

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

MARIELE BLAN OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO TAXONÔMICA DE CEPAS DE
MICROALGAS COLETADAS EM TANQUES DE PSICULTURA E
CULTIVADAS COM VINHAÇA**

Dourados/MS

2019

MARIELE BLAN OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO TAXONÔMICA DE CEPAS DE
MICROALGAS COLETADAS EM TANQUES DE PSICULTURA E
CULTIVADAS COM VINHAÇA**

Artigo escrito sob as normas da revista Ambiente e Água apresentado à Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, como defesa de Trabalho de Conclusão de Curso, para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Márcia Regina Russo.

Dourados/MS

2019

MARIELE BLAN OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO TAXÔNOMICA DE CEPAS DE MICROALGAS COLETADAS
EM TANQUES DE PSICULTURA E CULTIVADAS COM VINHAÇA**

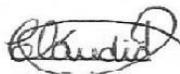
Trabalho de Conclusão de Curso aprovado
pela Banca Examinadora como requisito
parcial para obtenção do título de Bacharel
em Biotecnologia, da Universidade Federal
da Grande Dourados.

Aprovado em: 18 de outubro de 2019

BANCA EXAMINADORA



Márcia Regina Russo
Presidente



Claudia Roberta Damiani
Membro



Cleonice Cristina Hilbig
Membro

Dedico aos meus pais e minha avó, por todo amor e suporte, sem eles a realização deste sonho não seria possível.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pois sem Ele nada sou e nada suporto. Aos meus pais Márcio e Marlene por toda a base de quem sou, por serem minhas maiores inspirações, por me proporcionarem o maior amor e dedicação. À minha avó Derli pelo imenso carinho, por nunca me desamparar quando precisei e por sempre acreditar em mim, vocês são partes essenciais desta conquista. Agradeço ao Kennedy, pelo amor, paciência e incentivo durante esses anos.

À minha orientadora Márcia Russo, por todos esses anos não desistir de mim, pela oportunidade de desenvolver este trabalho sob sua orientação, por todo o apoio e o tempo que generosamente me dedicou, por toda paciência e conselhos.

Aos mestrandos Alison, Mônica e Nathy pelo suporte e esclarecimento de conhecimentos prático e teórico durante os dias de laboratório. À Professora Claudia pela grande ajuda, paciência e contribuição para o desenvolvimento deste trabalho. Ao Professor Gustavo Fonseca pelo apoio e por gentilmente ceder seu laboratório de pesquisa. Ao Professor Emerson pelo apoio, disponibilidade e na ajuda essencial da formação deste trabalho.

Às amigas, que sempre estiveram presentes nos momentos bons e ruins, que foram minha família de outra cidade. Agradeço a Natali por todos os anos de companheirismo, por estarmos juntas (quase) todos os dias dividindo a rotina. À Pamela e Aline, pelo presente da amizade já no fim da caminhada da graduação, ainda assim de grande importância, obrigado por todas as vezes que a companhia de vocês amenizara a rotina difícil da faculdade.

Agradeço às amigas que levo no coração para toda a vida, Liz, Gabriela e Emanuel por todos os anos distantes ainda manter intacto nossos laços de amizade e companheirismo. Às Marias (Maria Benvinda e Maria Carol) que, sem dúvidas, foram essenciais em todos esses anos, palavras não são suficientes para demonstrar meu agradecimento pela amizade de vocês.

Enfim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Evaluation of the taxonomic composition of microalgae strains collected in fish ponds and cultivated with vinasse

ABSTRACT

Microalgae are photosynthetic microorganisms that have been outstanding in science because they are nutritional sources. The objective of this work is to identify the taxonomic composition and growth in cultivation of microalgae strains, collected in tilapia breeding tanks, in culture media with different concentrations of sugarcane vinasse. The microalgae strains were collected in a tilapia pond in the municipality of Glória de Dourados, MS and grown in culture medium containing NPK (20-05-20) g L⁻¹ mineral supplement with different concentrations of vinasse: NPK + vinasse (1%), NPK + vinasse (10%) and N.P.K + vinasse (50%). Four strains that showed higher growth during cultivation were chosen: *Chlorella sp.*, *Scenedesmus quadricauda*, *Pediastrum duplex* and *Chroococcus sp.* The data obtained in the different treatments were analyzed in a comparative test of Tukey means at 1% of significance ($\alpha = 0,01$). Growth rate and generation time were verified. The species *Chlorella sp.* it showed the highest specific growth rate (0.181 d⁻¹) and shortest generation time (3.82 d⁻¹), followed by *Scenedesmus quadricauda*, both in the treatments with 10% concentration of vinasse. The species *Pediastrum duplex* and *Chroococcus sp.* demonstrated a much lower performance compared to the other two species. The microalgae *Chlorella sp.* and *Scenedesmus quadricauda* species showed the highest growth in concentrations of 1% and 10% of vinasse supplementation. Both strains showed expressive cell growth and consequently high biomass production.

Keywords: microalgae; cell growth; industrial waste.

