

UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS - UNISINOS
UNIDADE ACADÊMICA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA: CONSERVAÇÃO E
MANEJO DE ECOSISTEMAS E DE VIDA SILVESTRE
NÍVEL MESTRADO

JULIANA ELISA BOHNENBERGER

**COMO A MANIPULAÇÃO DA TEMPERATURA E DOS NUTRIENTES PODE
INFLUENCIAR NO TEOR DE LIPÍDIOS PRODUZIDOS EM CULTURAS DE
MICROALGAS DE ÁGUA DOCE?**

SÃO LEOPOLDO
2012

Juliana Elisa Bohnenberger

COMO A MANIPULAÇÃO DA TEMPERATURA E DOS NUTRIENTES PODE
INFLUENCIAR NO TEOR DE LIPÍDIOS PRODUZIDOS EM CULTURAS DE
MICROALGAS DE ÁGUA DOCE?

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, pelo Programa de Pós- Graduação em Biologia (Diversidade e Manejo de Vida Silvestre) da Universidade do Vale do Rio dos Sinos – UNISINOS.

Orientadora: Dra. Luciane Oliveira
Crossetti

Ficha Catalográfica

B677c

Bohnenberger, Juliana Elisa.

Como a manipulação da temperatura e dos nutrientes pode influenciar no teor de lipídios produzidos em culturas de microalgas de água doce?./ Juliana Elisa Bohnenberger. – 2012.

36 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Programa de Pós-Graduação em Biologia, 2012.

"Orientadora: Dra. Luciane Oliveira Crossetti."

1. Biomassa energética. 2. *Monoraphidium* 3. *Chlorella*.
4. *Desmodesmus*. 5. *Microcystis*. I. Título.


CDU 57

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Bibliotecário: Flávio Nunes – CRB 10/1298)

UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS – UNISINOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
Área de Concentração: Diversidade e Manejo de Vida Silvestre

A dissertação intitulada '**Como a manipulação da temperatura e dos nutrientes pode influenciar no teor de lipídios produzidos em culturas de microalgas de água doce?**', elaborada por Juliana Elisa Bohnenberger, foi julgada adequada e aprovada por todos os membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de MESTRE EM BIOLOGIA, com área de concentração: Diversidade e Manejo de Vida Silvestre.

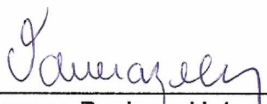
Membros da Banca Examinadora da Dissertação:



Profa. Dra. Luciane Oliveira Crossetti, orientadora - Universidade do Vale do Rio dos Sinos.



Profa. Dra. Lúcia Helena Ribeiro Rodrigues - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



Profa. Dra. Vanessa Becker - Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

A todos que de alguma forma se preocupam e contribuem para a utilização sustentável dos recursos naturais.

AGRADECIMENTO

Meus mais sinceros agradecimentos a todas as pessoas que de alguma forma ajudaram-me nesses dois anos. Foi um grande desafio, por ser uma área na qual ainda não havia trabalhado, mas que me apaixonei e pretendo continuar aprendendo cada vez mais. Gostaria de agradecer especialmente:

Ao CNPq pelo apoio financeiro e bolsa de estudo concedida, pois sem isto o projeto não poderia ter sido realizado (processo 550280/2010-3).

A Universidade do Vale do Rio dos Sinos pela estrutura disponibilizada.

À professora Doutora Luciane Oliveira Crossetti pelo carinho, paciência, dedicação e comprometimento na orientação deste estudo, além dos ensinamentos compartilhados, que foram muitos e de grande valia. Agradeço, também, por sempre acreditar em mim, principalmente nos momentos das dúvidas, dificuldades e desesperanças.

Às minhas colegas do laboratório de Ecofisiologia e Cultura Vegetal: Andressa Wieliczko, Denise Peresin, Gisele Ribeiro, Jaiana Malabarba, Claudia Gelatti, Mariane Brizolla, Tiziane Horbach e Lacina Maria Freitas Teixeira, que destinaram grande parte do seu tempo a me ajudar, sempre com muito carinho e compreensão. Especialmente a Andressa, Denise, Gisele e Jaiana, que acompanharam estes dois anos de aprendizado comigo, sempre me auxiliando no que fosse preciso.

Ao colega Igor Radamés de Oliveira, nosso laboratorista, pela sua contribuição científica e acadêmica, imprescindível à realização deste trabalho, bem como pela paciência despendida em momentos difíceis.

À professora Dra. Maria Carolina Soares da Universidade Federal de Juiz de Fora pela gentileza da doação da cepa LEA-04, utilizada neste estudo.

À Ana Paula Testa e Cibele Pinz Müller, laboratoristas de Apoio ao Ensino da Engenharia de Alimentos da Unisinos, pelo empréstimo da câmara incubadora BOD e dos materiais necessários para a realização dos experimentos.

Ao Guilherme Cauduro pela ajuda ao carregar os materiais, meios de cultura e reagentes de um laboratório a outro e pelas demais gentilezas prestadas.

À professora Suzane Both Hilgert Moreira pelo carinho e incentivo nas horas difíceis.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Unisinos pela maravilhosa vivência acadêmica e conhecimentos compartilhados,

especialmente ao professor Doutor Luiz Fernando Medina pelo empréstimo da estufa, a professora Doutora Cristina Stenert e aos colegas Arthur Ávila, Ana Rolon e Lucas Krüeger pela ajuda com as análises estatísticas.

À Fernanda Fraga, secretária do PPG – Biologia, por toda ajuda burocrática necessária à realização plena do curso. Agradeço, também, por sua competência, gentileza e compreensão todas às vezes que precisei de ajuda.

A minha amiga Paula Peixoto Vieira uma das grandes responsáveis pelo incentivo de eu cursar o Mestrado. Muito obrigada pelo carinho, amizade verdadeira e por estar presente em todos os momentos da minha vida acadêmica, desde as “indiadas” da Graduação até hoje.

A minha também amiga Aparecida Basler, pelo companheirismo desde o primeiro dia no curso. Cheguei somente na terceira aula da primeira disciplina que havia me inscrito, estava totalmente insegura e perdida e você me estendeu a mão e nunca mais largou. Obrigada pelo auxílio, idéias trocadas, carinho e amizade verdadeira.

Ao professor Doutor Victor Hugo Valiati, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Unisinos, por ter acreditado em mim, pelas gentilezas concedidas e pela oportunidade de ter conhecido a professora Luciane. Sem você nada teria acontecido. Muito obrigada por tudo.

Ao Rodrigo Bitencourt, meu companheiro de todas as horas, pelo incentivo, amor, carinho, compreensão, por sempre acreditar no meu potencial. Não posso esquecer-me de agradecer por todas às vezes que me esperou acordado até que eu fosse dormir, preocupado por eu ter que acordar cedo e dormir pouco. As noites em que teve que acordar de madrugada para me levar ao aeroporto. Por me esperar com uma flor todas às vezes que eu voltava de viagem. Nossa são tantos agradecimentos que com certeza devo ter esquecido algum. Desculpe se em algum momento faltei contigo e muito obrigada por tudo meu amor.

Ao meu irmão Júlio César Bohnenberger pela contribuição acadêmica, amor, carinho e por sempre torcer por mim.

Às minhas dindas Nivia e Silvia Bohnenberger pelo amor incondicional.

Aos meus sogros Rubens e Maria Cristina Bitencourt, por toda ajuda prestada.

E, finalmente, aos meus pais que já não estão mais aqui, pelo incentivo do estudo e amor incondicional. Tenho certeza que estão felizes por mim.

“Eu sou a minha cidade, e só eu posso mudá-la. Mesmo com o coração sem esperança, mesmo sem saber exatamente como dar o primeiro passo, mesmo achando que um esforço individual não serve para nada, preciso colocar mãos à obra. O caminho irá se mostrar por si mesmo, se eu vencer meus medos e aceitar um fato muito simples: cada um de nós faz uma grande diferença no mundo.”

Paulo Coelho

COMO A MANIPULAÇÃO DA TEMPERATURA E DOS NUTRIENTES PODE INFLUENCIAR NO TEOR DE LIPÍDIOS PRODUZIDOS EM CULTURAS DE MICROALGAS DE ÁGUA DOCE?

RESUMO

Atualmente, há uma necessidade crescente pela busca por alternativas viáveis energeticamente, de baixo custo e sustentáveis que substituam o uso de combustíveis fósseis. Uma opção é a produção de biomassa energética através de microalgas, considerada uma alternativa limpa em relação a outras que demandam amplas áreas para cultivo e são geradoras de impactos ambientais. Nesse contexto, a pesquisa teve como objetivo avaliar a influência da temperatura e nutrientes no teor de lipídios de culturas de espécies de microalgas de água doce, visando o uso destes lipídios para a produção de biodiesel. Para isso, duas cepas de *Monoraphidium contortum*, uma cepa contendo as espécies de *Chlorella vulgaris* e *Desmodesmus quadricauda* e outra de *Microcystis aeruginosa*, foram mantidas em laboratório, por seis dias, em cinco meios de cultura ASM-1 modificados (controle com altas concentrações de fosfato e nitrato; sem fosfato; com concentração intermediária não limitante de fosfato; sem nitrato; e o último com concentração intermediária não limitante de nitrato). Posteriormente, foram submetidas às temperaturas de 13 °C, 25 °C (controle) e 37 °C, durante oito dias (n=3). A extração dos lipídios foi realizada no 1º, 4º e 8º dias de experimento, seguindo metodologia comumente utilizada, através de solventes *a frio*, com a mistura de metanol e clorofórmio. Não foi observada variação lipídica significativa entre as cepas ($p > 0,05$). Em média, as maiores produções lipídicas totais foram observadas quando as cepas foram mantidas em 13 °C e no meio com concentração intermediária não limitante de nitrato. Foi encontrada variação significativa no percentual lipídico total em relação ao fator dia em que foi realizada a extração ($p < 0,05$). O percentual lipídico variou em função da concentração de biomassa algal ($p < 0,05$). A cepa de *Microcystis aeruginosa* obteve altos teores lipídicos totais, quando mantida em meio de cultura com alteração das concentrações de nitrato e fosfato, contrariando os resultados encontrados na literatura. As cepas testadas podem ser consideradas como potenciais produtoras de lipídios, desde que o meio de cultura, a temperatura e o dia de extração lipídica sejam corretamente estabelecidos. Este estudo mostrou que manipulações de fatores determinantes podem induzir maior concentração lipídica, otimizando a produção total com vistas à utilização desta matéria-prima para o biodiesel.

