

## **ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CRESCIMENTO DA MICROALGA *Chlorella* sp. EM MEIO BASAL DE BOLD'S EM CULTIVO ESTACIONÁRIO.**

**Maria Célia Cavalcante de Paula e Silva<sup>1</sup>**

Bióloga (UEPB). Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental (UEPB). Doutoranda em Engenharia Ambiental (UEPB).

**José Tavares de Sousa<sup>2</sup>**

Professor Dr. do Departamento de Engenharia Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

**Howard William Pearson<sup>3</sup>**

Professor Dr. Da Universidade Federal de Campina Grande– UFCG

**Valderi Duarte Leite<sup>4</sup>**

Professor Dr. do Departamento de Engenharia Ambiental da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

Endereço(1): Av. Juvêncio Arruda, S/N. Bairro Universitário, Campina Grande – PB. Centro de Ciência e Tecnologia – CCT, CEP: 58109-790 – Brasil. Cel: +55 (83) 87606754. E-mail: [celia\\_romulo@hotmail.com](mailto:celia_romulo@hotmail.com)

### **Introdução**

Microalgas são microrganismos fotossintetizantes, portanto dotados de *Clorofila a* presentes em sistemas aquáticos ou zonas úmidas, praticamente em todas as longitudes, latitudes e altitudes do globo (BICUDO, 2005; LARKUM et al., 2012). As atenções científicas somente se voltaram para o potencial da *Chlorella* sp. no final de 1940, quando foram cultivadas em meio mineral definido, especificando-se as necessidades ambientais e nutricionais de cada espécie (HSIUAN et al., 2000).

Este estudo foi desenvolvido visando a obtenção de dados relativos ao crescimento da *Chlorella* sp., cultivada autotroficamente em meio não axênico, sob regime estacionário e condições experimentais controladas.

### **Metodologia**

O trabalho foi desenvolvido nas dependências físicas da EXTRABES (Estação Experimental de Tratamentos Biológicos de Esgotos Sanitários), pertencente à Universidade Estadual da Paraíba, na cidade de Campina Grande – PB, Região Nordeste do Brasil (7°13'11''sul, 35°52'31'' oeste e 550 m acima do nível do mar)

Isolamento da *Chlorella* sp.

As cepas de *Chlorella* sp. foram isoladas de uma série de 4 lagoas de estabilização construídas na EXTRABES, cada uma com dimensões de 1m de largura, 5m de comprimento e 0,5m de profundidade que tratavam lixiviado com alta concentração nitrogênio amoniacal. Foram coletados e centrifugados 100 mL de efluente da lagoa. As algas concentradas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo Meio Basal Bold's (BISCHOFF e BOLD, 1963; BOROWITZKA, 1988), com 2% de ágar, e mantidas por fotoperíodo de 24 horas em sala de

cultivo à temperatura de 27<sup>0</sup> C, sob iluminação de lâmpadas fluorescentes de 40 watts. Parte das culturas estoque foram acondicionadas em câmara refrigerada, a 4<sup>0</sup>C e no escuro. O meio de cultivo utilizado para o crescimento da microalga *Chlorella sp.* foi o Meio Basal Bold's (BBM), com pH do meio de 6,5. O sistema de classificação para classes e gêneros seguiu as indicações de Bicudo & Menezes (2006),

#### Curva de Crescimento

O experimento foi realizado em triplicata. Para tanto, foram utilizados três frascos erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de MBB (Meio Basal Bold's), e 2 mL de cultura de *Chlorella sp.* com 8(oito) dias. As amostras foram homogeneizadas, levadas para leitura (T0) em Câmara de Neubauer, usando-se microscópio invertido da marca OLEMAN. Esse procedimento foi repetido após 24 horas da inoculação, e, a partir da terceira leitura, a cada 48 horas, sempre no mesmo horário do inóculo inicial, totalizando oito leituras durante 14 (quatorze) dias. A contagem de células foi realizada conforme procedimento recomendado por (TAVARES e ROCHA, 2003).

#### Sistema de Cultivo Autotrófico Estacionário

As cepas de *Chlorella sp* foram cultivadas em reatores de 2L, contendo 1600 mL de Meio Basal Bold's com inserção de aeração. Os reatores foram inoculados com 32 mL de microalgas com 8 dias de cultivo, em final de fase logarítmica e iluminados por lâmpadas fluorescentes com intensidade de fótons de aproximadamente 85  $\mu\text{E}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ . As culturas estoque foram preparadas em tubos de ensaio em MBB em ágar a 2% e armazenadas na Câmaras frias a 4<sup>0</sup> C.

