BG11, BRA, CXK e Fetrilon. * indica diferença significativa.

Os resultados relativos ao pH demonstraram que nos três tipos de BGNIM houve, nos primeiros dias de experimento, uma queda de pH, sendo a do meio BRA mais discreta (pH 5,5) e a do Fetrilon mais acentuada (pH 3,2). Após, em média, 10 dias de experimento, a faixa de pH neutro foi restabelecida (Figura 3).

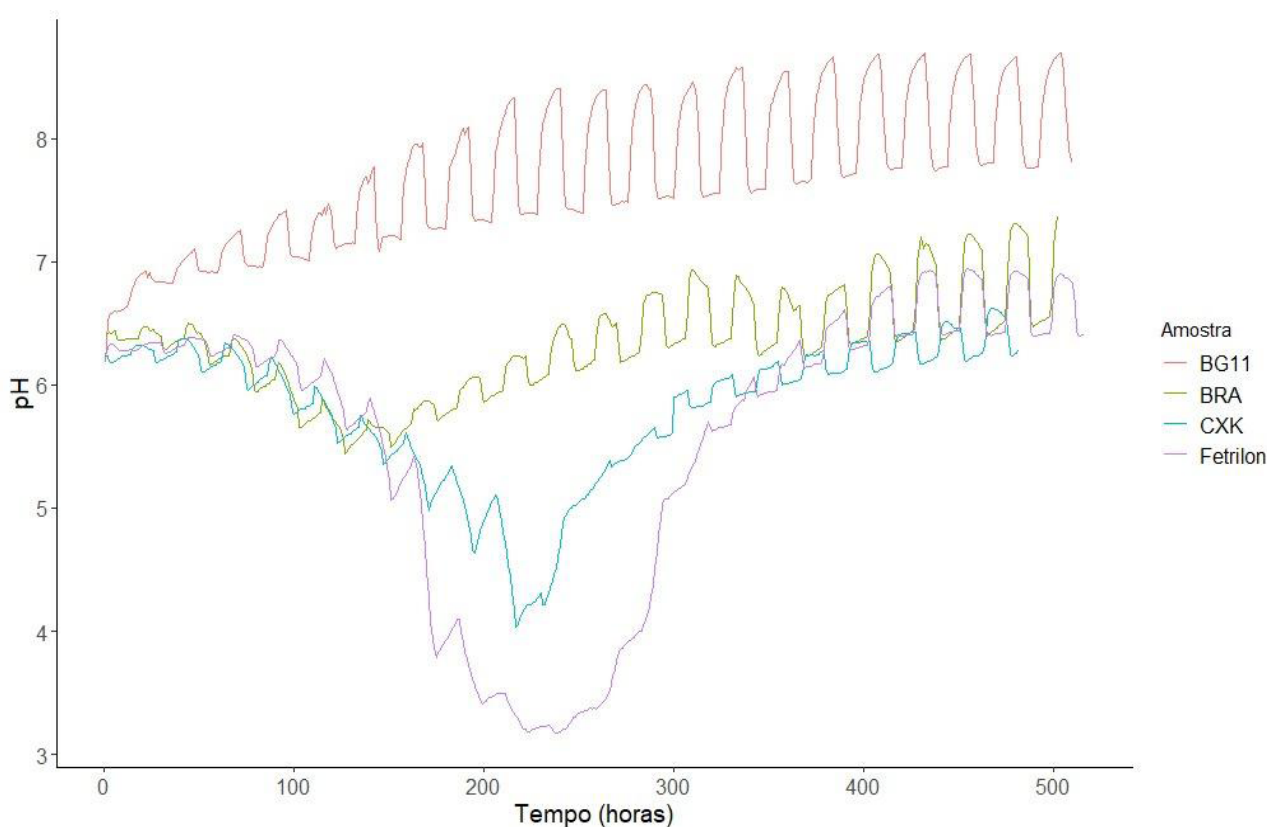


Figura 3. Dinâmica do pH ao longo de 21 dias de cultivo de *Chlorella sorokiniana* em meios BG11, BRA, CXK e Fetrilon.

Assim como em Ribeiro et al. (2020), a redução de pH momentânea não interferiu no crescimento de *C. sorokiniana*, o que sugere uma tolerância dessas microalgas em relação a variações no pH. Tal característica se mostra vantajosa, em se tratando do controle de qualidade em processos de larga escala, uma vez que muitos microrganismos que causam a contaminação do cultivo não resistem à acidificação do meio (Ashraf et al., 2011).

Por fim, os meios CXK e, principalmente, o Fetrilon se mostraram promissores para a viabilização da produção de biomassa de *C. sorokiniana* se tornar competitiva e lucrativa. Assim como o meio BRA (Ribeiro et al., 2020), tais meios são cerca de 95% mais baratos que o meio padrão BG11.

