

CRESCIMENTO DE *Phaeodactylum tricornutum* E *Chaetoceros gracilis* EM CULTIVO AUTOTRÓFICO E MIXOTRÓFICO

PALUDO, Michele P.¹; MENESTRINO, Bruno da C.¹; BURKERT, Carlos André V.²

¹Universidade Federal do Rio Grande. Escola de Química e Alimentos. Laboratório de Engenharia de Bioprocessos. Rua Engenheiro Alfredo Huch, 475. Caixa postal 474. CEP: 96201-900. Rio Grande. Rio Grande do Sul. Brasil. E-mail: michepaludo@gmail.com

²Universidade Federal do Rio Grande. Laboratório de Engenharia de Bioprocessos. E-mail: burkert@vetorial.net

1. INTRODUÇÃO

O biodiesel é obtido a partir da reação de transesterificação de triacilgliceróis com álcoois (etanol ou metanol) em presença de catalisadores, resultando em três moléculas de ésteres metílicos ou etílicos dos ácidos graxos (biodiesel) e uma molécula de glicerol (MOTA et al., 2009). De modo geral, a cada 100 kg de biodiesel produzido 10 kg correspondem a glicerol (KOLESÁROVÁ et al., 2011).

O glicerol bruto obtido da produção do biodiesel é composto aproximadamente por 50-60% de glicerol (KOLESÁROVÁ et al., 2011), além de uma grande quantidade de impurezas como metanol, sabões, traços de sódio, cálcio, potássio, entre outros (ETHIER, 2010). A presença de tais compostos eleva os custos de purificação do glicerol, restringindo sua utilização na indústria química, farmacêutica e alimentícia, tornando-o, assim, uma fonte de carbono atrativa para o cultivo microbiano. O glicerol bruto contém cerca de 24 - 37,7% de carbono, podendo estes valores variar em função da fonte utilizada na obtenção do biodiesel (KOLESÁROVÁ et al., 2011). Portanto, a fim de evitar futuros problemas derivados do acúmulo de glicerol e tornar a produção de biodiesel economicamente viável, torna-se necessário alternativas para o uso do glicerol, abrindo um novo leque para pesquisas (CHÁVEZ, 2008).

Assim, uma alternativa promissora é a utilização do glicerol no cultivo mixotrófico de microalgas, resultando em produtos de maior valor agregado, como biomassa. O cultivo mixotrófico utiliza simultaneamente energia luminosa e um substrato orgânico como fontes de carbono (GARCIA et al., 2000). Além do glicerol, estudos têm relatado o emprego de melaço, manipueira e glicose como substratos orgânicos em cultivos mixotróficos de microalgas.

Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi avaliar a influência do glicerol no crescimento das diatomáceas *Phaeodactylum tricornutum* e *Chaetoceros gracilis*, comparando o cultivo mixotrófico e autotrófico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As diatomáceas *Phaeodactylum tricornutum* e *Chaetoceros gracilis* foram obtidas na Universidade Federal da Bahia (LABIOMAR – UFBA), e mantidas em fotobiorreatores, do tipo erlenmeyer de 1 L, contendo 900 mL do meio Conway (WALNE, 1966), com salinidade de 28, 24±1°C, irradiância de 3000 Lux, fotoperíodo integral e agitação constante através da injeção de ar estéril. Os fotobiorreatores foram dispostos em uma estufa com fotoperíodo (Eletrolab EL-202, Brasil).

Foram testados dois meios de cultivo: meio Conway, para o cultivo autotrófico; e meio Conway acrescido de glicerol (0,05M) para o cultivo

mixotrófico. A concentração inicial do inóculo para o experimento correspondeu a 10% do volume de meio. Os experimentos foram conduzidos em triplicata. Diariamente, alíquotas dos cultivos foram retiradas para determinações analíticas no sobrenadante (pH e concentração de glicerol) e no *pellet* (concentração de biomassa).

A concentração celular foi estimada por absorvância a 625 nm para *P. tricornutum* e 680 nm para *C.gracilis*, em espectrofotômetro (Biospectro SP-220, China). O pH foi determinado em potenciômetro digital (Marte MB – 10, Brasil). Nos cultivos mixotróficos, o consumo de glicerol foi acompanhado a partir de um *kit* enzimático-colorimétrico para triacilgliceróis (Labtest, Brasil).