Avaliação da composição taxonômica de cepas de microalgas coletadas em tanques de piscicultura e cultivadas com vinhaça

RESUMO

As microalgas são micro-organismos fotossintetizantes que vêm se destacando na ciência por serem fontes nutricionais. Este trabalho tem por finalidade identificar a composição taxonômica e o crescimento em cultivo de cepas de microalgas, coletadas em tanques de criação de tilápia, em

meios de cultivo com adição de diferentes concentrações de vinhaça de cana de açúcar. As cepas de microalgas foram coletadas em um tanque de tilápia no município de Glória de Dourados, MS e cultivadas em meio de cultura contendo suplemento mineral N.P.K (20-05-20) g L⁻¹ com adição de diferentes concentrações de vinhaça: N.P.K + vinhaça (1%), N.P.K. + vinhaça (10%) e N.P.K + vinhaça (50%). Foram escolhidas 4 cepas que apresentaram maior crescimento durante o cultivo: *Chlorella sp.*, *Scenedesmus quadricauda*, *Pediastrum duplex* e *Chroococcus sp.* Os dados obtidos nos diferentes tratamentos foram analisados em teste comparativo de médias Tukey a 1% de significância ($\alpha = 0,01$). Foram verificadas a velocidade de crescimento e o tempo de geração. A espécie *Chlorella sp.* foi a que demonstrou a maior velocidade específica de crescimento (0,181 d⁻¹) e menor tempo de geração (3,82 d⁻¹), seguida por *Scenedesmus quadricauda*, ambas nos tratamentos com concentração de 10% de vinhaça. As espécies *Pediastrum duplex* e *Chroococcus sp.* demonstraram um desempenho bastante inferior em relação as outras duas espécies. As microalgas *Chlorella sp.* e *Scenedesmus sp.* foram as espécies que demonstraram maior crescimento nas concentrações de 1% e 10% de suplementação de vinhaça. Ambas as cepas demonstraram crescimento celular expressivo e conseqüentemente alta produção de biomassa.

Palavras-chave: microalga; crescimento celular; resíduo industrial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Curva de crescimento de quatro táxons de microalgas em três tratamentos de N:P:K (10-05-20) suplementado com concentrações de 1%, 10% e 50% de vinhaça.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição de espécies e ocorrência de microalgas identificadas antes e durante o tempo de cultivo. *Concentração da vinhaça em meio N:P:K (20-05-20).

Tabela 2. Valores de taxas de crescimento e tempo de geração ($d^{-1} = \text{dia}^{-1}$) das microalgas nos tratamentos com vinhaça nas concentrações de 1%, 10% e 50%.

Tabela 3. Resultado da Análise de variância (ANOVA) para os dados de taxa de crescimento das microalgas entre os tratamentos.

Tabela 4. Valores médios de contagem de células nos dias avaliados.

Tabela 5. Valores médios de células das espécies de microalgas em função dos tratamentos (1%, 10% e 50%) obtidos pelo teste Tukey a 1% de significância ($\alpha = 0,01$).

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS	3
2.1. Microalgas	3
2.2. Cultivo	3
2.3. Análise de dados	4
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	5
4. CONCLUSÃO	11
5. REFERÊNCIAS	11

1. INTRODUÇÃO

O termo microalgas é usado para descrever um grupo de microrganismos com clorofilas e outros pigmentos fotossintetizantes, sendo eles organismos procarióticos e eucarióticos (Lee, 2008; Reynolds, 2006). Apesar desses organismos apresentarem diferenças estruturais e morfológicas, são fisiologicamente similares e capazes de realizar fotossíntese oxigênica (Walker *et al.*, 2005).

As microalgas estão presentes, geralmente em corpos de água como lagoas, mares e rios, porém também podem estar presentes nos solos (Ramirez *et al.*, 2014). Segundo Walker *et al.* (2005), as microalgas são de estruturas simples, sendo unicelulares, filamentosos ou coloniais, sua energia é direcionada à fotossíntese, crescimento e reprodução, ao invés de manter estruturas diferenciadas. Esses micro-organismos podem crescer rapidamente e vivem em condições adversas por possuírem estruturas unicelulares e multicelulares simples, sendo elas procarióticas, como por exemplo, Cyanobacteria (Cyanophyceae) e eucarióticas, por exemplo, algas verdes (Clorophyta) (Wang *et al.*, 2008).

O desenvolvimento de uma população de microalgas depende diretamente da interação entre fatores biológicos, químicos e físicos (Raven *et al.*, 1999). Os fatores biológicos referem-se às próprias taxas metabólicas da espécie em questão, assim como a possível influência de outros organismos sobre o desenvolvimento da alga, já os principais fatores físico-químicos são a luz, temperatura, pH, salinidade e disponibilidade de nutrientes, estes últimos são os que demandam maior estudo (Richmond, 2004).

Os diferentes produtos que podem ser obtidos da cultura de microalgas possuem diversas vantagens do ponto de vista da indústria, que por sua vez, levou a um aumento do interesse comercial, baseado no potencial biotecnológico destes organismos. A biomassa derivada das microalgas, é tida como uma fonte alternativa para uma ampla variedade de bioprodutos, como biocombustíveis, óleos especiais, pigmentos e polímeros (Perez-Garcia *et al.*, 2011).

O Brasil possui uma grande área de costa tropical e conta com 12% do abastecimento de água doce do mundo. Além disso, recebe níveis de luminosidade elevada e constantes ao longo do ano na maior parte do seu território. A junção destas essas características garante ao Brasil grandes vantagens para a produção em larga escala de microalgas (Brasil e Garcia, 2016).

No entanto, para o crescimento e desenvolvimento bem sucedido da microalga em um sistema de cultivo, o ambiente deve ser mantido em condições específicas, para então atender as

exigências intrínsecas desses organismos, assim fornecendo os nutrientes necessários para o crescimento e a síntese celular (Sipaúba-Tavares e Rocha, 2001).