#### Resultados e discussão

O crescimento da *Chlorella Sp* foi determinado pelo incremento diário da densidade celular de cada uma das unidades experimentais. Os resultados obtidos são indicativos de que a *Chlorella sp.* isolada de ambientes ricos em nutrientes a exemplo de lagoas de estabilização usadas no tratamento conjugado de lixiviado, se adapta rapidamente às condições de cultivo controladas. O crescimento celular registrado com 24 horas de inoculação recebeu um incremento de aproximadamente 54%, equivalente a um aumento  $6,1775 \times 10^5$  de células/mL a partir da DCI (Densidade Celular Inicial) que foi  $5,19675 \times 10^5$  célula/mL. Esse resultado pode ser explicado pelo fato da amostra utilizada na inoculação estar em fase exponencial, o meio estava com ampla disponibilidade de nutrientes, não requerendo da célula, maior fase de aclimação.

A partir do 5<sup>0</sup> dia foram atingidos valores médios de  $1,28 \times 10^6$  células/mL, revelando estar na fase logarítmica. Resultados semelhantes de DCM (Densidade Celular Máxima) com *Chlorella vulgaris* foram obtidos por (GARCÍA-GONZÁLES et al., 2005) em cultivo estacionário e meio de cultura W.C., modificado de Guillard e Lorenzen (1972).

A maior densidade celular foi percebida entre o 6<sup>0</sup> e o 8<sup>0</sup> dias de cultivo. A fase de declínio teve início aproximadamente no 9<sup>0</sup>, uma vez que foi registrada uma redução de  $1,98 \times 10^6$  células/mL para  $1,04 \times 10^6$  células/mL. Estes resultados indicam que em condições controladas, em regime de batelada e sem aeração, a *Chlorella sp.* atinge sua velocidade

máxima de crescimento entre o 6<sup>o</sup> e 8<sup>o</sup> dia de cultivo. As culturas estoque mantidas em câmara escura mantiveram seu metabolismo preservado em um tempo superior a 12 meses.

## Conclusões

Tomando-se por base a análise dos dados deste trabalho, pode-se concluir que:

- A *Chlorella sp.* apresentou metabolismo favorável em lagoas de estabilização tratando lixiviado com alta taxa de nitrogênio amoniacal e também em condições laboratoriais controladas;
- As culturas estoque conseguiram manter seu metabolismo inalterado conservadas por até 12 meses, mantidas no escuro a 4<sup>o</sup>C.
- Em condições laboratoriais controladas, a *Chlorella sp* atingiu o crescimento máximo no 9<sup>o</sup> dia, apresentando uma DCM com um incremento de 3 (três) vezes maior que a DCI.

**Palavras-Chave:** *Chlorella sp*; Cultivo estacionário; Lagoas de estabilização.

## Referências

- BICUDO, C. E. De M; MENEZES, M. **Gêneros de Algas de águas continentais do Brasil.** São Carlos: RiMa, 2006.
- BISCHOFF, H. W.; BOLD, H. C. **Physiologic studies. IV. Some algae from Enchanted Rock and related algae species.** University of Texas Publications, v. 6318, 1963. p.1- 5.
- GARCÍA-GONZÁLEZ, M. et al. **P of Dunaliella salina biomass rich in 9-cis-βcarotene and lutein in a closed tubular photobioreactor.** Journal of Biotechnology, 2005. 115: 81-90.
- GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. 1972. **Yellow-green algae with chlorophyllid-c.** Journal of Phycology, 8: 10-14.
- HSIUAN-LIN, W.; RUEY-SHYANG, H.; LIANG-PING, L.; **Identification of Chlorella spp. Isolates using ribosomal DNA sequences,** Bot. Bull. Acad. Sin., 2001, 42:115-121
- LARKUN, A. W. D.; ROSS, I. L.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. **Selection, breeding and engineering of microalgae for bioenergy and biofuel production.** Review. Trends in Biotechnology, v.30, n.4, p.198-205, 2012.
- TAVARES, L. H. S.; ROCHA. O. **Produção de Plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para Alimentação de Organismos Aquáticos.** São Carlos. Rima. 2003 105p