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando o programa *Statistica 7.0*, a fim de verificar diferenças significativas em relação à presença ou ausência de glicerol no meio, a 95% de confiança ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Phaeodactylum tricornutum

A Figura 1 apresenta a curva de crescimento da microalga *P. tricornutum* em cultivo autotrófico e mixotrófico.

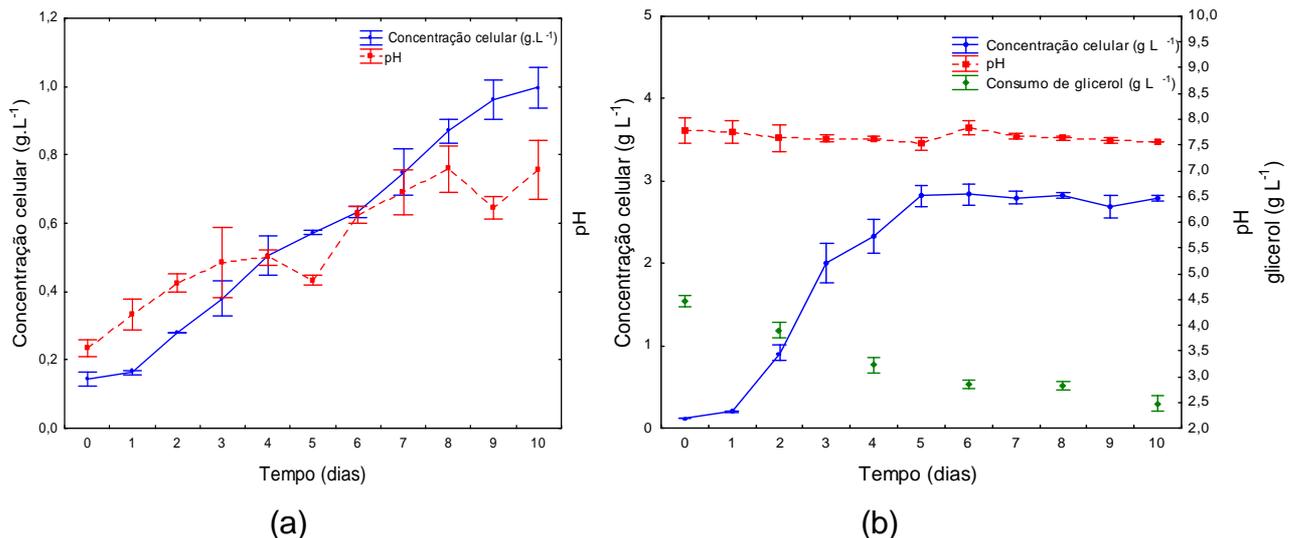


Figura 1 – (a) Curva de crescimento e pH do cultivo autotrófico; (b) Curva de crescimento, pH e consumo de glicerol do cultivo mixotrófico.

Conforme a Figura 1 é possível observar que a microalga apresentou concentração celular máxima de $0,96 \pm 0,06 \text{ g.L}^{-1}$ no cultivo autotrófico, em 9 dias de experimento. Enquanto que no cultivo mixotrófico a concentração celular máxima foi $2,82 \pm 0,13 \text{ g.L}^{-1}$, alcançada em 5 dias de cultivo. A maior concentração de biomassa do cultivo mixotrófico, provavelmente, esteja associada à presença simultânea de luz e do substrato orgânico (glicerol) (GARCIA et al., 2000). Pode-se ainda evidenciar a capacidade da microalga em assimilar o glicerol, correspondendo a um consumo de 44,6% do glicerol acrescido ao meio Conway.

Garcia et al. (2000) avaliaram o crescimento da microalga *P. tricornutum* em meio contendo 0,1 M de glicerol e obtiveram $2,4 \text{ g.L}^{-1}$ de concentração de biomassa. MORAIS et al. (2009) adicionaram 0,15 M de glicerol ao meio e alcançaram $1,3 \text{ g.L}^{-1}$ de concentração de biomassa.