São desenvolvidos diferentes meios de cultura para o cultivo de algas, sendo que nos meios sintéticos, possuem elevados custos de aquisição acabam se tornando um empecilho para a produção. Os custos com reagentes químicos constituem um dos maiores problemas do cultivo de microalgas (Sipaúba-Tavares, 1995).

Uma alternativa para baixar esse custo para cultivos comerciais de microalgas é o uso de efluentes residuais como base para o meio de cultivo. Um exemplo disso é a vinhaça de cana-de-açúcar, esse resíduo é rico em nutrientes minerais como o potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) (Silva *et al.*, 2007). A vinhaça é um resíduo que se constitui em um líquido espesso, turvo e com quantidade elevada de material particulado, sendo oriundo da destilação do caldo de cana-de-açúcar fermentado para a produção de etanol e açúcar. São produzidos de 12 a 18 L de vinhaça por litro de etanol gerado (Embrapa, 2019).

Em pesquisa pioneira, Oliveira (1988) observou o crescimento de *Chlorella vulgaris* em meio contendo vinhaça, mostrando a viabilidade de cultivo mixotrófico da espécie com até 0,3% de vinhaça. Nos últimos anos estudos mostram o caráter promissor ao uso da vinhaça como meio de cultivo para microalgas. Ramirez *et al.*, (2014) cultivaram *Scenedesmus sp.* em diferentes concentrações de vinhaça e obtiveram crescimento algal em concentrações de até 40% de vinhaça.

De acordo com a BioSul (Associação dos Produtores de Bioenergia do Mato Grosso do Sul), o Estado conta com 19 unidades de indústrias sucroenergéticas em operação. Até a segunda quinzena de fevereiro de 2019, a produção de cana-de-açúcar para a safra de 2018/2019 havia alcançado 47,4 milhões de toneladas no Estado. Diversos estudos demonstram os benefícios do uso deste resíduo, a vinhaça, como fonte alternativa de nutrientes para microalgas e, por consequência, beneficiando também a produção de alevinos de peixes, como forma de alimentação nas fases iniciais.

Segundo Buri (1978) as microalgas constituem a base das cadeias alimentares aquáticas, pois servem de alimento para uma grande parcela de animais aquáticos invertebrados e vertebrados, transformando a matéria orgânica provenientes das atividades de outros seres vivos em minerais como amônia, nitrito, nitrato e fosfato. Essas características tornam esses micro-organismos, especialmente os fotossintetizantes, de grande importância para a aquicultura (Lourenço, 2006).

Napolitano (1998) diz que as algas de água doce apresentam grandes quantidades de ácido graxo linoleico (AL) e ácido graxo linolênico (ALN), entretanto, espécies dos grupos Cyanophyta e Chlorophyta apresentam altos níveis de ômega 3 insaturados de cadeia longa (n-3n HUFA), como ácido graxo eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA), ambos ácidos graxos essenciais para a nutrição humana e animal. Em geral, peixes de água doce demonstram ter uma maior capacidade de alongar e dessaturar ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) de cadeia curta. Com isso, convertem alimento de menor valor nutricional em alimento com maior valor nutricional (Moreira *et al.*, 2001)

O presente estudo teve por finalidade a avaliar a composição taxonômica, crescimento e desenvolvimento de cepas de microalgas coletadas em tanque de criação de Tilápia (*Oreochromis niloticus*) em meios de cultivo com adição de diferentes concentrações de vinhaça de cana de açúcar.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microalgas

As microalgas foram coletadas em tanque lonado de produção de tilápia (*Oreochromis niloticus*) no município de Glória de Dourados, Mato Grosso do Sul (22°24'49''S, 54°15'40''W). Para a coleta utilizou-se uma garrafa de Van Dorn que foi preenchida com 2 litros de amostra de um local central do tanque. No laboratório, a identificação taxonômica até o menor nível taxonômico possível foi feita com literatura especializada (Bicudo, 2017) e com auxílio de microscópio óptico.

2.2 Cultivo

Para o cultivo utilizou-se o suplemento mineral N.P.K (20-05-20 g L⁻¹) na proporção 20% nitrogênio, 5% potássio e 20% fósforo, preparou-se a solução estoque de 0,70 g L⁻¹ do composto triturado para cada 1,0 L de água. Posteriormente foram aplicadas diferentes concentrações de resíduo industrial de vinhaça. As microalgas foram cultivadas em meio de cultivo N.P.K. em erlenmeyers de 250 m L com volume útil de 200 m L, com três concentrações de vinhaça, totalizando três tratamentos. Os meios de cultivos foram distribuídos em: N.P.K + vinhaça 1% (1:100 m L); N.P.K + vinhaça 10% (10:100 m L); N.P.K. + vinhaça 50% (50:100 m L).

A amostra do tanque de piscicultura foi deixada em suspensão por três dias e inoculou-se 1:100 m L do volume do meio. Os ensaios foram feitos com 6 repetições de cada tratamento.

Os erlenmeyers foram mantidos em prateleiras com fotoperíodo de 12h luz / 12h escuro, provido por lâmpadas branca fluorescentes de 40W, em temperatura ambiente de aproximadamente 25°C, com aeração constante durante 21 dias.

