

# CRESCIMENTO DE *Scenedesmus acuminatus* (LAGERHEIM) CHODAT EM MEIO DE CULTURA À BASE DE NPK E EXTRATO DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS

Raissa Hirle KRETTLE<sup>1</sup>; Valéria de Oliveira FERNANDES<sup>1</sup>; Camilo DIAS JÚNIOR<sup>2</sup>

## Resumo

O objetivo do trabalho foi testar a influência de seis meios de cultura alternativos (um a base de NPK, dois contendo extrato de *Pistia stratiotes* e *Eichhornia crassipes* enriquecido de NPK, e outros três com diferentes diluições de extrato puro de *E. crassipes*, (Eic 40, Eic 85, Eic 130) em comparação ao meio de cultura comercial ASM-1, no desenvolvimento da microalga *Scenedesmus acuminatus*. Foram avaliados taxa de crescimento (K), densidade, volume celular, biovolume e qualidade nutricional dos meios de cultura. Os meios de cultura testados apresentaram concentração de nutrientes suficiente para o crescimento da microalga. A taxa de crescimento de ASM1 (0,439) foram similares ( $p > 0,05$ ) a NPK, Pis + NPK e Eic + NPK. Eic 85 e Eic 130 apresentaram os valores mais baixos (0,201; 0,150, respectivamente) e similares entre si. Os volumes dos tratamentos não diferiram de ASM1 ( $135,427 \mu\text{m}^3$ ), somente o Eic NPK e Eic 130 apresentaram valores menores ( $86,780$  e  $100,401 \mu\text{m}^3$ , respectivamente). O maior biovolume e densidade celular foram encontrados em Eic NPK ( $1,273 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$  e  $1047 \times 10^4 \text{ cél} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). Conclui-se que os tratamentos apresentaram capacidade de nutrição muito similar ao ASM1, podendo substituí-lo no cultivo de *S. acuminatus*. Em especial Eic + NPK que apresentou maior densidade e biovolume. Os tratamentos com extrato puro, apesar de apresentarem resultados mais baixos, ainda assim possibilitaram o desenvolvimento da alga e com custo zero.

**Palavras-chave:** Cultivo, microalga, macrófitas, NPK

## Abstract

The objective of this work was to test the influence of six alternative culture media (one of NPK, two containing *Pistia stratiotes* and *Eichhornia crassipes* extracts enriched with NPK, and three with different dilutions of pure extract of *E. crassipes* (Eic 40, Eic 85, Eic 130) compared to the commercial culture medium ASM-1 in the development of the

microalga *Scenedesmus acuminatus*. Growth rate (K), density, cell volume, biovolume and nutritional quality of culture media were evaluated. The tested media had enough concentration of nutrients for the growth of microalgae. The growth rate of ASM1 (0.439) were similar ( $p > 0.05$ ) to NPK, NPK + Pis and Eic + NPK. Eic 85 and Eic 130 had the lowest values (0.201; 0.150, respectively) and similar to each other. The volumes of the treatments did not differ to ASM1 ( $135.427 \mu\text{m}^3$ ), only Eic + NPK and Eic 130 had lower values (86.780 and  $100.401 \mu\text{m}^3$ , respectively). the highest biovolume and cell density were found in Eic + NPK ( $1.273 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$  and  $1047 \times 10^4 \text{ cél.mL}^{-1}$ ). It was concluded that the treatments had very similar nutritional ability to ASM1 and may replace it in the cultivation of *S. acuminatus*. In particular Eic + NPK with the highest density and biovolume. The treatments with pure extract, despite having lower results, still allowed the development of algae and at zero cost.

**Keywords:** Culturing, microalgae, macrophytes, NPK

## Introdução

As microalgas vêm sendo isoladas do ambiente e cultivadas para diversos fins, não só com objetivos ambientais e ecológicos, como também pelo seu potencial uso comercial. Por meio do cultivo é possível avaliar a ecofisiologia de espécies, a qual não poderia ser observada e acompanhada em campo, tais como o ciclo de vida, a plasticidade e a resposta das algas a diferentes variáveis ambientais, permitindo inclusive auxiliar na sistemática biológica dos grupos. Além disso, a biomassa das algas pode ter aplicações de interesse econômico, como a obtenção de biocompostos, uso como suplemento alimentar humano e animal, ou fonte de biocombustíveis (LOURENÇO, 2006).

O êxito de um cultivo de microalgas depende de uma série de fatores ambientais dentre os quais se destacam luminosidade e nutrientes. Os meios de cultura são preparados de modo a fornecer estes nutrientes em quantidade suficiente para as espécies cultivadas (LOURENÇO, 2006).