Palavras-chave: Biomassa energética · *Monoraphidium* · *Chlorella* · *Desmodesmus* · *Microcystis*.

HOW THE MANIPULATION OF TEMPERATURE AND NUTRIENT CONTENT MAY INFLUENCE THE LIPIDS PRODUCTION IN FRESHWATER MICROALGAE CULTURES?

ABSTRACT

Currently, there is a growing need for the search of viable alternative energy, affordable and sustainable substitute for fossil fuels. One option is the production of energetic biomass by microalgae, which is considered a clean alternative compared to others that require large areas for cultivation and that generate environmental impacts. In this context, the research aimed to evaluate the influence of temperature and nutrients on lipid content of cultured species of freshwater microalgae, in order to use these lipids for biodiesel production. For this purpose, two strains of *Monoraphidium contortum*, a strain containing *Chlorella vulgaris* and *Desmodesmus quadricauda* and other of *Microcystis aeruginosa*, were maintained in the laboratory for six days, in five culture media, modified ASM-1 (control, with high concentrations of phosphate and nitrate; P-deficient; non-limiting concentration of phosphate; N-deficient; non-limiting nitrate). Later, they were exposed to temperatures of 13 ° C, 25 ° C (control) and 37 ° C for eight days (n = 3). The lipid extraction was performed on the 1st, 4th and 8th day of the experiment following the method commonly used with cold solvent (a mixture of methanol and chloroform). There was no significant lipid variation among strains ($p > 0.05$). On average, the highest total lipid yields were observed when the strains were maintained at 13 ° C and in the medium with intermediate concentration and non-limiting nitrate. We found significant variation in total lipid percentage in relation to day that the extraction was performed ($p < 0.05$). The lipid percentage varied depending on the concentration of algal biomass ($p < 0.05$). The strain of *Microcystis aeruginosa* showed high total lipid content, when maintained in culture medium with abnormal concentrations of nitrate and phosphate, contrary to the literature data. The strains can be considered as potential lipid producers since the culture medium, the temperature and the time for extraction of lipids are correctly established. This study showed that manipulations of determining factors might induce higher lipid concentration, optimizing the total production in order to use this raw material for biodiesel.

Keywords: Energetic biomass · *Monoraphidium* · *Chlorella* · *Desmodesmus* · *Microcystis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Fig. 1** Concentração de biomassa algal obtida na cepa LECV-1 nos meios de cultura e temperaturas as quais foi submetida ao longo do experimento..... 20
- Fig. 2** Comparação da média geral dos percentuais lipídicos totais encontrados na cepa LECV-1 quando da interação entre os fatores temperatura e nutrientes..... 21
- Fig. 3** Concentração de biomassa algal obtida na cepa LECV-2 nos meios de cultura e temperaturas as quais foi submetida ao longo do experimento..... 22
- Fig. 4** Comparação da média geral dos percentuais de lipídios totais encontrados na cepa LECV-2 quando da interação entre os fatores temperatura e nutrientes. 23
- Fig. 5** Concentração de biomassa algal obtida na cepa LECV-3 nos meios de cultura e temperaturas as quais foi submetida ao longo do experimento..... 24
- Fig. 6** Comparação da média geral dos percentuais de lipídios totais encontrados na cepa LECV-3 quando da interação entre os fatores temperatura e nutrientes. 25
- Fig. 7** Concentração de biomassa algal obtida na cepa LEA-04 nos meios de cultura e temperaturas as quais foi submetida ao longo do experimento..... 25
- Fig. 8** Comparação da média geral dos percentuais de lipídios totais encontrados na cepa LEA-04 quando da interação entre os fatores temperatura e nutrientes..... 26
- Fig. 9** Relação da variação do percentual lipídico em função da biomassa algal encontrada nas cepas testadas. a) LECV-1; b) LECV-2; c) LECV-3; d) LEA-04..... 29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Características das cepas.	18
Tabela 2 Constituição dos meios de cultura ASM-1 modificados utilizados, com relação as concentrações de fosfato e nitrato.	19
Tabela 3 Média e desvio padrão, respectivamente, relativos ao percentual de lipídios (%) encontrado nas cepas LECV-1, LECV-2, LECV-3 e LEA-04 para cada dia em que foi realizada a extração, nas temperaturas e meios de cultura as quais foram submetidas (n=3).	28

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	15
MATERIAL E MÉTODOS.....	17
Manutenção das cepas	18
Experimento de temperatura e nutrientes	18
Análise dos dados	19
RESULTADOS	20
Cepa LECV-1.....	20
Cepa LECV-2.....	22
Cepa LECV-3.....	23
Cepa LEA-04	25
Relação do percentual lipídico e biomassa	26
DISCUSSÃO	29
CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

COMO A MANIPULAÇÃO DA TEMPERATURA E DOS NUTRIENTES PODE INFLUENCIAR NO TEOR DE LIPÍDIOS PRODUZIDOS EM CULTURAS DE MICROALGAS DE ÁGUA DOCE?¹

¹ Trabalho formatado preliminarmente segundo normas da Revista Applied Microbiology and Biotechnology

Introdução

O uso extensivo de combustíveis fósseis como matéria-prima é atualmente tido como insustentável devido à sua finitude e ao acúmulo de gás carbônico no ambiente (Plá 2002; Borges et al. 2007; Walker 2009; Goldemberg 2009). Surge, então, a necessidade de opções efetivas que substituam o amplo uso desses combustíveis por alternativas viáveis, renováveis, limpas, de baixo custo e sustentáveis. Mas isso vem aderido a soluções energéticas que possam ser desenvolvidas com investimento modesto de capital, que possam gerenciar demandas competitivas de produção de alimentos e de preservação ambiental (Goldemberg 2009).

Diversas matérias-primas já foram testadas, como o milho, soja, canola, óleo de dendê, cana de açúcar, dentre outros (Chisti 2007a; Cheng et al. 2009). Entretanto, estas culturas necessitam de extensas áreas territoriais de plantio para se alcançar quantidade significativa de biomassa para produção do combustível, o que converte na redução de áreas de lavoura para subsistência e geração de alimento.

Frente a estas dificuldades, as microalgas surgem como uma excelente opção. São organismos fotossintetizantes muito simples, unicelulares, que já foram identificados como sendo uma alternativa sustentável na busca de matérias-primas para produção de combustível alternativo (Smith et al., 2009; Huang et al., 2010; Mata et al., 2010). Não diferentemente dos outros vegetais, têm a luz como fator primário para sobrevivência e convertem, através da fotossíntese, dióxido de carbono em potenciais biocombustíveis (Chisti 2007a). Apresentam curto ciclo de vida, e conseguem duplicar sua biomassa em 24h, em condições nutricionais adequadas, onde nitrogênio e fósforo estão entre os recursos mais importantes (Haag 2007). Isso permite que alíquotas das culturas sejam retiradas diariamente e utilizadas para a extração dos lipídios.

A ideia do uso das microalgas, tanto marinhas como de água doce, como fonte alternativa de energia não é nova, sendo que estudos na década de 80 já indicavam este grupo como portador de propriedades lipídicas importantes (Chisti 2007a). Recentemente, estudos em diversas partes do mundo têm demonstrado as principais vantagens e desvantagens do seu uso como fontes de energia (Brennan & Owende 2010). A rápida duplicação e alto percentual de óleo presentes em muitas espécies de algas, chegando a atingir cerca de 80% da sua biomassa, são algumas das vantagens já mencionadas em diversos estudos (Chisti 2007a; Harwood & Guschina 2009; Spalatore et al. 2006). Ainda, ao contrário de outras plantas, não necessitam de grandes áreas para cultivo, pois se desenvolvem tanto em ambientes naturais (lagos, lagoas, oceanos) como artificiais (laboratórios). Além disso, podem ser até 20 vezes mais produtivas por

unidade de área do que as melhores culturas oleaginosas (Chisti 2007). Todavia, o cultivo laboratorial em grande escala demanda altos custos, uma vez que são necessárias condições controladas de luz, dióxido de carbono e nutrientes, principalmente quanto à quantidade de nitrogênio presente no meio de cultura, responsável, este, pela formação de lipídios. Isto é uma das poucas desvantagens ao uso destes organismos.

O número de estudos enfocando o uso das microalgas como fonte de energia cresceu nos últimos anos, mas ainda pouco se sabe sobre as espécies ideais. De qualquer forma, tanto investimento para geração de biomassa em grandes quantidades necessita de pesquisas que forneçam informações básicas sobre os ótimos ecológicos das diferentes espécies de algas. Diversos estudos têm apresentado listas com reduzido número de táxons e suas respectivas composições lipídicas (Guschina & Harwood 2006; Costa & Radmann 2008; Khan et al. 2009; Brennan & Owende 2010). A partir de uma revisão bibliográfica, Griffiths & Harrison (2009) sumarizaram uma listagem de espécies de microalgas que vêm sendo testadas como matéria-prima na produção de biodiesel. Ademais, existe a necessidade de identificarem-se os possíveis fatores bioquímicos e ambientais que acelerem e favoreçam o acúmulo de óleo (Chisti 2007a), pois existem diferenças na biossíntese dos ácidos graxos pelas algas, inclusive, entre cepas de uma mesma espécie (Aquarone et al. 1983); o que demonstra que adequadas condições de cultivo são muito importantes para a síntese de gorduras, pois se desviando o metabolismo biossintético para a lipossíntese, através de modificações nas condições de cultivo, obtêm-se as gorduras como constituinte principal em lugar das proteínas (Aquarone et al. 1983). Ou seja, com a manipulação da temperatura e da composição química do meio de cultura é possível obter maior produtividade de lipídios (Behrens & Kyle 1996).

Alguns estudos demonstraram que a manipulação nas condições de cultivo, tais como nutrientes, temperatura, intensidade luminosa, duração da cultura (tempo de cultura) podem afetar a produtividade de lipídios significativamente (Mandal & Mallick 2009). Illman et al. (2000) mostraram que a deficiência de nitrogênio influenciou o cultivo de *Chlorella*, aumentando seu conteúdo lipídico em 63%. Assim como a limitação de fosfato também parece estimular a acumulação de lipídios, consoante encontrado por Rhee (1978), onde o teor lipídico foi maior quando o fosfato estava indisponível. Porém, a maioria dos estudos realizados demonstrou que a deficiência de nitrato produz maior percentual lipídico do que a deficiência de fosfato (Illman et al. 2000; Mandal & Mallick 2009; Feng et al. 2012). Em relação à temperatura, foi observado por Paoletti et al. (1980) que a variação de 30 °C para 42 °C, ou seja, de doze

graus, promoveu um aumento de 7,4% para 11,5% no conteúdo de lipídios da cianobactéria *Spirulina maxima*.