2.3 Análise de dados

Durante o experimento a determinação de densidade celular foi feita através da contagem de células na câmara de Neubauer, com o auxílio de microscópio, foram contabilizados as células contidas nos 4 campos e depois feito a média da contagem, quando havia grande quantidade de células por quadrante foi realizada a diluição, a avaliação foi feita num período de 21 dias com intervalo de 3 dias para cada leitura. Após este período verificou-se qual espécie de microalga manteve seu crescimento por mais tempo e qual concentração de vinhaça proporcionou melhor desenvolvimento das microalgas.

Foram elaboradas curvas do crescimento algal em função do tempo experimental, sendo obtido os valores de velocidade específica de crescimento e tempo de geração. A velocidade específica foi calculada seguindo a equação matemática (1) de acordo com Hiss *et al.* (2001):

$$\mu_x = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} = \left(\frac{Xf - Xi}{tf - ti} \right) \cdot \frac{1}{X} \quad (1)$$

Sendo: Xi e Xf: Concentração de células no tempo inicial e final, respectivamente.

ti e tf: tempo inicial e final, respectivamente

X: Concentração de células no tempo t.

Russo (2011) definiu o tempo de geração (t_g) como o tempo necessário para se dobrar a concentração de células na fase *Log*. Matematicamente é expressado como (2),

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_x} \quad (2)$$

Sendo: ln 2 uma constante já estabelecida.

Para a avaliação de diferenças estatísticas entre os tratamentos e dados de taxa de crescimento foi aplicada a Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste Tukey a 1% de significância ($\alpha = 0,01$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostra coletada no tanque de criação de tilápia foi previamente analisada antes de seu inóculo no meio de cultivo com N.P.K (20-05-20) e vinhaça. Foram identificados os táxons mostrados na tabela 1.

Tabela 1. Composição de espécies e ocorrência de microalgas identificadas antes e durante o tempo de cultivo. *Concentração da vinhaça em meio N:P:K (20-05-20).

Táxons	Pré-experimento	Durante		
		1%*	10%*	50%*
<i>Chlorella sp.</i>	P	P	P	P
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	P	P	P	P
<i>Scenedesmus acuminatus</i>	A	P	P	A
<i>Pediastrum duplex</i>	P	P	P	P
<i>Microsystis sp.</i>	A	P	P	A
<i>Monoraphidium sp.</i>	A	P	A	A
<i>Planktothrix mougeotii</i>	A	A	A	P
<i>Chlamydomonas sp.</i>	P	A	P	A
<i>Chroococcus sp.</i>	A	P	P	P

Nota: P = presença; A = ausência

Observou-se que algumas espécies identificadas durante o período de pré-tratamento não se desenvolveram nos tratamentos (Tab. 1), por essa razão foram selecionados 4 táxons que apresentaram constante crescimento em todos os tratamentos: *Chlorella sp.*, *Scenedesmus quadricauda*, *Pediastrum duplex* e *Chroococcus sp.*

A partir dos resultados sobre as velocidades específicas de crescimento foi possível observar que a microalga do gênero *Chlorella sp.*, apresentou maior crescimento nos meios de cultivo com adição de 1% e 10% de vinhaça, sendo o tratamento com 10% o que promoveu maior velocidade específica de crescimento de $0,221 \text{ d}^{-1}$ e tempo de geração de $3,12 \text{ d}^{-1}$ (Tab 2). Segundo Sung *et al.* (1999), a *Chlorella sp.* apresenta uma velocidade específica de crescimento quase constante em valores de pH acima de 4,2 e devido a este motivo ela cresce rapidamente e demonstrou um crescimento expressivo.

A espécie *Scenedesmus quadricauda* por sua vez, demonstrou alto crescimento em todos os tratamentos, ainda que inferior a *Chlorella sp.* (Tab. 2). Segundo Xin *et al.* (2011), o gênero *Scenedesmus sp.* se adapta a uma gama extensiva de temperatura (10 a 30 °C), sendo 20 °C a temperatura ideal para produzir biomassa microalgal e lipídeos. Becker (1994) relata que o gênero

Scenedesmus sp. apresenta em sua composição química até 40% de conteúdo lipídico, 56% em proteínas e 52% de carboidratos. A microalga *Scenedesmus sp.* é de fácil obtenção, além de ser amplamente utilizada como alimento para os microcrustáceos, é também utilizada em ensaios de ecotoxicologia (Miranda, 2011).

Tabela 2. Valores de taxas de crescimento e tempo de geração ($d^{-1} = dia^{-1}$) das microalgas nos tratamentos com vinhaça nas concentrações de 1%, 10% e 50%.

Espécie	Tratamentos					
	1%		10%		50%	
	μ_x (d^{-1})	Tg (d^{-1})	μ_x (d^{-1})	Tg (d^{-1})	μ_x (d^{-1})	Tg (d^{-1})
<i>Chlorella sp.</i>	0,210	3,29	0,221	3,12	0,136	5,08
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	0,166	4,15	0,176	3,93	0,116	5,96
<i>Pediastrum duplex</i>	0,061	11,33	0,024	27,75	0,001	349,32
<i>Chroococcus sp.</i>	0,087	7,94	0,095	7,23	0,051	13,55

Nota: μ_x = velocidade específica de crescimento; Tg = tempo de geração.

Em estudo realizado por Ramirez (2013), foi observado que a microalga *Scenedesmus sp.* conseguiu crescer em cultivos suplementados com porcentagens de 0% a 50% de vinhaça de cana-de-açúcar. Foi constatado que é possível cultivar microalgas em vinhaça, porém com o crescimento da biomassa microalgal inferior se comparado a meios de cultivos sintéticos (Meio Guillard Modificado). Neste estudo no meio com concentração de 50% de vinhaça o crescimento foi baixo, provavelmente isso se deva a coloração escura da vinhaça causada pela presença de material particulado, que pode ter dificultado a penetração de luz e inibido o crescimento das microalgas.