Conclusão

Neste estudo, foram propostos dois novos meios de cultivo, BGNIM CXK e BGNIM Fetrilon, com potencial significativo de reduzir o custo de produção de microalgas, além de esses meios terem sido comparados ao BG11 e ao BGNIM BRA, já descrito na literatura (Ribeiro et al., 2020). A produtividade de *C. sorokiniana*, em g, cultivada em BGNIM Fetrilon foi, inclusive, superior ao meio padrão BG11, amplamente utilizado. Já o BGNIM CXK apresentou produtividade semelhante ao meio BGNIM BRA. Mais estudos se mostram necessários, a fim de avaliar a existência de diferenças na composição bioquímica das biomassas coletadas.

Referências bibliográficas

ASHRAF, M.; JAVAID, M.; RASHID, T.; AYUB, M.; ZAFAR, A.; ALI, S.; NAEEM, M. Replacement of expensive pure nutritive media with low cost commercial fertilizers for mass culture of freshwater algae, *Chlorella vulgaris*. *International Journal of Agriculture & Biology*, v.13, p. 484–490, 2011.

- CHEN, J.; LI, J.; DONG, W.; ZHANG, X.; TYAGI, R. D.; DROGUI, P.; SURAMPALLI, R. Y. The potential of microalgae in biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 90, p. 336-346, 2018.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 126-131, 2008.
- FERNANDES, M. S.; CALSING, L. C. G.; NASCIMENTO, R. C.; SANTANA, H.; MORAIS, P. B.; DE CAPDEVILLE, G.; BRASIL, B. S. A. F. Customized cryopreservation protocols for chlorophytes based on cell morphology. **Algal Research**, v.38, 101402, 2019.
- FONTENELLE, M. R.; LIMA, C. E. P.; BONFIM, C. A.; ZANDONADI, D. B.; BRAGA, M. B.; PILON, L.; MACHADO, E. R.; RESENDE, F. V. **Biofertilizante Hortbio®**: propriedades agronômicas e instruções para o uso. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2017. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica, 162).
- GATAMANENI LOGANATHAN, B.; ORSAT, V.; LEFSRUD, M. Utilizing the microalgal biomass of *Chlorella variabilis* and *Scenedesmus obliquus* produced from the treatment of synthetic dairy wastewater as a biofertilizer. **Journal of Plant Nutrition**, v. 44, n. 10, p. 1486-1497, 2020.
- HADI, S. I. A.; SANTANA, H.; BRUNALE, P. P. M.; GOMES, T. G.; OLIVEIRA, M. D.; MATTHIENSEN, A.; OLIVEIRA, M. E. C.; SILVA, F. C. P.; BRASIL, B. S. A. F. DNA barcoding green microalgae isolated from Neotropical inland waters. **PLOS ONE**, v.11, n.2, e0149284, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149284>.
- HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GHIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, v.54, n.4, p.621-639, 2008.
- LEE, S. Y.; CHO, J. M.; CHANG, Y. K.; OH, Y.-K. Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: a review. **Bioresource Technology**, v. 244, pt. 2, p. 1317-1328, 2017.
- MOROCHO-JÁCOME, A. L.; RUSCINC, N.; MARTINEZ, R. M.; DE CARVALHO, J. C. M., SANTOS DE ALMEIDA, T.; ROSADO, C.; COSTA, J. G.; VELASCO, M. V. R.; BABY, A. R. (Bio)Technological aspects of microalgae pigments for cosmetics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, n. 22, p. 9513-9522, 2020.
- RIBEIRO, D. M.; RONCARATTI, L. F.; POSSA, G. C.; GARCIA, L. C.; CANÇADO, L. J.; WILLIAMS, T. C. R.; DOS SANTOS ALVES FIGUEIREDO BRASIL, B. A low-cost approach for *Chlorella sorokiniana* production through combined use of urea, ammonia and nitrate based fertilizers. **Bioresource Technology Reports**, v. 9, 2020. Article 100354.
- SARAL, J. S.; AJMAL, R. S.; RANGANATHAN, P. Bioeconomy of hydrocarbon biorefinery processes. In: MAITY, S. K.; GAYEN, K.; BHOWMICK, T. K. (Ed.). **Hydrocarbon biorefinery**. [S.l.]: Elsevier, 2022. p. 335-385.
- VANDAMME, D. **Flocculation based harvesting processes for microalgae biomass production**. Dissertation (Bioscience Engineering) - Faculty of Bioscience Engineering, Kortrijk, Belgium, 2013.