No Brasil, estudos científicos utilizando as microalgas de água doce com vistas à produção energética ainda são escassos, sendo possível dar destaque aos estudos com microalgas marinhas (Borges et al. 2007; Morais & Costa 2008). Diante deste contexto, fica evidente a necessidade de pesquisas nacionais nesta área, a fim de maximizar o uso da biomassa algal como matéria-prima na produção de biocombustíveis, visando tanto o sucesso orçamentário e energético quanto o social.

Diante do pouquíssimo conhecimento acerca da fisiologia de muitas espécies de algas potencialmente utilizadas para fins energéticos, uma boa escolha são as microalgas cosmopolitas, de fácil cultivo e comumente encontradas nas amostragens de material do plâncton, como as da classe Chlorophyceae. As algas do gênero *Chlorella* têm sido consideradas candidatas promissoras para produção comercial de biodiesel, uma vez que a taxa de crescimento e de conteúdo de lipídios de muitas estirpes demonstram alcançar um nível elevado. Além disso, o conhecimento acumulado e a experiência em cultivos deste gênero podem ser úteis na produção de biocombustíveis (Feng et al. 2012). As diatomáceas também têm sido muito utilizadas para fins energéticos, ganhando destaque em função de seus altos percentuais lipídicos (Shiflin & Chisholm 1981; Smith et al. 2009; Mata et al. 2010). Em comparação, as cianobactérias não têm sido muito utilizadas nesse contexto, embora possuam potencial elevado de produção de biomassa (florações) que trazem inúmeros problemas especialmente em reservatórios de abastecimento de água. Por isso, se algas deste grupo forem comprovadas como eficientes na produção de lipídios, a biomassa algal gerada “naturalmente” nestes ambientes pode constituir potencial fonte de matéria-prima.

O estudo segue a hipótese de que as microalgas de água doce são eficientes na captura de carbono e produção lipídica útil na produção de biocombustíveis, e que manipulações nas condições de cultivo, como o aumento da temperatura e manipulação nas concentrações de nitrogênio e fósforo, são favoráveis a otimização dessa produção. A partir disso, o objetivo do estudo foi avaliar a influência da manipulação da temperatura e nutrientes no teor de lipídios em culturas de microalgas de água doce das espécies *Monoraphidium contortum* (Thuret) Komàrková-Legnerová (1969), *Chlorella vulgaris* Beijerinck (1890), *Desmodesmus quadricauda* (Turpin) Brébrisson (1835) e *Microcystis aeruginosa* Kützing (1846), visando o uso futuro na produção de biodiesel.

Material e métodos

O estudo foi conduzido em laboratório, a partir da indução artificial de nutrientes e/ou temperatura como descrito abaixo.

Manutenção das cepas

Foram utilizadas, neste estudo, quatro cepas, conforme tabela 1.

Tabela 1 Características das cepas.

Nome da cepa	Classe	Espécie	Origem	Tipo de cultura
LECV-1	Chlorophyceae	<i>Monoraphidium contortum</i>	Aquário em São Leopoldo, RS	unialgal
LECV-2	Chlorophyceae	<i>Monoraphidium contortum</i>	Aquário em Porto Alegre/RS	unialgal
LECV-3	Chlorophyceae	<i>Chlorella vulgaris</i> e <i>Desmodesmus quadricauda</i>	Lago do Centro 2 da UNISINOS, São Leopoldo/RS	mista
LEA-04	Cyanobacteria	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Juiz de Fora/MG	uniagal

Para o isolamento e obtenção das culturas unialgais e da cultura mista foi utilizado o método de “pescaria” (Tavares 2001); isso com exceção da LEA-04, que foi fornecida pelo Laboratório de Ecologia Aquática da Universidade Federal de Juiz de Fora, MG.

As culturas foram mantidas em Erlenmeyers de 250 ml contendo 100 ml de meio de cultura ASM-1 modificado (Aguiar & Azevedo in CETESB 1992), em sala de cultura climatizada (25 °C), com fotoperíodo de 12h-12h, com intensidade de luz de 2492 lux (Termo-Higro-Anemômetro Luxímetro Digital - THAL 300, marca Instrutherm) fornecida por lâmpadas fluorescentes tipo luz do dia (Osram, 20 W). A cada 15 dias foram repicadas para manutenção dos nutrientes necessários para o crescimento das microalgas e obtenção de biomassa para que as manipulações e experimentos pudessem ser efetuados, combinados com temperatura e nutrientes.

Experimento de temperatura e nutrientes

Neste estudo foram testadas três temperaturas: 13 °C, 25 °C (controle) e 37 °C, com doze graus de diferença a mais ou a menos que a temperatura controle (Paoletti et al. 1980); e cinco meios de cultura ASM-1 modificados: controle com altas concentrações de fosfato e nitrato (C); sem fosfato (P1), com a substituição do NH_2PO_4 e Na_2HPO_4 por KCl e Na_2SO_4 , respectivamente; com concentração intermediária não limitante de fosfato (P2); sem nitrato (N1), com a substituição do NaNO_3 pelo NaCl ; e com concentração intermediária não limitante de nitrato (N2) (Tabela 2).

Tabela 2 Constituição dos meios de cultura ASM-1 modificados utilizados, com relação as concentrações de fosfato e nitrato.

Meios de cultura	Tipo	Quantidade (g/L)		
		Fosfato		Nitrato
Controle (C)	ASM-1 modificado (Aguiar & Azevedo in CETESB 1992)	KH ₂ PO ₄ : 0,8162g	Na ₂ HPO ₄ : 0,0082g	NaNO ₃ : 1,700g
P1	ASM-1 modificado, segundo Mandal e Mallick 2009	KCl: 0,447145g	Na ₂ SO ₄ : 0,0082g	NaNO ₃ : 1,700g
P2	ASM-1 modificado, segundo Mandal e Mallick 2009	KH ₂ PO ₄ : 0,0594032g	Na ₂ HPO ₄ : 0,0005967g	NaNO ₃ : 1,700g
N1	ASM-1 modificado, segundo Mandal e Mallick 2009	KH ₂ PO ₄ : 0,8162g	Na ₂ HPO ₄ : 0,0082g	NaCl: 1,1688g
N2	ASM-1 modificado, segundo Mandal e Mallick 2009	KH ₂ PO ₄ : 0,8162g	Na ₂ HPO ₄ : 0,0082g	NaNO ₃ : 0,005g

Para a realização do experimento, alíquotas das quatro cepas foram colocadas em cinco Erlenmeyers, contendo cada um desses 1000 ml de um dos meios de cultura ASM-1 modificados acima mencionados. Estas culturas foram mantidas, por seis dias, em sala de cultura climatizada a 25 °C, com fotoperíodo de 12h-12h e intensidade de luz de 2595 lux (Termo-Higro-Anemômetro Luxímetro Digital - THAL 300, marca Instrutherm) fornecida por lâmpadas fluorescentes Osram, 20 W, tipo luz do dia.

Depois, as cepas foram repicadas e colocadas em 180 Erlenmeyers de 125 ml (n=3), onde cada um deles, continha 110 ml de uma cepa com um respectivo meio de cultura, totalizando 60 Erlenmeyers para cada cepa. Finalmente, foram, então, submetidas as três temperaturas (13 °C, 25 °C e 37 °C), durante oito (08) dias, contados da repicagem das cepas.

A extração de lipídios foi realizada no 1º, 4º e 8º dias do experimento, seguindo protocolo de Bligh & Dyer (1959) descrito por Mandal e Mallick (2009), sem adição de água. Para cada extração foi utilizado 30 ml de cultura. O teor de lipídios totais foi expresso por porcentagem (%) de peso seco das algas.

Concomitantemente a retirada da amostra para a extração dos lipídios (1º, 4º e 8º dias) 05 ml de cada cultura foi acondicionado em frasco, devidamente identificado e preservado com Lugol Acético a 1%, para a quantificação da biomassa algal.

Análise dos dados

Para a análise qualitativa dos dados (composição florística) foi utilizado o microscópio óptico, marca Carl Zeiss, aumento 400x, e a identificação foi em nível específico.

Para a análise quantitativa (biomassa dos organismos) foi utilizado o microscópio invertido, marca Opton, também no aumento 400x, sendo seguido o método de quantificação de Ütermöhl (1958), e o tempo de sedimentação de Lund et al. (1958). O cálculo para a densidade dos organismos (indivíduos.ml⁻¹) foi segundo Ros (1979). O biovolume (µm³.ml⁻¹ → mm³.l⁻¹) de cada espécie foi calculado segundo Sun

& Liu (2003) e Hillebrand et al. (1999), a partir de valores médios das medidas de 20 indivíduos. A biomassa ($\text{mm}^3 \cdot \text{L}^{-1} \rightarrow \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) foi estimada a partir da multiplicação dos valores de biovolume pela densidade de cada táxon.

Foi realizada análise estatística descritiva dos dados obtidos através das extrações e quantificações da biomassa. Para a realização dos testes estatísticos, foi utilizada a transformação do arcoseno para transformar os dados. Anova Fatorial de Medidas Repetidas foi efetuada para testar a variação do percentual de lipídios com relação à temperatura e nutrientes aos quais as cepas foram submetidas e os dias do experimento em que ocorreram as extrações. Para isso, foi utilizado o programa estatístico SPSS 16.0. Para testar a significância dos incrementos máximos de lipídios pelas cepas foram utilizados a Anova *One-Way* e Teste T, e nos casos, onde a homogeneidade das variâncias e normalidade dos dados não foram atendidas, os testes não-paramétricos respectivos, *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney*. Análise de Regressão Linear Simples foi realizada para demonstrar a variação do percentual de lipídios em função da concentração de biomassa algal. Para as três últimas análises foi utilizado o programa estatístico Systat 13.0.

Resultados

Cepa LECV-1

A biomassa total encontrada nesta cepa da espécie *M. contortum* foi de 2931,8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Ao final do experimento, em relação ao meio controle (657,95 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), esta cepa apresentou maior valor de biomassa quando cultivada no meio P2 (1068,25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e menor no meio N2 (298,61 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$). No oitavo dia foi onde, normalmente, se observou os maiores valores de biomassa algal, na temperatura de 37 °C (Fig. 1).

