

Influência da iluminação e da aeração sobre o crescimento de *Chlorella sorokiniana* em meio BG11

Maria Eduarda Chaves Ribeiro¹, Alessa Bembom Garcia², Daniela Flavia Machado Turati³, Samuel Nunes Limberger⁴, Felipe Brandão de Paiva Carvalho⁵, Letícia Jungmann Cançado⁶

Resumo

Representando uns dos principais objetos de estudos atualmente, microalgas são, em geral, microrganismos fotossintetizantes altamente capazes de retirar CO₂ atmosférico e gerar biomassa rica em biomoléculas de interesse industrial e comercial. No entanto, para obtenção de altos valores de rendimento e produtividade, condições ideais de crescimento são muito importantes. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi comparar a influência de biorreatores, ou modelos utilizados para o cultivo, sobre o crescimento e o rendimento de biomassa de *Chlorella sorokiniana* em meio BG11 e, também, verificar os resultados que o uso de diferentes luzes pode gerar. Para tanto, foram realizados dois experimentos não simultâneos em que, primeiramente, a cepa foi cultivada em dois módulos de cultivos diferentes: módulo novo (MN), com biorreatores e sistema de aeração novos da sala de microalgas; e módulo antigo (MA), utilizando Erlenmeyers, pipeta estéril para passagem de ar e outros componentes. Em um segundo momento, com o intuito de analisar quais luzes e combinações geram maiores crescimentos e, por conseguinte, maiores biomassas secas finais, as microalgas foram cultivadas sob três condições de iluminação diferentes: luz branca (B), luz branca + luz colorida (B+C) e luz colorida (C). Para os dois módulos, temperatura, aeração e pH também foram controlados. Ao longo e/ou ao final dos experimentos, análises de crescimento por meio de leitura por espectrofotometria, contagem de células, leitura de turbidez por OD manual e centrifugação e liofilização das biomassas, para saber o peso de massa seca final, foram feitas. Com isso, as análises e os testes mostraram rendimento de biomassa bem maior em MN em comparação com MA e maior crescimento dos cultivos crescidos sob luz B+C, havendo diferenças significativas em ambos os experimentos. Esses resultados permitiram demonstrar a maior eficiência dos novos módulos de cultivo de microalgas da Embrapa Agroenergia e quais luzes utilizadas geram maiores crescimentos, destacando-se também a importância de se ter condições de cultivo adequadas.

Termos para indexação: microalgas, módulos de cultivo, iluminação, biomassa.

Introdução

Em 2021, no Brasil, a estimativa de emissão de dióxido de carbono (CO₂) na atmosfera foi de mais de 488 milhões de toneladas por ano, com uma média per capita maior que duas toneladas (Ritchie; Roser; Rosado, 2020). Diante desse cenário de alta poluição, o uso de microalgas tem ganhado grande destaque por causa da alta eficiência de fixação de CO₂ por algumas linhagens. No entanto, Li (2013) destacam as dificuldades de utilização desses microrganismos, visto que eles dependem de condições ambientais, como luminosidade e aeração, adequadas que acabam elevando o custo de produção e que, quando não atendidas, diminuem a eficiência de fixação de gás e uso de recursos de crescimento.

¹ Graduanda em Biotecnologia, Universidade de Brasília, mariaeduarda12388@gmail.com

² Biotecnologista, mestre em Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, alessa.bembom@gmail.com

³ Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, Embrapa Agroenergia, daniturati@hotmail.com

⁴ Químico, mestrando em Química Inorgânica, Universidade de Brasília, samuel.n.limberger@gmail.com

⁵ Engenheiro de bioprocessos e biotecnologia, mestre em Tecnologias Químicas e Biológicas, Embrapa Agroenergia, felipe.carvalho@embrapa.br

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

Por outro lado, quando a utilização de CO₂ e energia luminosa por microalgas é eficiente, esses seres são capazes de gerar biomassa altamente rica em nutrientes e moléculas de valor agregado, como ácidos graxos, proteínas, carotenoides, vitaminas e outras. Assim, nos últimos anos, além de enriquecer a indústria alimentícia, áreas como a de produção de biocombustíveis, cosméticos, medicamentos, biorremediação e biofertilizantes (Camacho; Macedo; Malcata, 2019) também têm sido beneficiadas e têm investido em mais estudos sobre esses organismos.

Sendo assim, este trabalho consiste em um estudo sobre como o ambiente de cultivo e como fatores, como a luz, podem influenciar no crescimento de microalgas e no rendimento de biomassa. Essas análises servirão como dados que influenciam na escolha de condições de cultivo em escala de bancada e planta-piloto.