Chaetoceros gracilis

A Figura 2 apresenta a curva de crescimento da microalga *C. gracilis* em cultivo autotrófico e mixotrófico.

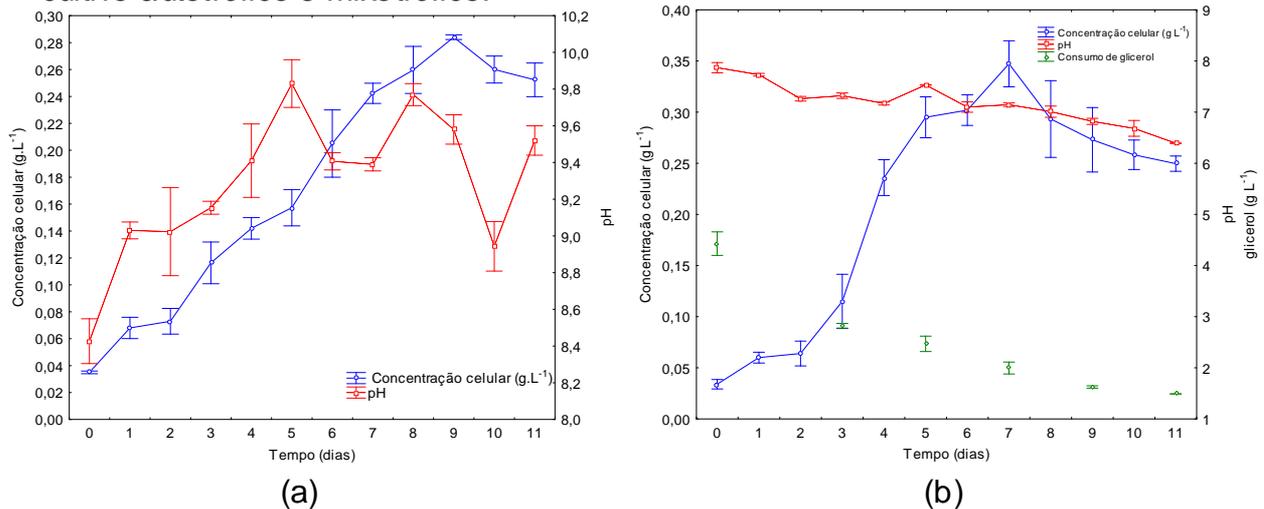


Figura 2 – (a) Curva de crescimento e pH do cultivo autotrófico; (b) Curva de crescimento, pH e consumo de glicerol do cultivo mixotrófico.

De acordo com a Figura 2, a máxima concentração celular do cultivo autotrófico foi de $0,28 \pm 0,002 \text{ g.L}^{-1}$, alcançada no 10º dia de cultivo. Enquanto que no cultivo mixotrófico foi de $0,35 \pm 0,022 \text{ g.L}^{-1}$ atingida em 8 dias de experimento. Além da maior produção de biomassa, observou-se no cultivo mixotrófico, que a microalga foi capaz de assimilar o glicerol do meio, consumindo cerca de 66,4% ao término do cultivo.

Trabalhos realizados com espécies da microalga *Chaetoceros* também apresentaram resposta favorável em cultivo mixotrófico. DERNER (2006) avaliou o crescimento e a composição bioquímica de *C. muelleri*, observou aumento da densidade celular da diatomácea em meio contendo dióxido de carbono. MOREIRA (2007), também avaliou o crescimento da diatomácea em meios de cultivo alternativos (extrato de esterco de gado e extrato de esterco de minhoca), e constatou uma maior produção de biomassa no cultivo mixotrófico quando comparado ao autotrófico.

A Tabela 1 apresenta a comparação entre o cultivo autotrófico e mixotrófico das microalgas *P. tricornutum* e *C. gracilis*, em relação aos parâmetros concentração celular máxima, velocidade específica máxima, produtividade e fator de conversão de substrato em biomassa.

Tabela 1: Médias \pm desvio padrão dos parâmetros avaliados e análise estatística dos dados*.