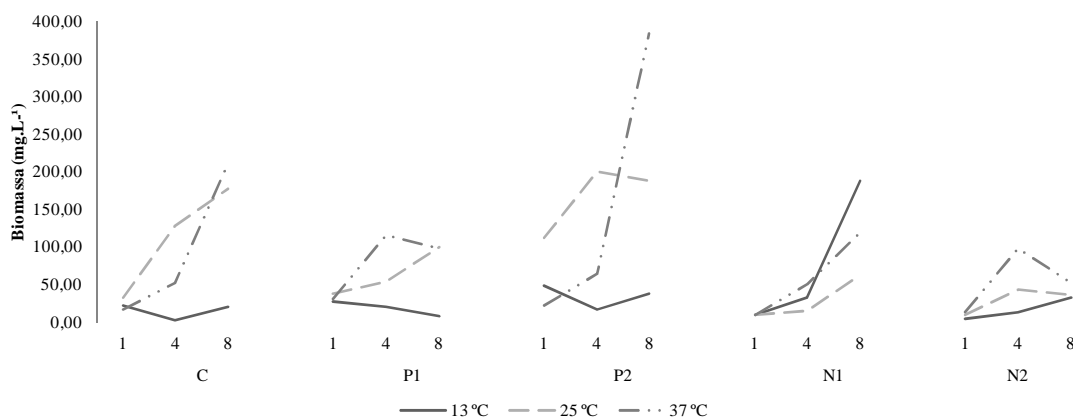


Fig. 1 Concentração de biomassa algal obtida na cepa LECV-1 nos meios de cultura e temperaturas as quais foi submetida ao longo do experimento.

Considerando-se os dias em que se realizaram as extrações de lipídios os maiores valores, geralmente, ocorreram no primeiro dia, nos tratamentos P1, N1 e N2, na temperatura de 13 °C, no entanto, estes valores não foram significativos em relação ao controle ($p>0,05$). Houve um aumento no teor lipídico de 16% em relação ao meio controle nesta mesma temperatura, ou seja, de 85,94% para 100%. Quando submetida à temperatura controle (25 °C), o meio de cultura que melhor teor lipídico apresentou foi o N2 (100%), no oitavo dia. No quarto dia, mantida no meio controle, a temperatura de 13 °C foi onde se observou o valor lipídico mais alto (87,18%). O meio P1 foi o único onde a variação lipídica não foi significativa em relação às temperaturas e aos dias em que ocorreram as extrações ($p>0,05$). Os percentuais lipídicos desta cepa variaram de 2% a 100%.

Na média geral, observou-se que o maior teor de lipídios totais (88,18%) foi encontrado quando submetida à temperatura de 37 °C e mantida no meio de cultura N2; aumento significativo em relação ao controle nesta mesma temperatura ($t=-2,967$, $gl=16$, $p= 0,009$). Os meios de cultura, onde foi alterado o nitrato foram os que apresentaram maiores concentrações de lipídios, com exceção do valor obtido a 13 °C no meio controle (Fig. 2).

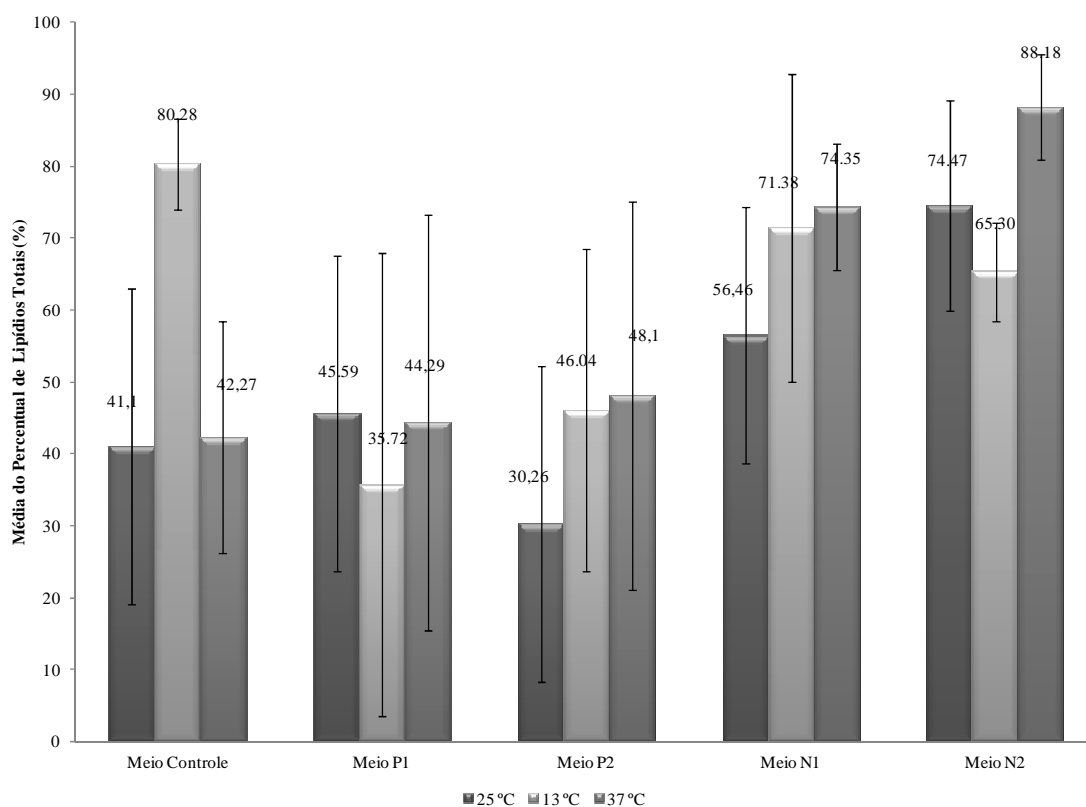


Fig. 2 Comparação da média geral dos percentuais lipídicos totais encontrados na cepa LECV-1 quando da interação entre os fatores temperatura e nutrientes.

Cepa LECV-2

A biomassa total encontrada nesta cepa da espécie *M. contortum* foi de 3201,3 mg.L⁻¹. Ao final do experimento, em relação ao meio controle (751,36 mg.L⁻¹), esta cepa apresentou maior valor de biomassa quando cultivada no meio P2 (1460,45 mg.L⁻¹) e menor no meio N1 (193,30 mg.L⁻¹). No oitavo dia foi onde, normalmente, se observaram os maiores valores de biomassa algal, na temperatura de 25 °C (Figura 3).

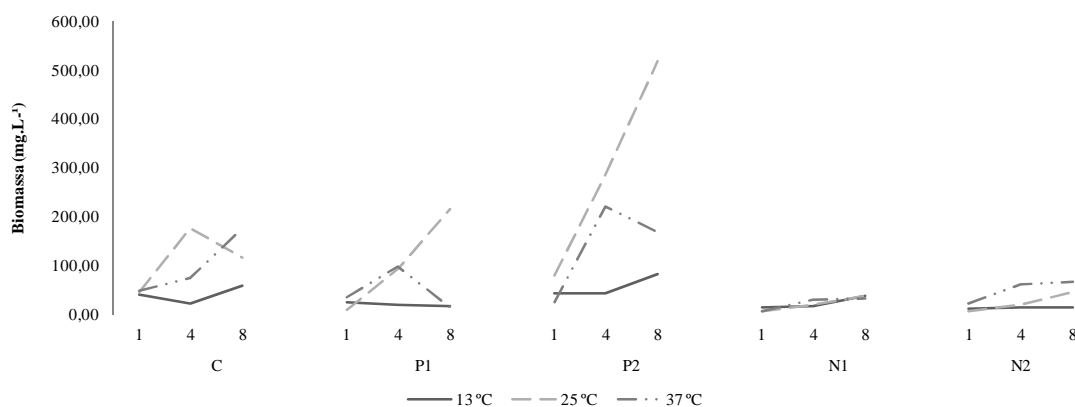


Fig. 3 Concentração de biomassa algal obtida na cepa LECV-2 nos meios de cultura e temperaturas as quais foi submetida ao longo do experimento.

No geral, para a cepa LECV-2 o primeiro dia de extração lipídica também foi o que apresentou os maiores teores lipídicos totais, quando mantida nos meios P1, N1 e N2, na temperatura de 13 °C, embora este incremento não tenha sido significativo ($p > 0,05$). Foi constatado um aumento de 126% de teor de lipídios em relação ao meio controle nesta mesma temperatura, aumentando de 37,5% para 100%. Quando submetida à temperatura controle (25 °C), os meios N2 e N1 apresentaram maiores valores lipídicos (100%), no primeiro e quarto dias de extração, respectivamente. No entanto, quando mantida no meio de cultura controle e 25 °C, esta cepa apresentou o melhor percentual lipídico (92,22%), no quarto dia. A variação lipídica no meio P1, também, não foi significativa em relação à temperatura e aos dias em que ocorreram as extrações ($p < 0,05$). Os percentuais lipídicos variaram entre 4,33% e 100%.

Na média geral, os meios de cultura em que foi alterado o nitrato (meios N1 e N2) foram os que apresentaram maiores percentuais de lipídios totais, sendo o melhor resultado encontrado (97,61%) na temperatura de 13 °C no meio N2; valor, este, estatisticamente significativo em relação ao controle ($t = -3,518$, $gl = 16$, $p = 0,003$) (Fig. 4).