Materiais e métodos

Crescimento em meio BG11

Para os experimentos, foi utilizado o meio Blue Green 11 (BG11) e a microalga *Chlorella sorokiniana* Embrapa_LBA#39 (acesso GenBank - KM061456.1) depositada na Coleção de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias, da Embrapa (Brasília, DF). O inóculo foi retirado de cultivo-mãe mantido em crescimento em meio BG11 líquido em fotobiorreator, em temperatura e aeração constantes (22 °C e 0,4 L/min., respectivamente), e fotoperíodo de 12 horas/12 horas. Para o experimento 1, foram necessários 9.600 mL de meio BG11 e 400 mL de inóculo. Já para o experimento 2, 14.100 mL de meio e 900 mL de cultivo-mãe. O primeiro teve duração de 22 dias enquanto o segundo durou 21 dias.

Montagem dos experimentos

Comparação entre MN e MA (experimento 1)

Para comparação de produtividade entre MA e MN, 10 L de cultivo de LBA 39+BG11 foram distribuídos igualmente, 1 L para cada replicata, em cinco Erlenmeyers de MA e cinco modelos de biorreatores novos (frasco Duran GL80 de 1 L) de MN. Os cultivos de MA foram mantidos em crescimento sob luz branca (B) (lâmpada LED Tube 18W 865 T8 1850 Lúmens Glass, Philips) com fotoperíodo de 12 horas/12 horas e aeração por meio de bomba de aquário, e MN sob luzes branca (lâmpada LED GreenPower TLED W 20W MB 220-240V, 50/60Hz, Philips) e colorida (B+C) (C4 Green Power LED, C4 Biotecnologia), com fotoperíodo igual a MA, e aeração de 0,4 L/min. realizada por sistema de rotâmetros. Ambos foram mantidos na temperatura de 22 °C.

Comparação de luzes de MN (experimento 2)

Nesse experimento, apenas os biorreatores de MN foram utilizados a fim de verificar quais luzes utilizadas nos cultivos geram maior rendimento de biomassa. Para tanto, 15 L de cultivo de LBA 39+BG11 foram distribuídos igualmente entre 15 biorreatores Duran GL 80 de 1 L, todos sendo mantidos sob as mesmas condições de MN no experimento 1, exceto disposição de luz: quintuplicatas foram mantidas em crescimento sob luz B+C, outras cinco somente sob luz B e as demais somente sob luz colorida (C).

Análises de crescimento por espectrofotometria, OD manual e contagem biológica de células

As amostras dos experimentos foram analisadas em triplicata por meio de leitura, de 350 nm a 750 nm, no espectrofotômetro SpectraMax M2 da marca Molecular Devices, OD manual (*Chlorella*

vulgaris) modelo BEH100, marca BugLab e, exceto para o experimento 2, contagem biológica de células por microscopia eletrônica em Câmara de Neubauer e programa ImageJ, do National Institutes of Health (NIH), às segundas-feiras, quartas-feiras e sextas-feiras.

Coleta da biomassa

Após três semanas de experimento, os cultivos foram transferidos para tubos de 800 mL e centrifugados a 10.000 g por 5 min., com aceleração e desaceleração iguais a 9, e temperatura de 15 °C em centrífuga Hitachi. Ao término desse processo, os sobrenadantes foram descartados e os pellets de cada réplica foram lavados com água destilada, coletados e transferidos para tubos Falcon de 50 mL para então serem novamente centrifugados. Com os sobrenadantes tendo sido descartados outra vez, as biomassas restantes foram congeladas em nitrogênio líquido e submetidas à liofilização para obtenção da massa seca. Por fim, essas massas foram pesadas em balanças de precisão e armazenadas em freezer comum.

Testes estatísticos

Para ambos os experimentos, foram utilizados os programas Excel e BioEstat 5.0, sendo que para o primeiro foi feito teste T de Student, e, para o segundo, foram feitos ANOVA de um critério e teste de Tukey. O nível de significância fixado foi de $p < 0,05$.

Resultados e discussão

O crescimento de microalgas pode ser influenciado por diversos fatores, como temperatura, pH, disponibilidade de CO₂, luminosidade e outros. Diante disso, os resultados apresentados a seguir demonstram como a influência ambiental, seja pelo modelo em que diferentes módulos de cultivo foram montados e comparados seja por diferenças de luzes, pode gerar resultados heterogêneos no rendimento de biomassa.