Para a microalga *Chroococcus sp.* o crescimento foi superior em meio de cultivo suplementado com 10% de vinhaça, com o valor de velocidade específica de crescimento de 0,095 d^{-1} e com menor tempo de geração entre os três tratamentos, com o valor de 7,23 d^{-1} (Tab 2), no entanto com o meio de cultivo suplementado com 1% de vinhaça não foi possível observar diferenças significativas com o valor de velocidade específica de crescimento e tempo de geração de 0,087 d^{-1} e 7,94 d^{-1} , respectivamente. No tratamento com suplementação de 50% de vinhaça os valores observados foram inferiores quando comparado aos outros tratamentos.

A microalga *Pediastrum duplex* teve o crescimento bastante inferior aos outros táxons, seu maior crescimento foi no tratamento com suplementação de 1% de vinhaça, com o valor de 0,061 d^{-1} de velocidade de crescimento e tempo de geração de 11,33 d^{-1} (Tab 2). O desenvolvimento da microalga no meio de cultivo com a suplementação de 50% de vinhaça apresentou o valor de 0,001 d^{-1} de velocidade específica de crescimento e tempo de geração de 349,32 d^{-1} , demonstrando um

desenvolvimento bastante inferior se comparado aos outros tratamentos. Em estudo realizado por Park (2014) sobre a microalga *Pediastrum duplex*, verificou-se que sob condições de alta luminosidade e temperatura de 20°, simulando condições do verão, o tempo necessário para as colônias atingirem a maturidade reprodutiva foi de 52 h (2,2 dias), no entanto sob condições de baixa luminosidade no verão (alta temperatura, porém baixa intensidade de luminosidade) aumentou para 132 h (5,5 dias). Da mesma forma, o tempo necessário para atingir a maturidade reprodutiva em condições simuladas de inverno (baixa temperatura, 10 ° C) aumentou de 114 h (4,7 dias) sob alta luminosidade, para 307 h (12,8 dias) sob baixa luminosidade, portanto, é possível constatar que a luminosidade e temperatura tem grande influência sobre o crescimento desta espécie.

Tabela 3. Resultado da Análise de variância (ANOVA) para os dados de taxa de crescimento das microalgas entre os tratamentos.

Espécie	F	Probabilidade (%)
<i>Chlorella sp.</i>	7,3776	0,8140**
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	7,6628	0,7172**
<i>Pediastrum duplex</i>	21,8698	0,0096**
<i>Chrocooccus sp.</i>	11,5611	0,1590**

Nota: **: 99% de probabilidade.

Foi observado (Tab. 3) que houve diferenças significativas entre os tratamentos em todas as espécies avaliadas, a probabilidade (%) representa o valor-p 0,01, portanto as quatro espécies apresentaram valores inferiores a 0,01, assim aceita-se a hipótese de que os tratamentos exerceram efeitos diferentes ao crescimento celular das espécies.