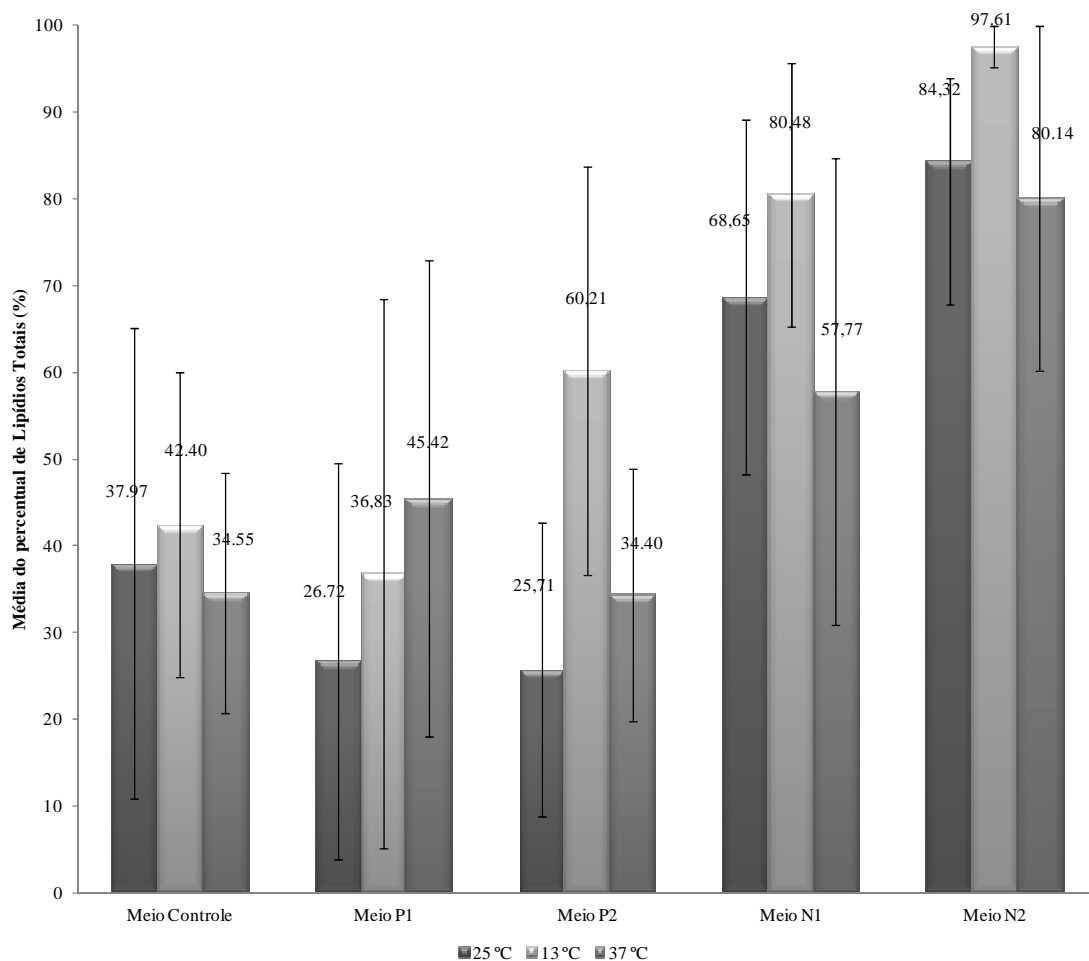


Fig. 4 Comparação da média geral dos percentuais de lipídios totais encontrados na cepa LECV-2 quando da interação entre os fatores temperatura e nutrientes.

Cepa LECV-3

As espécies *D. quadricauda* e *C. vulgaris*, presentes na cepa LECV-3, apresentaram juntas uma biomassa total de 3857,1 mg.L⁻¹. Analisando-as separadamente os valores encontrados foram 3694,4 mg.L⁻¹ e 162,7 mg.L⁻¹, respectivamente. A espécie *D. quadricauda* foi responsável por 95,78% da biomassa encontrada para esta cepa mista, enquanto que a *C. vulgaris*, 4,21%. Ao final do experimento, foi observado, para a LECV-3 que, quando cultivada no meio controle, apresentou maior valor de biomassa (2395,95 mg.L⁻¹) em relação aos demais meios. O menor valor foi observado quando a cepa foi mantida no meio N2 (67,89 mg.L⁻¹). No oitavo dia foi onde, normalmente, se observaram os maiores valores de biomassa algal, na temperatura de 25 °C (Fig. 5).

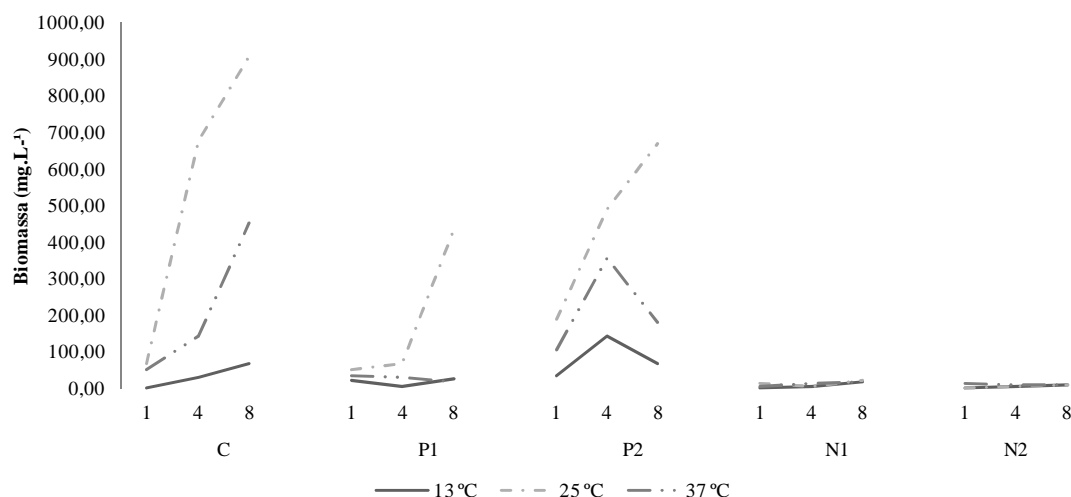


Fig. 5 Concentração de biomassa algal obtida na cepa LECV-3 nos meios de cultura e temperaturas as quais foi submetida ao longo do experimento.

Pode-se observar que, os mais altos percentuais de lipídios totais, normalmente, foram observados no primeiro dia de extração lipídica, para os meios P1, P2, N1 e N2, na temperatura de 25 °C, entretanto, estes percentuais não foram estatisticamente significativos em relação ao controle ($p>0,05$). Houve um aumento de 102% no teor lipídico em relação ao meio controle nesta mesma temperatura, passando de 44,11% para 100%. Quando submetida à temperatura controle, os maiores resultados obtidos foram nos meios P1, P2 e N2, ambos com 100%, no primeiro dia de extração. Entretanto, quando comparados o meio de cultura controle com os resultados obtidos nas três temperaturas às quais a cepa foi submetida, a condição controle (meio de cultura e temperatura controles) apresentou o melhor valor (90%), no quarto dia. A variação lipídica nos meios N1 e P1 não foi significativa em relação às temperaturas e aos dias em que ocorreram as extrações ($p>0,05$). Os percentuais lipídicos, nesta cepa, variaram entre 6,27% e 100%.

Foi observado, na média geral, que o maior percentual de lipídios foi alcançado a 13 °C no meio N2 (85,66%), tendo aumentado significativamente em relação ao controle ($U=19.000$, $gl=1$, $p=0,043$). Novamente, os meios onde foram alteradas as concentrações de nitrato (N1 e N2) foram os que apresentaram maior valor lipídico (Fig. 6).

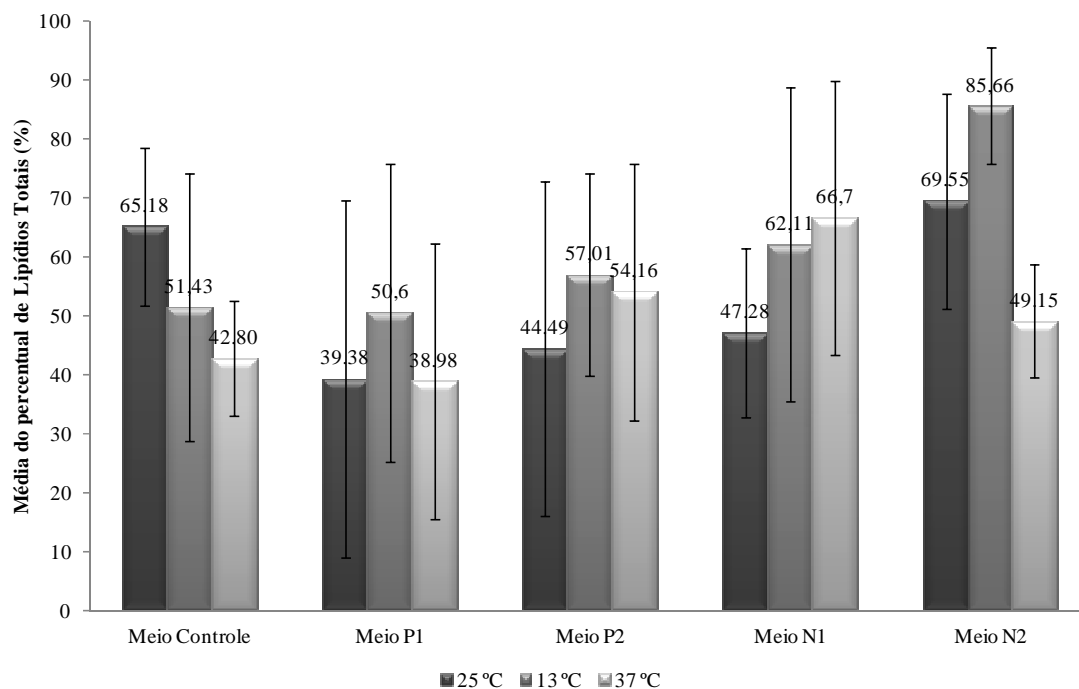


Fig. 6 Comparação da média geral dos percentuais de lipídios totais encontrados na cepa LECV-3 quando da interação entre os fatores temperatura e nutrientes.

Cepa LEA-04

A biomassa total de *M. aeruginosa* foi de 327,3 mg.L⁻¹. Ao final do experimento, em relação ao meio controle (61,35 mg.L⁻¹), esta cepa apresentou maior valor de biomassa quando cultivada no meio P1 (70,12 mg.L⁻¹) e menor no meio P2 (47,43 mg.L⁻¹). No oitavo dia foi onde, normalmente, se observaram os maiores valores de biomassa algal, na temperatura de 25 °C (Fig. 7).