Parâmetros (média \pm desvio padrão)	Cultivo Autotrófico		Cultivo Mixotrófico	
	<i>Pt</i>	<i>Cg</i>	<i>Pt</i>	<i>Cg</i>
$X_{m\acute{a}x}$ (g.L^{-1})	$0,96 \pm 0,06^b$	$0,28 \pm 0,002^b$	$2,82 \pm 0,13^a$	$0,35 \pm 0,022^a$
Prod. ($\text{g.L}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$)	$0,10 \pm 0,001^b$	$0,03 \pm 0,0002^b$	$0,54 \pm 0,03^a$	$0,04 \pm 0,003^a$
$\mu_{m\acute{a}x}$ (dia^{-1})	$0,22 \pm 0,02^b$	$0,88 \pm 0,17^a$	$0,68 \pm 0,01^a$	$0,93 \pm 0,23^a$
$Y_{x/s}$ (g.g^{-1})	-	-	$1,68 \pm 0,06$	$0,09 \pm 0,014$

Pt – *Phaeodactylum tricornutum*; *Cg* – *Chaetoceros gracilis*; $X_{m\acute{a}x}$ - Concentração celular máxima; $\mu_{m\acute{a}x}$ - Velocidade específica máxima de crescimento; Prod – Produtividade; $Y_{x/s}$ – Fator de conversão de substrato em biomassa.

* Letras minúsculas iguais representam que não há diferenças significativas entre colunas a 95% de confiança ($p < 0,05$).

De acordo com a Tabela 1, observou-se que houve diferença significativa entre o cultivo autotrófico e o mixotrófico das duas diatomáceas, exceto para $\mu_{\text{máx}}$ da microalga *C. gracilis*, a qual não apresentou diferença significativa entre os cultivos. Ainda é possível notar que mesmo as microalgas pertencendo à mesma classe (diatomáceas) e cultivadas nas mesmas condições experimentais, cada uma apresenta um comportamento diferente quanto à presença de glicerol no meio. Assim, o glicerol influenciou positivamente no crescimento celular das microalgas *P. tricornutum* e *C. gracilis*.

4. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos, concluímos que as microalgas *P. tricornutum* e a *C. gracilis* possuem a capacidade de assimilar o glicerol como uma fonte de carbono, potencializando, assim, seu aproveitamento como um coproduto da produção do biodiesel.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHÁVEZ, J. D.R. **Aproveitamento biotecnológico do glicerol derivado da produção de biodiesel para a obtenção de biomassa e ribonucleotídeos.** 2008. 125f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Universidade de São Paulo.
- DERNER, R. B. **Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos polinsaturados.** 2006. 140f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.
- ETHIER, S. E. **Producing Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids from Biodiesel Waste Glycerol by Microalgae Fermentation.** 2010. 66f. Dissertação (Mestrado em Biological Systems Engineering) – Faculdade da Virginia, EUA.
- GARCIA, C. M. C.; SEVILLA, F. J. M.; FERNANDEZ, F. G. A.; GRIMA, E. M.; CAMACHO, F. G. Mixotrophic growth of *Phaeodactylum tricornutum* on glycerol: growth rate and fatty acid profile. **Journal of Applied Phycology**, Holanda, v. 12, p. 239–248, 2000.
- KOLESÁROVÁ, N.; HUTŇAN, M.; BODÍK, I.; SPALKOVÁ. Utilization of biodiesel by-products for biogás production. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, New York, v. 2011, p. 1-15, 2011.
- MORAIS, K. C. C.; RIBEIRO, R. L. L.; SANTOS, K. R.; TAHER, D. M.; MARIANO, A. B.; VARGAS, J. V. C. *Phaeodactylum tricornutum* microalgae growth rate in heterotrophic and mixotrophic conditions. **Thermal Engineering**, EUA, v. 8, p. 84-89, 2009.
- MOREIRA, E. V. **Crescimento e propriedades nutricionais de *Chaetoceros muelleri* LEMMERMAN para aquicultura: comparação entre diferentes meios de cultivo.** 2007. 63f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, Universidade Federal de Pernambuco.
- MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, Brasil, v. 32, n.3, p. 639-648, 2009.
- WALNE, P. R. Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. **Fishery Investigations**, London, v.25, n.4, p.1-53, 1966.
- Agradecimentos: CAPES, CNPq e PDE/FURG.