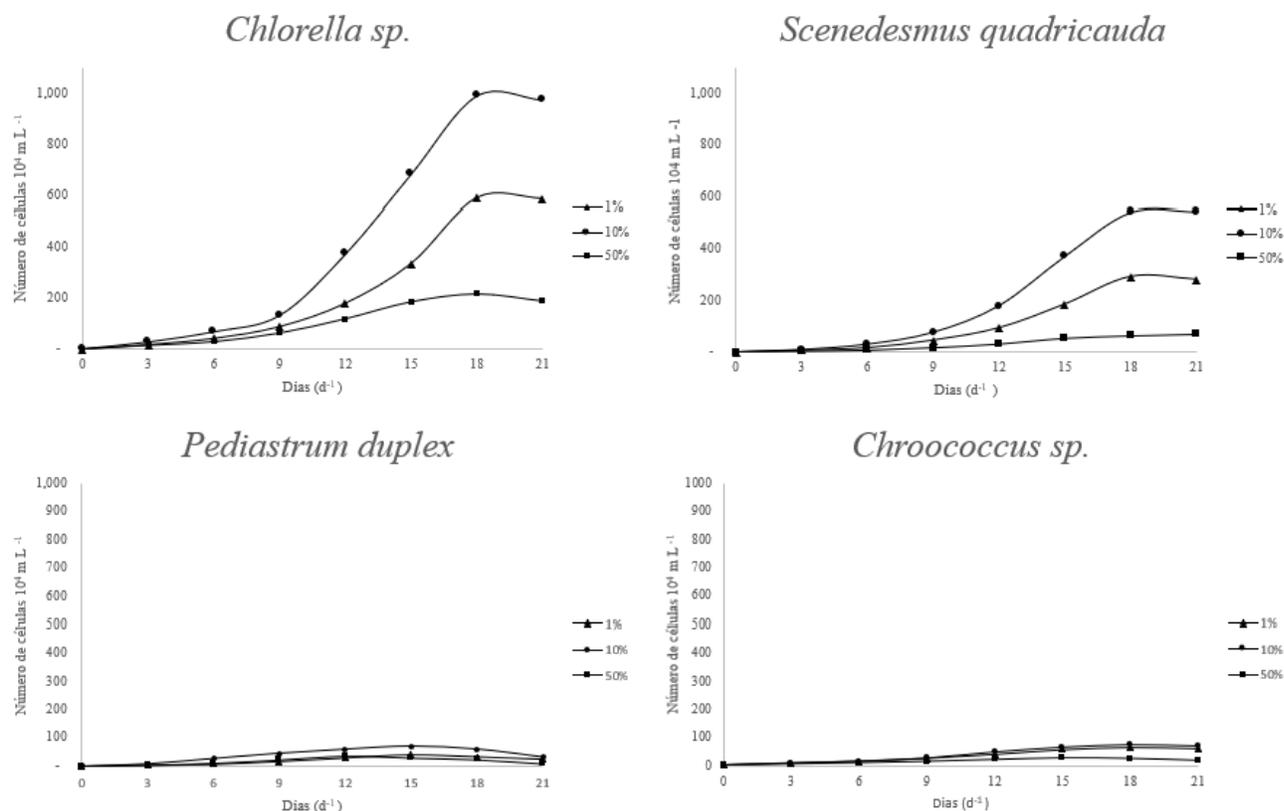


Figura 1. Curva de crescimento de quatro táxons de microalgas em três tratamentos de N:P:K (20-05-20) suplementado com concentrações de 1%, 10% e 50% de vinhaça.

A microalga *Chlorella sp.* demonstrou elevado crescimento se comparado as outras cepas (Fig. 1), isso se deve ao fato de uma possível dominação desta espécie no meio de cultivo. De acordo com Sakai *et al.* (1995) a *Chlorella sp.* possui grande vantagem em relação a outras microalgas, devido sua alta tolerância a variações de temperatura, concentração de CO₂ e pH, sendo sua produção simples e sem exigências um meio de cultivo complexo. A *Chlorella sp.* é uma microalga de água doce utilizada em tratamentos de águas residuais em condições heterotróficas e aeróbias escuras (Lúcio, 2014), sendo capaz de se multiplicar em cultivos com turbidez elevada, como é o caso do cultivo em meio suplementado com 50% de vinhaça. A microalga *Scenedesmus quadricauda* também demonstrou um crescimento satisfatório, ainda que inferior a microalga *Chlorella sp.*

As microalgas *Pediastrum duplex* e *Chroococcus sp.* demonstraram crescimento inferior se comparada as duas cepas anteriores (Fig 1), isso provavelmente se deve à sua lenta adaptação ao meio de cultura e também, como foi citado anteriormente, ao rápido ciclo de vida da microalga *Pediastrum duplex* nas condições luminosas e de temperatura em que foi submetida.

Nas culturas de microalgas a dominância pode depender dos predadores, da adaptação ao meio, das necessidades de alimentação ou da razão N:P:K (Richmond, 2004). Ao fim de 15 dias de incubação foi encontrado protozoários presentes no cultivo, isso se deve possivelmente pelo fato de ter sido utilizada a vinhaça em sua forma bruta. Em estudo realizado por Santana (2017), revelou que em cultivos com altas concentrações de vinhaça ocorreu crescimento significativo de contaminantes, especialmente fungos filamentosos e protozoários, também notou questões negativas relacionadas a baixa transmissão de luz para o meio de cultivo com a presença de grande concentração de vinhaça.

Tabela 4. Valores médios de contagem de células nos dias avaliados.

Espécie	Tempo (dias d ⁻¹)						
	3	6	9	12	15	18	21
<i>Chlorella sp.</i>	21,2 a	47,7 a	95,9 a	225,5 a	402,7 a	599,8 a	584,1 a
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	7,7 ab	19,2 b	47,7 b	103,7 b	205,2 b	300,4 b	299,3 b
<i>Chrocooccus sp.</i>	6,9 ab	13 b	22,3 c	37,1 c	50,6 c	56,2 c	50,6 c
<i>Pediastrum duplex</i>	5,8 a	15 b	27,9 c	39,8 c	44,7 c	34,5 d	20,7 d

Nota: Valores seguidos pelas mesmas letras minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si.

A partir da Tabela 4 pode se observar que a microalga *Chlorella sp.* foi a que demonstrou alta densidade celular em todas as análises, seguida pela espécie *Scenedesmus quadricauda*, as espécies *Chrocooccus sp.* e *Pediastrum duplex* demonstraram baixa densidade se comparado às outras espécies. É possível observar o crescimento significativo do 9° ao 12° dia de análise, que se dá pela fase de crescimento das células, no 21° dia a quantidade de células diminui, isso se deve ao fato da célula atingir a fase de declínio onde ocorre a lise celular, provavelmente devido ao esgotamento de nutrientes presentes no meio de cultivo.

Tabela 5. Valores médios de células das espécies de microalgas em função dos tratamentos (1%, 10% e 50%) obtidos pelo teste Tukey a 1% de significância ($\alpha = 0,01$).

Espécie	Tratamentos (%)		
	1	10	50
<i>Chlorella sp.</i>	263,3 aB	466,1 aA	117,8 aC
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	132,7 bB	252,3 bA	36,2 bC
<i>Chrocooccus sp.</i>	39,2 cA	44,6 cA	17,7 cB
<i>Pediastrum duplex</i>	21,2 dB	42,8 cA	16,6 cB

Nota: Valores em uma mesma linha, seguidos por letras maiúsculas idênticas não diferem entre si, enquanto valores em uma mesma coluna, seguidos por letras minúsculas não diferem entre si.