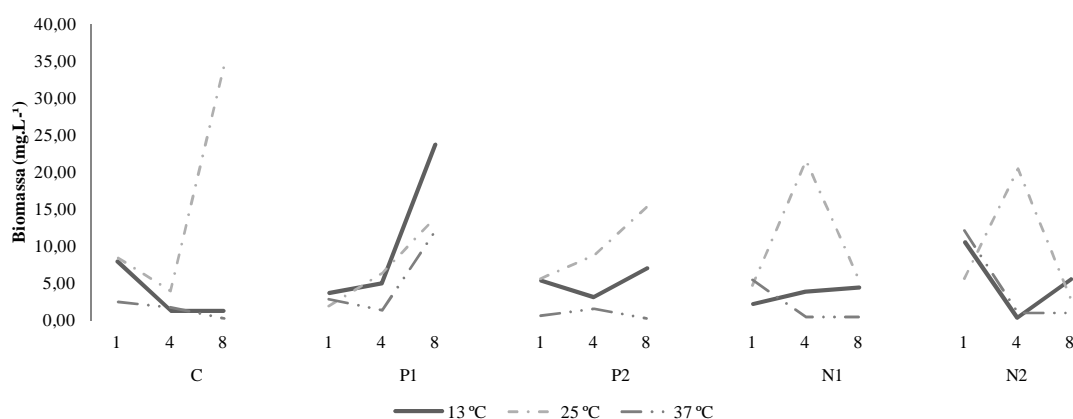


Fig. 7 Concentração de biomassa algal obtida na cepa LEA-04 nos meios de cultura e temperaturas as quais foi submetida ao longo do experimento.

A cepa LEA-04, no geral, apresentou os melhores teores lipídicos totais, assim como as demais cepas, no primeiro dia em que ocorreu a extração lipídica, nos meios P1, P2, N1 e N2, na temperatura de 13°C, tendo um aumento significativo de 258% em

relação ao meio controle nesta temperatura ($H=10.432$, $gl=4$, $p=0,034$). Submetida à temperatura controle, foi observado que os mais altos teores de lipídios totais foram encontrados quando esta cepa estava no meio N2, no quarto dia (100%). Na condição controle (temperatura e meio de cultura controles) que a cepa alcançou seu maior percentual lipídico (79,6%), também no quarto dia. Quanto ao meio P1, a variação lipídica, não foi significativa em relação à temperatura e aos dias em que ocorreram as extrações. Os teores lipídicos variaram de 3,3% a 100%.

Foi observado, na média geral, que o meio N2 a 25°C alcançou o maior percentual de lipídios totais (90,65%) ($U=20.000$, $gl=1$, $p=0,043$). Novamente os meios onde foram alteradas as concentrações de nitrato apresentaram os maiores valores de lipídios totais (Fig. 8).

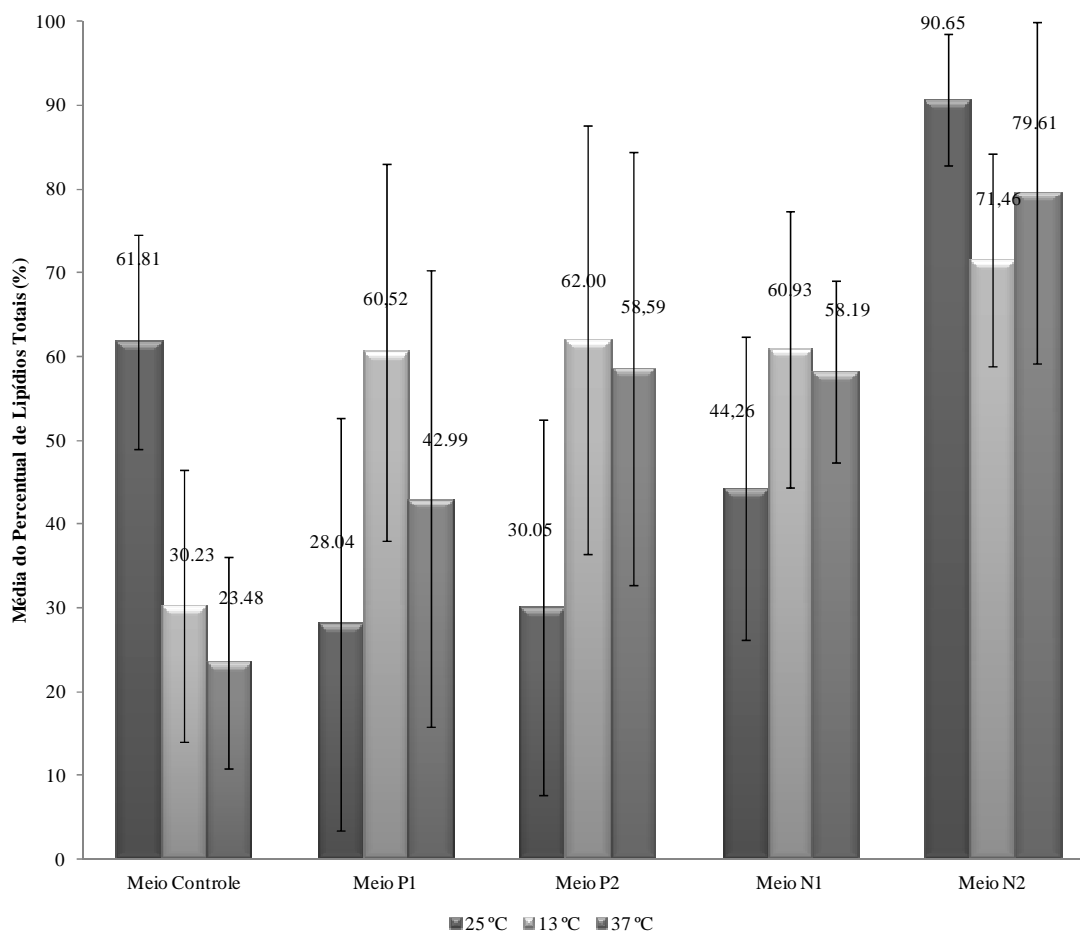


Fig. 8 Comparação da média geral dos percentuais de lipídios totais encontrados na cepa LEA-04 quando da interação entre os fatores temperatura e nutrientes.

Relação do percentual lipídico e biomassa

Não foi observada variação lipídica significativa entre as cepas ($p>0,05$).

O percentual lipídico variou significativamente em relação aos dias em que ocorreram as extrações ($F_{3,120}=79,064$, $p<0,001$). Foi observado que no primeiro dia de extração, as cepas mantidas nos meios de cultura P1 e N2 obtiveram os melhores percentuais de lipídios totais, independentemente da temperatura a qual foram submetidas. No quarto dia, os melhores resultados foram observados no meio N1 e na temperatura de 37 °C. No oitavo dia foi o meio de cultura N2 que apresentou os melhores teores lipídicos, também independentemente da temperatura a qual foram submetidas (Tabela 3).

No geral, o meio N2 foi o que apresentou maiores teores lipídicos, apresentando diferença significativa em relação ao tratamento C ($F_{4,120}=19,662$, $p<0,001$), P1 ($F_{4,120}=19,662$, $p<0,001$), P2 ($F_{4,120}=19,662$, $p<0,001$) e N1 ($F_{4,120}=19,662$, $p<0,001$). Os meios C e P2, apesar de eventualmente alcançarem altos teores de lipídios totais, quando comparados aos percentuais encontrados nos demais tratamentos, seus percentuais foram mais baixos. Considerando-se as temperaturas, o percentual lipídico foi diferente estatisticamente entre as temperaturas 13 e 25 °C ($F_{2,120}=6,703$, $p=0,005$) e 13 e 37 °C ($F_{2,120}=6,703$, $p>0,001$), sendo os maiores valores lipídicos observados geralmente a 13 °C. Entre as temperaturas de 25 e 37 °C, a variação encontrada não teve significância ($p>0,05$).

Tabela 3 Média e desvio padrão, respectivamente, relativos ao percentual de lipídios (%) encontrado nas cepas LECV-1, LECV-2, LECV-3 e LEA-04 para cada dia em que foi realizada a extração, nas temperaturas e meios de cultura as quais foram submetidas (n=3).

Temperaturas	Cepas	Dia 1					Dia 4					Dia 8				
		Meio C	Meio P1	Meio P2	Meio N1	Meio N2	Meio C	Meio P1	Meio P2	Meio N1	Meio N2	Meio C	Meio P1	Meio P2	Meio N1	Meio N2
25°C	LECV-1	13,4±11,9	86±24,2	74,0±44,9	28,8±9,85	74,0±44,9	84,4±26,9	10,4±6,9	6,4±1,4	89,6±17,9	49,3±43,8	25,4±24,8	40,3±51,7	10,2±9,6	50,9±30,4	100±0
	LECV-2	10,2±9,5	72,1±48,2	59,5±26,8	75,5±42,3	100±0	92,2±13,4	6,2±3,2	9,5±2,4	100±0	67,0±28,5	11,4±9,8	1,8±0,9	8,0±1,5	30,4±13,0	85,8±24,4
	LECV-3	44,1±49,7	100±0	100±0	27,2±29,6	100±0	90±17,3	10,4±11,9	27,2±21,6	45,9±33,7	36,7±14,6	61,4±51,8	7,7±3,5	6,2±3,0	23,1±0,2	71,8±48,6
	LEA-04	68,8±47,2	77,3±39,2	74,6±43,8	40,4±52,6	96,9±5,2	79,6±35,3	3,5±2,5	11,1±5,2	77,2±39,4	100±0	37,0±38,3	3,3±1,3	4,3±1,7	15,1±3,0	75±43,3
13°C	LECV-1	85,9±21,2	100±0	88,8±19,2	100±0	66,6±57,7	87,1±22,2	5,17±3,3	13,6±17,0	84,6±26,6	76,4±40,7	67,7±22,4	1,9±1,8	35,5±55,8	29,5±26,5	52,7±41,2
	LECV-2	37,5±54,4	100±0	94,4±9,6	90,9±15,7	100±0	75±43,3	4,3±0,6	70,9±30,0	100±0	92,8±0	14,7±9,2	6,1±6,1	15,2±11,9	50,5±44,1	92,8±12,3
	LECV-3	83,3±28,8	100±0	71,5±49,3	76,6±0	75,6±57,7	63,5±29,2	17,0±14,4	76,6±40,4	75,6±42,2	100±0	7,4±4,5	34,7±56,5	22,8±22,2	10,7±7,5	90,3±16,7
	LEA-04	15,5±11,6	100±0	100±0	92,5±12,8	96,2±6,4	62,6±39,1	22,2±14,4	72,7±31,8	53,0±46,2	63,6±40,4	12,5±10,4	59,2±44,8	13,2±5,2	37,1±54,5	54,4±10,7
37°C	LECV-1	39,6±52,3	100±0	34,5±13,5	91,6±14,4	100±0	71,3±32,1	29,4±22,4	100±0	62,6±34,4	74,9±43,4	15,7±3,6	3,4±2,3	9,7±9,6	68,7±54,1	89,6±17,9
	LECV-2	18,9±19,4	100±0	52,2±15,4	100±0	100±0	62,1±78,0	14,2±4,4	45,3±13,2	65,3±31,3	100±0	22,5±17,5	22,0±13,8	5,6±6,9	7,9±1,3	40,4±20,5
	LECV-3	40,0±52,0	85,1±25,6	79,2±35,8	100±0	66,6±57,7	60,9±47,3	21,6±6,7	72,2±13,8	78,2±32,5	46,9±45,9	27,4±28,0	10,1±6,8	10,9±9,0	21,8±6,5	33,8±8,4
	LEA-04	48,6±30,0	95,8±7,2	64,6±35,5	80±34,6	100±0	11,3±3,7	5,2±4,4	100±0	47,3±38,7	38,8±24,0	10,3±6,2	27,8±34,4	11,1±12,6	47,2±13,0	100±0

Para todas as cepas foi constatado que o percentual de lipídios variou em razão da biomassa algal ($p < 0,05$) (Fig. 9).