Comparação por curvas de crescimento

Visivelmente, ou seja, sem uso de microscopia, espectrofotometria e outros equipamentos de análise, ao longo de 22 dias do experimento de comparação entre módulos, foi possível observar intensidades de coloração desiguais entre MA e MN, com o primeiro apresentando tonalidade muito mais clara que o segundo. Em contrapartida, isso não ocorreu com o segundo experimento, o que inicialmente poderia sugerir que as diferentes luzes e combinações não geraram muitas diferenças no crescimento da LBA 39 (Figura 1). Contudo, as curvas de crescimento e análises estatísticas de ambos mostraram haver diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os cultivos (Figura 2).



Figura 1. Diferenças visíveis de coloração nos cultivos de LBA 39.

A imagem à esquerda foi tirada no 18º dia do experimento e mostra branco, quintuplicatas de MN (verde-escuro) e quintuplicatas de MA (verde-claro). À direita, no 21º dia, é mostrada homogeneidade visual entre quintuplicatas tratadas com luz B, C+B e C, respectivamente. Todas as réplicas foram analisadas em triplicata.

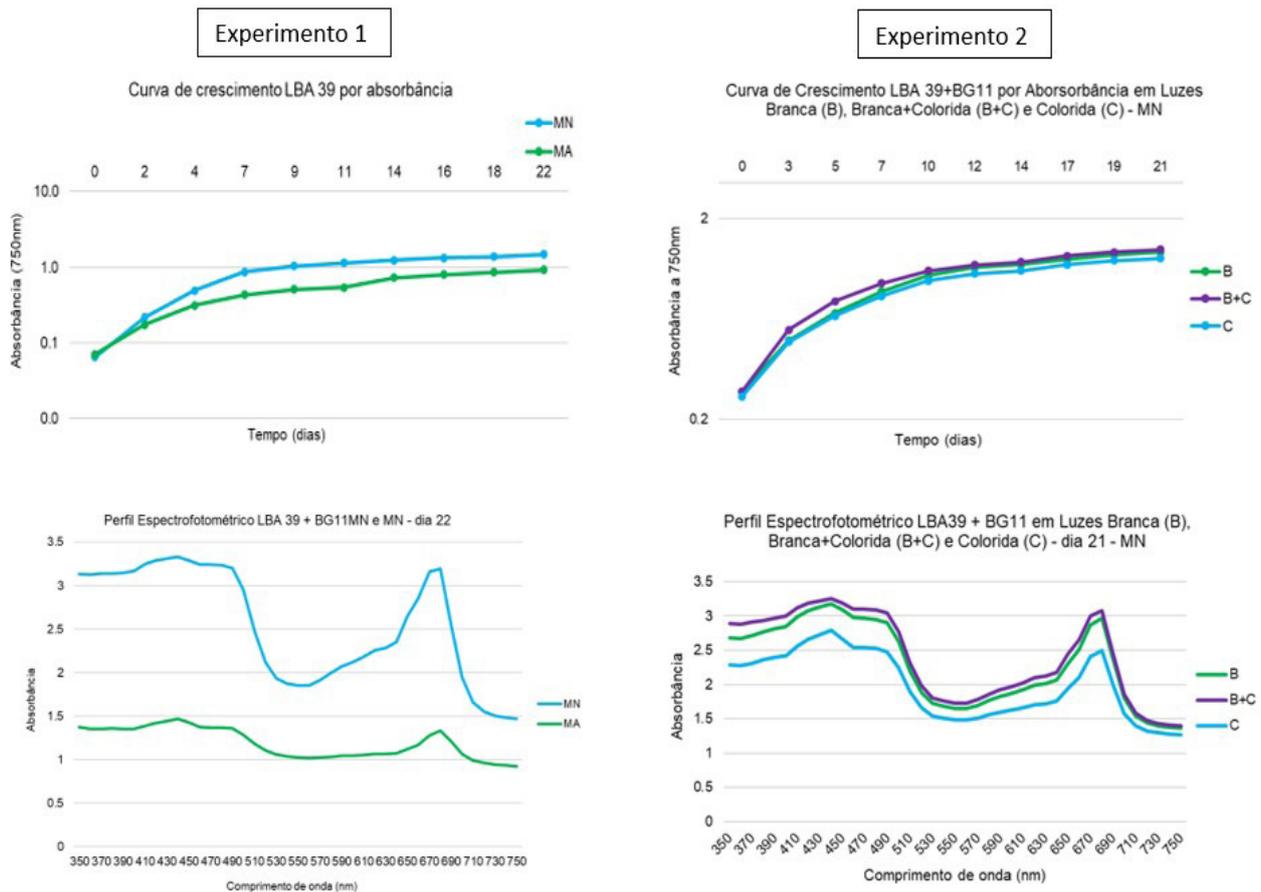


Figura 2. Curvas de crescimento de LBA 39 e perfil espectrofotométrico.