A microalga *Chlorella sp.* obteve maior crescimento no tratamento a 10% de concentração de vinhaça, seguido pelo tratamento a 1% (Tab. 5). O mesmo aconteceu com a microalgas *Scenedesmus quadricauda*, portanto, para estas duas espécies o tratamento a 10% de concentração de vinhaça proporcionou o maior crescimento celular, seguido pelo tratamento a 1%. A microalga *Chrocooccus sp.* demonstrou maior crescimento nas concentrações a 1% e 10% de vinhaça, sendo estatisticamente iguais. A microalga *Pediastrum duplex* demonstrou o maior crescimento a 10% de concentração de vinhaça, sendo as concentrações de 1% e 50% estatisticamente iguais, que proporcionaram um crescimento celular inferior. Observou-se que o tratamento a 50% de concentração de vinhaça foi o que proporcionou menor crescimento nas quatro espécies.

Entre as espécies a que melhor se adaptou e teve maior crescimento nos tratamentos de 1%, 10% e 50% foi a microalga *Chlorella sp.*, seguida pela *Scenedesmus quadricauda* (Tab. 5), as espécies *Chrocooccus sp.* e *Pediastrum duplex* demonstraram o crescimento inferior, sendo esta última espécie a que demonstrou menor crescimento no tratamento a 1% de concentração de vinhaça.

Um estudo realizado por Barrocal (2010), mostrou que a adição da vinhaça em meios de cultivo apresentou um efeito positivo sobre o crescimento das microalgas como fonte alternativa de nutrientes, o que pode gerar um alto valor por produtos. O excelente desempenho da vinhaça como fonte alternativa nutricional é promissor, pois segundo Andrade e Costa (2008), as microalgas necessitam de nutrição relativamente simples. Além disso, a composição da vinhaça apresenta grande quantidade de matéria orgânica, e elementos como nitrogênio, fósforo e potássio, além de outros macro e micro nutrientes (Cabello *et al.*, 2009) contemplando portanto, o grupo N:P:K.

As culturas com suplementação de vinhaça, apresentaram contaminações por protozoários, mostrando ser necessário um pré-tratamento deste resíduo para obter um resultado mais satisfatório. O tratamento com a suplementação de 50% de vinhaça mostrou um desempenho inferior do crescimento celular em relação aos outros tratamentos, também apresentou contaminações por fungos e protozoários, ao longo do cultivo e baixa luminosidade ao meio de cultura, o que pode ter sido prejudicial para o desenvolvimento do ciclo celular das microalgas.

Acredita-se que o uso de microalgas durante o primeiro processo de alimentação promove melhorias as condições nutricionais do alevino de peixe, seja diretamente (Moffatt, 1981) ou através da melhoria do valor nutricional dos rotíferos usado como alimentação viva destes alevinos (Scott e Middleton, 1979; Lubzens, 1987). Em estudo feito por Reitan, (1997) a adição de microalgas aos tanques de primeira alimentação, juntamente com os rotíferos, melhorou o crescimento e a sobrevivência de alevinos, enquanto o enriquecimento a curto prazo de rotíferos com algas não melhorou o crescimento e a sobrevivência das larvas em tanques sem adição de algas.

4. CONCLUSÃO

As microalgas *Chlorella sp.* e *Scenedesmus quadricauda* foram as espécies que demonstraram maior crescimento nas concentrações de 1% e 10% de suplementação de vinhaça. Ambas as cepas demonstraram crescimento celular expressivo e conseqüentemente alta produção de biomassa.

O uso da vinhaça como suplemento, juntamente ao N:P:K como meio de cultura para o cultivo de microalgas, demonstrou ser uma boa opção para o cultivo das microalgas, obtidas a partir de amostras da flora de microalgas que crescem naturalmente nos tanques de piscicultura. As vantagens são o baixo custo e a riqueza de nutrientes da vinhaça.

5. REFERÊNCIAS

- ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutriente. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 32, n. 5, p. 1551-1556, 2008.
- BARROCAL, V. M.; GARCÍA-CUBERO, M. T.; GONZÁLES-BENITO, G. Production of biomass by *Spirulina maxima* using sugar beet vinasse in growth media. **New Biotechnology**, v. 27, n. 6, p. 851-856, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.07.001>
- BECKER, E. Wolfgang. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. Cambridge University Press, 1994.
- BIOSUL. Mapa da Bioenergia – Mato Grosso do Sul. Disponível em <http://biosulms.com.br/estatistica/mapa-da-bioenergia-mato-grosso-do-sul/>. Acesso em 01 julho de 2019.
- BICUDO, Carlos Eduardo; MENEZES, Mariângela (Ed.). **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições**. Rima, 2017.