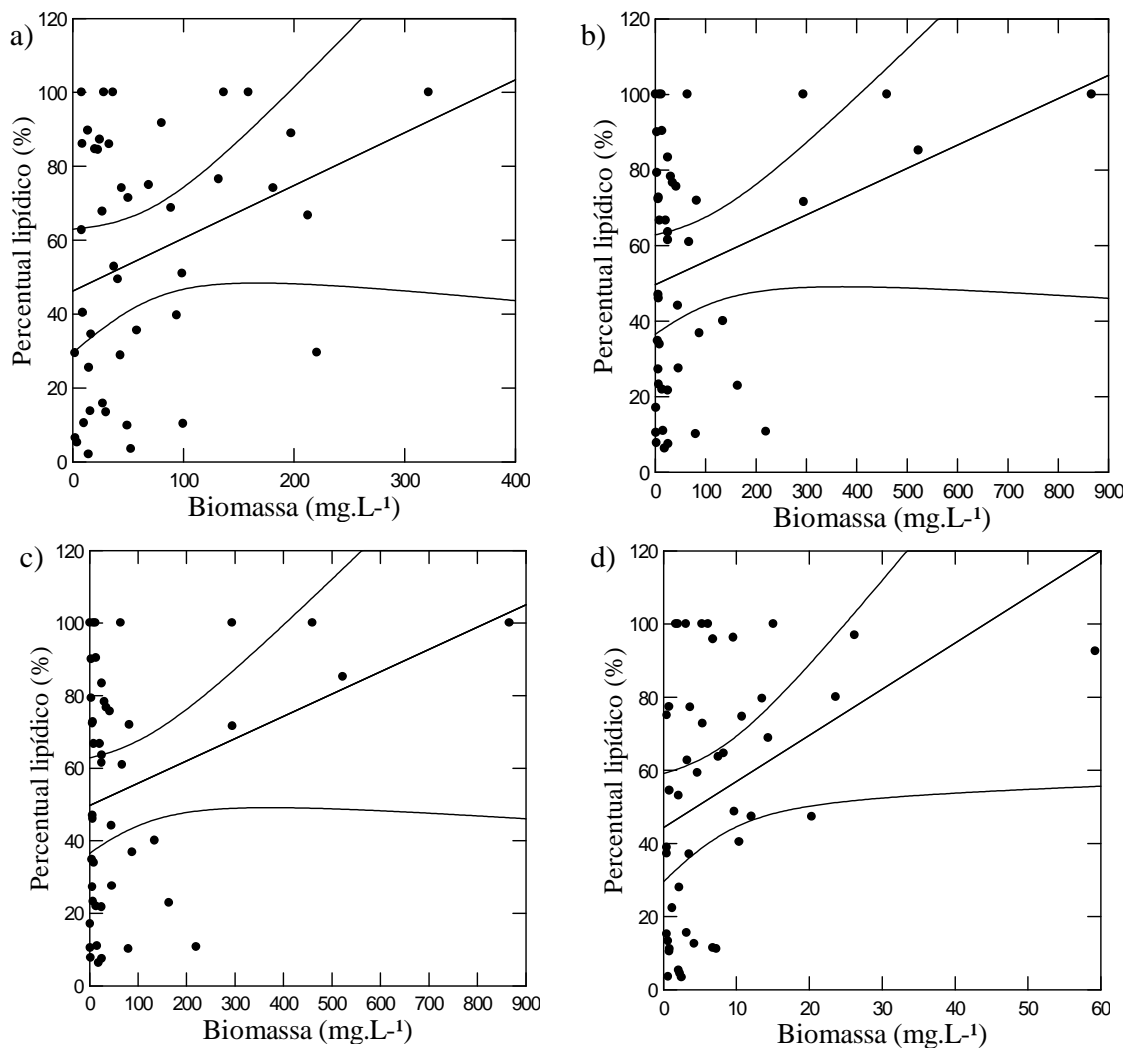


Fig. 9 Relação da variação do percentual lipídico em função da biomassa algal encontrada nas cepas testadas. a) LECV-1; b) LECV-2; c) LECV-3; d) LEA-04.

Discussão

A manipulação da temperatura e dos nutrientes influenciou o teor de lipídios produzidos nas quatro cepas estudadas. Todas as cepas responderam de forma similar ao experimento realizado obtendo, geralmente, seus melhores resultados em relação ao percentual lipídico, no primeiro dia de experimento, no meio de cultura N2 e temperatura de 13 °C. Essa similaridade também foi observada em relação às maiores concentrações de biomassa algal que, normalmente, foram obtidas no oitavo dia, no meio P2 e na temperatura de 25 °C. Além disso, o percentual de lipídios variou em razão da biomassa em todas as cepas.

As semelhanças encontradas no modo como as cepas responderam ao experimento podem ser explicadas pelos ambientes similares em que as espécies vivem, pois as quatro cepas são encontradas em habitat com grande aporte de nutrientes. Dentre as clorofíceas, os gêneros *Monoraphidium*, *Chlorella* e *Desmodesmus* são comumente associados a ambiente raso e enriquecido (Reynolds et al. 2002) e, particularmente, *M. contortum* já foi associada ao perifíton em condições de elevada disponibilidade de fósforo no Lago das Garças (Barcelos 2003) e do IAG (Ferragut 2004). O gênero *Microcystis* é tipicamente planctônico e comumente encontrado em corpos d'água eutrofizados, na forma de florações (Bicudo & Menezes 2006). Além disso, as espécies utilizadas neste estudo são abundantes e de fácil cultivo, sendo nestes aspectos, excelentes alternativas a serem exploradas.

Com relação às diferenças encontradas, especialmente entre as duas cepas pertencentes à espécie de *M. contortum* (LECV-1 e LECV-2), estas podem ser atribuídas às diferenças na biossíntese de lipídios pelas algas, que pode ocorrer não só entre organismos taxonomicamente diferentes, mas também entre cepas de uma mesma espécie (Aquarone et al. 1983). Ou seja, a diminuição da concentração da biomassa e o consequente aumento do teor lipídico podem ocorrer de forma diferenciada entre organismos pertencentes a espécies diferentes e entre organismos da mesma espécie. Ainda mais que, estas duas estirpes foram isoladas de locais distintos.

A duração da cultura (tempo de cultura) pode afetar a produtividade de lipídios significativamente (Mandal & Mallick 2009). Considerando-se os dias em que se realizaram as extrações de lipídios, todas as cepas obtiveram, geralmente, os maiores valores lipídicos no primeiro dia, nos tratamentos P1 e N1 (LECV-1 e LECV-3), P1, P2 e N2 (LECV-2) e P1, P2 e N1 (LEA-04), na temperatura de 13 °C.

As concentrações de nitrogênio e fósforo presentes na água são considerados fatores limitantes e têm influência direta sobre o crescimento de microalgas e acumulação de lipídios. Além disso, trabalhos já mostraram que a deficiência desses fatores é eficiente para induzir acúmulo de lipídios nas microalgas (Watanabe et al. 1983; Feng et al. 2012). Contudo, como os fatores que afetam a produção de óleos são os mesmos que afetam o crescimento, com a limitação de nitrogênio (N) e fósforo (P), o valor de biomassa tende a reduzir. Isso explicaria o fato de, geralmente, os maiores teores lipídicos terem sido encontrados no primeiro dia de extração lipídica e as maiores concentrações de biomassa algal no oitavo dia. Este fato foi observado nas cepas LECV-1 (meio N1), LECV-2 (meios P1, P2, N1 e N2),

LECV-3 (meios P1, P2 e N1) e na LEA-04 (P1 e P2), nos meios onde houve alteração nas concentrações de fosfato e nitrato em relação ao meio controle.

Neste estudo, a concentração de biomassa de *C. vulgaris* foi maior na condição P2 e N1, onde houve a diminuição da quantidade de P e N em relação ao controle, contrariamente ao encontrado no estudo de Feng et al. (2012), no qual a concentração de biomassa de *Chlorella zofingiensis* foi evidentemente muito menor sob condições de deficiência de N e P, comparando-se ao grupo controle. Isso pode ser explicado por se tratar de espécies diferentes do gênero *Chlorella*, pelo meio de cultura ser diferente do utilizado neste estudo e, conseqüentemente concentrações diferentes de N e P.

Foi comum a todas as cepas que os meios de culturas, onde o nitrato foi alterado, apresentaram os melhores teores de lipídios, especialmente, no meio de cultura N2. Nas clorofíceas e cianobactérias, o estresse de nitrogênio se correlaciona bem com o aumento no teor de lipídios, ao passo que a resposta de outros taxa para estresse de nitrogênio é mais variada (Watanabe et al. 1983; Griffiths & Harrison 2009). Isso pode explicar, em relação às cepas pertencentes a estas classes, o incremento lipídico ter sido, geralmente, maior no meio N2, onde a concentração de nitrato foi menor do que a do meio controle, no qual estas cepas estavam mantidas anteriormente ao experimento.

Estes resultados também corroboram com os encontrados por Mandal e Mallick (2009), onde o incremento lipídico por peso seco das algas da espécie *Scenedesmus obliquus* foi maior do que o encontrado no controle, no meio de cultura onde o nitrato estava deficiente. Illman et al. (2000) também mostraram que a deficiência de nitrogênio influenciou o cultivo de *Chlorella*, aumentando seu conteúdo lipídico em 63%.