Curvas mostram médias de leitura de absorvância das replicatas totais do dia 0 ao final, com crescimento exponencial e início de fase de estabilização da curva. Curvas montadas a partir dos dados coletados por meio de OD manual e contagem de células também mostraram resultados similares, com correlações superiores a 0,8 de 1. Além disso, tanto no primeiro experimento quanto no segundo, perfil espectrofotométrico e picos nas curvas condizem com dados literários disponíveis sobre faixa de absorção de luz de principais pigmentos produzidos por microalgas, como clorofilas *a* e *b*, carotenoides, etc. Com isso, a partir do perfil observado no experimento 1, pode-se pensar que, ao propiciar o aumento do rendimento de biomassa, mais provável é que também exista maior presença de compostos de interesse associados a ela.

Rendimento de biomassa

À primeira vista, para o segundo experimento, era esperado que a luz C gerasse o maior impacto positivo no crescimento da cepa. No entanto, não foi isso que ocorreu. B sozinha gerou massa seca cerca de 10% maior que C, enquanto B+C de 20% a 30% maior que as médias de biomassa final das duas luzes quando utilizadas não combinadas. Enquanto isso, para o primeiro experimento, era esperado que a biomassa de MN fosse superior à de MA. Essa superioridade foi realmente observada (Figura 3). Valores de *p* mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$) em cada comparação.

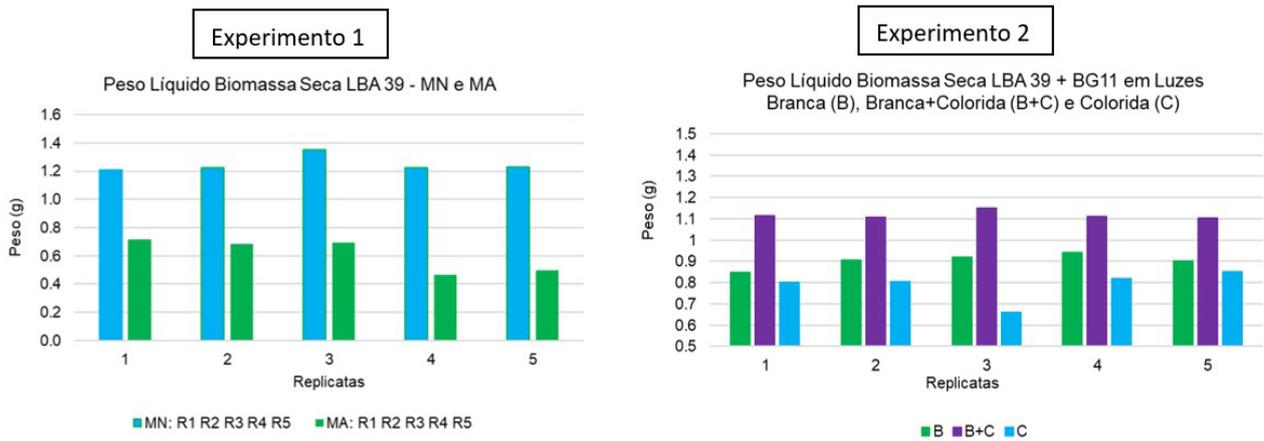


Figura 3. Biomassa seca final de LBA 39.

Conclusão

O crescimento das microalgas foi analisado em relação a diferentes condições de cultivo. Diante disso, os resultados apresentados demonstram a importância de avaliar como as condições ambientais, como a luz, podem influenciar no comportamento e no crescimento desses microrganismos. Assim, a partir deste estudo, também seria interessante avaliar como essas diferenças afetam a qualidade das biomassas geradas.

Referências bibliográficas

CAMACHO, F.; MACEDO, A.; MALCATA, F. Potential industrial applications and commercialization of microalgae in the functional food and feed industries: a short review. *Marine Drugs*, v. 17, n. 6, p. 312, 2019. DOI: 10.3390/md17060312 .

LI, S.; LUO, S.; GUO, R. Efficiency of CO₂ fixation by microalgae in a closed raceway pond. *Bioresource Technology*, v. 136, p. 267-272, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.03.025

RITCHIE, H.; ROSER, M.; ROSADO, P. CO₂ and greenhouse gas emissions, 2020. Disponível em: <https://ourworldindata.org/co2-and-greenhouse-gas-emissions>. Acesso em: 01 ago. 2023.