- BRASIL, B. S. A. F.; GARCIA, L.C. Microalgas: Alternativas promissoras para a indústria. **Embrapa Agroenergia em revista: microalgas**. Brasília, DF, v. 4, n. 10, p. 6-11, 2016.
- BURI, P. The potencial of algal culture in aquacultural enterprises. **Arch Hydrobiol**. Stuttgart, v.11, p. 121-126, 1978.
- CABELLO, P. E.; SCOGNAMIGLIO, F. P.; TERÁN, F. J. C. Tratamento de vinhaça em reator anaeróbio de leito fluidizado. **Engenharia Ambiental**, v. 6, n. 1, p. 321-338, 2009.
- EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Agência EMBRAPA de Informação Tecnológica. Processamento da cana-de-açúcar. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_108_22122006154841.html. Acesso em: 17 junho de 2019.
- HISS, H. SCHMIDELL, W. LIMA, U. A. AQUARONE, E. BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. Volume 2. Editora Edgard Blucher LTDA. 562p., 2011.
- LEE, R. E. **Phycology**. 4th Ed. Cambridge University Press. USA. 2008.
- LOURENÇO, S.O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 606 p., 2006.
- LUBZENS, E. Raising rotifers for use in aquaculture. In: **Rotifer Symposium IV**. Springer, Dordrecht, p. 245-255, 1987. https://doi-org.ez50.periodicos.capes.gov.br/10.1007/978-94-009-4059-8_33
- LÚCIO, M. J. **Cultivo de microalgas *Chlorella vulgaris* com efluente doméstico como meio de cultura alternativo**. Monografia (Graduação) Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 71 p., 2014.
- OLIVEIRA, H. T. **Utilização de vinhaça como meio de cultura para *Chlorella vulgaris* (CCAP – 211 / 11b)**. Tese. (Doutorado do Programa em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), 1988.
- MIRANDA, João Ricardo Pereira de Cabral. **Produção de bioetanol a partir da microalga *Scenedesmus obliquus***. Dissertação. (Mestrado em Energia e Bioenergia) – Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2011.
- MOFFATT, N.M. Survival and growth of northern anchovy larvae on low zooplankton densities as affected by the presence of a *Chlorella* bloom. **RappP-VRéunConsint Explor**, v. 178, p. 475-480, 1981.

- MOREIRA, A. B. et al. Fatty acids profile and cholesterol contents of Three Brazilian Brycon freshwater fishes. **Journal Food Composition and Analysis**, v.14, p.565-574, 2001. <https://doi.org/10.1006/jfca.2001.1025>
- NAPOLITANO, G. E. Fatty acids as trophic and chemical markers in freshwater ecosystems. In: **Lipids in freshwater ecosystems**, Springer, New York, NY, p. 21-44, 1998. https://doi-org.ez50.periodicos.capes.gov.br/10.1007/978-1-4612-0547-0_3
- PARK, J. BK; CRAGGS, R. J.; SHILTON, A. N. Investigating the life-cycle and growth rate of *Pediastrum boryanum* and the implications for wastewater treatment high rate algal ponds. **Water research**, v. 60, p. 130-140, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.04.028>
- PEREZ-GARCIA, Octavio et al. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. **Water research**, v. 45, n. 1, p. 11-36, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>
- RAMIREZ, N. N. V.; FARENZENA, M.; TRIERWEILER, J. O. Growth of microalgae *Scenedesmus sp.* in ethanol vinasse. **Brazilian archivement biology technology**, Curitiba, v. 57, n. 5, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-8913201401791>
- RAMIREZ, N. N. V. **Estudo do Crescimento da Microalga Scenedesmus sp. Vinhaça**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.
- REITAN, K.; RAINUZZO, J. R.; OIE, G.; OLSEN, Y. A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. **Aquaculture**, v. 155, n. 1-4, p. 207-221, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(97\)00118-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00118-X)
- REYNOLDS, C. S. **Ecology of phytoplankton**. Cambridge University Press, Cambridge. 536p. 2006.
- RICHMOND, A. (Ed). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Oxford: **Blackwell Science**. p. 566, 2004.
- RUSSO, D. A. M. T. **Estudo do crescimento da microalga Chlorella vulgaris numa água residual tratada, sob diferentes condições de fotoperíodo e temperatura**. 111f. Tese. (Doutorado em Energia e Bioenergia) – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2011.
- SAKAI, N; SAKAMOTO, Y.; KISHIMOTO, N; CHIHARA, M; KARUBE, I. Chlorella strains from hot springs tolerant to high temperature and high CO₂. **Energy Conversion and**

Management, v. 36, n. 6-9, p. 693-696, 1995. [https://doi.org/10.1016/0196-8904\(95\)00100-R](https://doi.org/10.1016/0196-8904(95)00100-R)

SANTANA, H.; CEREIJO C. R.; TELES, V. C.; NASCIMENTO, R. C. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: selection, growth and biochemical characterization. **Bioresource technology**, v. 228, p. 133-140, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.075>

SCOTT, A.P.; MIDDLETON, C. Unicellular algae as a food for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae - the importance of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids. **Aquaculture**, v. 18, n. 3, p. 227-240, 1979.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H.S. **Limnologia aplicada à aquicultura**. Jaboticabal: Funep. 72 p., 1995.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. & ROCHA. **Produção de Plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para Alimentação de Organismos Aquáticos**. São Carlos: Editora RiMa. 106 p, 2001.

SUNG, K.D.; LEE, J.S.; PARK, S.C.; CHOI, M.J. CO₂ fixation by *Chlorella* sp. KR-1 and its cultural characteristics. **Bioresource Technology**, v. 68, n. 3, p.269 - 273, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00152-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00152-7)

WALKER, T.; PURTON, S.; BECKER, D.; COLLET, C. Microalgae as bioreactors. **Plant Cell Reports**, v. 24, n. 11, p. 629-641, 2005. <https://doi-org.ez50.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s00299-005-0004-6>

WANG, B.; LI, Y.; WU, N.; LAN, C. CO₂ bio-mitigation using microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 5, p. 707-718, 2008. <https://doi-org.ez50.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s00253-008-1518-y>

XIN, Li; HONG-YING, Hu; YU-PING, Zhang. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. **Bioresource technology**, v. 102, n. 3, p. 3098-3102, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.055>