De acordo com Shiflin & Chisholm (1981), também em relação à *Scenedesmus obliquus* apresentou um aumento no rendimento de lipídio (43% de peso seco) quando o nitrato estava deficiente, além disso, mostrou que houve acumulação de derivados de ácidos graxos em trinta espécies de microalgas pertencentes às classes clorofíceas e diatomáceas sob privação de nitrogênio. Feng et al. 2012, também mostraram acúmulo de lipídios em *C. zofingiensis* em relação ao grupo controle, de 24,1% para 33,5%, na condição de deficiência de N ou P. Estes autores encontraram maior conteúdo lipídico (65,1%) sob a deficiência de N, entre todos os seus tratamentos. Este valor, inclusive, foi maior do que o encontrado com a deficiência de P (44,7%), indicando que a deficiência de N foi mais eficaz para promover aumento significativo no teor de lipídios nesta espécie do gênero *Chlorella*.

A limitação de fosfato também parece estimular a acumulação de lipídios, como encontrado por Rhee (1978), onde o teor lipídico de algas do gênero *Scenedesmus* foi maior quando o fosfato estava indisponível. Todavia, a maioria dos estudos realizados, inclusive este, demonstrou que a deficiência de nitrato produz maior percentual lipídico do que a deficiência de fosfato, inclusive, já exposto acima.

Em relação à temperatura, foi observado por Paoletti et al. (1980) que a variação de 30 °C para 42 °C, ou seja, de doze graus, promoveu um aumento de 7,4% para 11,5% no conteúdo de lipídios da cianobactéria *Spirulina maxima*. Todavia, neste estudo, com a diminuição de doze graus na temperatura (25 °C para 13 °C), foi onde se obtiveram os melhores incrementos lipídicos, com exceção da cepa LECV-1 que foi a 37 °C. Neste caso, o aumento de doze graus na temperatura corroborou com o encontrado por Paoletti et al. (1980).

A cepa LEA-04, pertencente à classe Cyanobacteria, quando submetida aos meios de cultura alterados, principalmente em relação ao nitrato não limitante (meio N2), apresentou altos percentuais de lipídios, diferentemente do encontrado na literatura de que cianobactérias independentemente das condições de cultivo apresentam baixos teores de lipídios (Aquarone et al. 1983). Conforme Reynolds (1984), quando expostas a situações de estresse, as cianobactérias armazenam todas as suas reservas. Isso pode explicar os bons valores lipídicos encontrados nesta cepa.

Os percentuais de lipídios de 84,44% e 92,22% encontrados no quarto dia de experimento, nas cepas LECV-1 e LECV-2, respectivamente, pertencentes ao gênero *Monoraphidium*, quando submetidas à temperatura e meio de cultura controle foi o quádruplo encontrado por Tomasini et al. (2008), que obteve 20,42%, também utilizando o método de Bligh & Dyer (1959), sem adição de água. Este percentual foi similar ao encontrado neste estudo no oitavo dia de experimento com a cepa LECV-1 nas condições antes expostas.

Estatisticamente, os resultados obtidos quanto à variação do percentual de lipídios devido à temperatura, nutrientes e tempo a qual as cepas estiveram submetidas foram significativos, com exceção das cepas. Com isso, as cepas testadas, podem ser consideradas como potenciais produtoras de lipídios, desde que, o meio de cultura, a temperatura em que estão sendo mantidas e o dia de extração lipídica sejam corretamente estabelecidos.

Muitas cepas de microalgas têm naturalmente alto conteúdo de lipídios, em torno de 20-50% do peso seco (Brennan & Owende 2010). Outros estudos mostram que o percentual lipídico chega a atingir cerca de 80% ou mais da biomassa algal (Sporaloro

et al. 2006; Chisti 2007a). Através deste estudo, percebeu-se que é possível aumentar essa concentração lipídica com a modificação de fatores determinantes, como a concentração de fósforo e nitrogênio, temperatura e método de extração de lipídios adequado.

Do ponto de vista sócio-econômico, o conhecimento gerado constituirá base descritiva e analítica de informações sobre as condições ótimas para algas de água doce incrementar a produção de lipídios e constituírem fonte de energia futura para biocombustíveis. Tudo isso, pode ajudar a aperfeiçoar medidas de manejo e conservação dos ambientes que potencialmente geram matéria-prima, visando contenção de despesas e tempo em investimentos tecnológicos nesta área.

Conclusão

Através deste estudo, percebeu-se que é possível aumentar a concentração lipídica de clorofíceas e cianobactérias com a modificação de fatores determinantes, como a temperatura e a concentração de fósforo e nitrogênio. Especialmente, promovendo o estresse de nitrogênio e a diminuição da temperatura, que foram as condições em que, geralmente, as cepas testadas apresentaram maior teor lipídico total.

Referências bibliográficas

- Aguiar DG, Azevedo SMFO (1992) Produção de toxina por *Microcystis aeruginosa* em diferentes fases de cultivo e concentrações de nitrogênio, 1991. In: CETESB Implantação de métodos para avaliação de algas tóxicas. Relatório teórico, Rio de Janeiro, 3:6-6
- Aquarone E, Borzani W, Lima UA (1983) Alimentos e Bebidas Produzidos por Fermentação. Edgar Blucher, pp. 240
- Barcelos EM (2003) Avaliação do perifíton como sensor da oligotrofização experimental em reservatório eutrófico (Lago das Garças, São Paulo). Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro
- Behrens PW, Kyle DJ (1996) Microalgae as a source of fatty acids. *J Food Lipids* 3:259– 272
- Bicudo CEM, Menezes M (2006) Gêneros de algas de águas continentais do Brasil. São Carlos: Rima, pp. 502
- Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37:911–917

- Borges L, Faria BM, Odebrecht C, Abreu PC (2007) Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de um “Mecanismo de Desenvolvimento Limpo”. *Atlântica* 29(1): 35-46
- Brennan L, Owende P (2010) Biofuels from microalgae. A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:557–577
- Cheng Y, Lu Y, Gao C, Wu O (2009) Alga-Based Biodiesel Production and Optimization Using Sugar Cane as the Feedstock. *Energy & Fuels* 23:4166–4173
- Chisti Y (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25:294-306
- Chisti Y (2007a) Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25:294-306
- Chisti Y (2007b) Biodiesel from microalgae beats bioethanol *Trends in Biotechnology* 26(3):126–131
- Costa JAV, Radmann EM (2008) Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO², SO² e NO. *Química Nova* 31 (7):1609-1612
- Feng P, Deng Z, Fan L, Hu Z (2012) Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, doi:10.1016/j.jbiosc.2012.05.007
- Ferragut C (2004) Respostas das algas perifíticas e planctônicas à manipulação de nutrientes (N e P) em reservatório urbano (Lago do IAG, São Paulo). Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro
- Goldemberg J (2009) Biomassa e energia. *Química Nova* 32(3):582-587
- Griffiths MJ, Harrison STL (2009) Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production. *Journal Applied Phycology* 21:493–507
- Guschina IA, Harwood JL (2006) Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research* 45:160–186
- Haag AL (2007) Algae bloom again. *Nature* 447:520– 521
- Harwood JL, Guschina IA (2009) The versatility of algae and their lipid metabolism. *Biochimie* 91:679–684
- Hillebrand H, Dürseken D, Kirschiel D, Pollinger U, Zohary T (1999) Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology* 35:403-424
- 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 Microbiology Technology* 27:631–635
- Khan SA, Rashmi, Hussain MZ, Prasad S, Banerjee UC (2009) Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13:2361–2372

- Lund JWG, Kipling C, LeCren ED (1958) The invert microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia* 11:143-170
- Mandal S, Mallick N (2009) Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Applied Microbiology Biotechnology* 84:281–291
- Mata TM, Martins AA, Caetano NS (2010) Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:217–232
- Morais MG, Costa JAV (2008) Bioprocessos para remoção de dióxido de carbono e óxido de nitrogênio por microalgas visando à utilização de gases gerados durante a combustão do carvão. *Química Nova* 31(5):1038–1042
- Morais MG, Costa JAV (2008) Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono. *Ciência Agrotecnologia, Lavras* 32(4):1245-1251
- Paoletti C, Vicenzini M, Bocci F (1980) Composizione biochimica generale delle biomasse di *Spirulina platensis* e *Spirulina maxima*. In: Materassi R (ed). *Prospective della Ricerche. Accademia Dei Georgofili. Firenze* 20-21, pp. 111-125
- Plá JÁ (2002) Perspectivas do biodiesel no Brasil. *Indic. Econ.* 30(2):179-190
- Reynolds CS (1984) *The ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 384
- Reynolds CS, Huszar V, Kruk C, Naselli-Flores L, Melo S (2002) Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 24(5):417-428
- Rhee GY (1978) Effect of N:P atomic ratio and nitrate limitation on algal growth, cell composition and nitrate uptake. *Limnology Oceanography* 23:10–25
- Ros J (1979) *Práctica de Ecología*. Omega, Barcelona, pp. 181
- Shifflin NS, Chisholm SW (1981) Phytoplankton lipids: interspecific differences and effects of nitrate, silicate and light dark cycles. *Journal Phycology* 17:374–384
- Smith VH, Sturm BSM, Noyelles FJD, Billings SA (2009) The ecology of algal biodiesel production. *Trends in Ecology and Evolution*, in press
- Sporaloro P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A (2006) Commercial applications of microalgae. *Journal Bioscience Bioengineering* 101:87–96
- Sun J, Liu D (2003) Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research* 25:1331-1346
- Tavares LHS, Rocha O (2001) *Manual para implantação e manutenção de Laboratório de Cultura de cianobactérias tóxicas*. Editora Rima, São Carlos, pp. 106
- Tomasini D, Ahrens VM Zamberlam F, D’Oca MGM (2008) Determinação do teor de lipídios de microalgas visando à obtenção de biodiesel. XVI Encontro de Química da Região Sul (16-SBQSul)
- Ütermöhl H (1958) Zur Vervollkommnung der quantitative Phytoplankton: Methodik Mitteilung Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie 9:1-38

- Walker DA (2009) Biofuels, facts, fantasy, and feasibility. *Journal Applied Phycology*. 21:509–517
- Watanabe T, Kitajima C, Fujita S (1983). Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: A review. *Aquaculture* 34:115-143