O gênero *Scenedesmus* é atualmente muito visado para o cultivo devido ao seu crescimento rápido, fácil adaptação às variações ambientais (TRAINOR, 1998) e grande valor nutritivo com alta produção de proteína e ácidos graxos (BECKER, 1994; GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009). Seu cultivo é voltado principalmente para a aquicultura (DERNER et al., 2006), para a alimentação humana como suplemento alimentar e como

potencial matéria prima para produção de biodiesel (PRABAKARAN; RAVINDRAN, 2012).

Apesar do grande potencial, o cultivo de microalgas ainda apresenta altos custos, sendo um dos principais o custo dos reagentes químicos utilizados na preparação dos meios de cultura comerciais (SIPAÚBA-TAVARES; PEREIRA, 2008; FERRELL; SARISKY-REED, 2010; KRUSE; HANKAMER, 2010).

Vários estudos vêm sendo realizados com o intuito de avaliar o crescimento das microalgas cultivadas em meios de cultura alternativos, que mesmo sendo baratos e facilmente obtidos, são ricos em nutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento desses organismos. Os meios alternativos são produzidos através de diferentes fontes orgânicas e inorgânicas, como efluentes municipais, industriais, de agricultura, biodigestores, extrato de solo, dentre outras (DALRYMPLE et al., 2013; ALMEIDA, 2007; PIÑA et al., 2007; FIORESI; SIPAÚBA-TAVARES, 2008). Massa seca de macrófitas aquáticas, por sua riqueza de micro e macronutrientes, também foram sugeridas como fertilizantes orgânicos de solo, de piscicultura e como meio de cultura para microalga (SAMPAIO; OLIVEIRA, 2005; SIPAÚBA-TAVARES; BRAGA, 2007).

As macrófitas aquáticas flutuantes *Eichhornia crassipes* (Martius) Solms-Laubach e *Pistia stratiotes* L. são amplamente distribuídas nos ambientes aquáticos dulcícolas, principalmente em ambientes tropicais, e são consideradas pragas devido ao seu crescimento acelerado e fácil adaptação (CAMARGO et al., 2003; MARTINS et al., 2003). Por outro lado, a alta taxa de crescimento, ampla distribuição e facilidade de colonizar novos ambientes, associados à grande capacidade de estocarem nutrientes, tornam as macrófitas atrativas do ponto de vista econômico (HENRY-SILVA; CAMARGO, 2006).

A utilização de meio de cultivo contendo extrato de macrófitas aquáticas, como *Pistia stratiotes* e *Eichhornia crassipes*, que colonizam e se proliferam em ambientes aquáticos eutrofizados, complementados ou não com a utilização de fertilizante NPK (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA, 1993), pode servir de importante fonte alternativa em virtude de suas concentrações elevadas de nitrogênio, fósforo e potássio (SIPAÚBA-TAVARES e BRAGA, 2007), além de outros nutrientes, como magnésio, enxofre, manganês, cobre, zinco, ferro e cálcio (HENRY-SILVA; CAMARGO, 2006). Esses são essenciais ao desenvolvimento das microalgas, com baixo custo, além de contribuir para a reutilização de resíduos naturais.

Porém, assim como outros extratos orgânicos como efluentes e biodigestores, o extrato de macrófita bruto apresenta alta turbidez devido à presença de pigmentos e substâncias orgânicas dissolvidas. Essa coloração pode trazer prejuízo ao crescimento das microalgas pela atenuação da passagem de luz, diminuindo assim a taxa de fotossíntese (TAHER, 2013).

Devido à importância econômica do cultivo de microalgas, é necessário estudar maneiras para baratear seu custo. Tendo em vista que os meios de cultura representam um dos itens de maior custo para o cultivo em larga escala, o uso de meios alternativos e de fácil aquisição, como extrato de macrófitas e NPK, pode viabilizar o processo. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o desenvolvimento e a produção de biomassa da microalga *Scenedesmus acuminatus* em extratos de *Pistia stratiotes* e *Eichhornia crassipes* enriquecidos com NPK, NPK puro e diferentes diluições de extrato de *Eichhornia* puro, e compará-los ao meio comercial ASM1, visando identificar um meio alternativo que possa baratear os custos do cultivo, sem diminuir o rendimento em biomassa, tornando assim a produção em larga escala mais viável economicamente.

## **2 Metodologia**

### **2.1 Cepa usada**

A cepa de *Scenedesmus acuminatus* (L027A) foi obtida no Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Algas Continentais (LATEAC) pertencente ao Departamento de Ciências Biológicas da UFES.

### **2.2 Preparação dos extratos das macrófitas aquáticas**

As macrófitas aquáticas utilizadas foram *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (aguapé) e *Pistia stratiotes* L. (alface d'água). Os exemplares foram coletados na lagoa Juara (Serra, ES), lavadas e secas ao sol por 24h e colocadas em estufa à 60°C por mais 24h.

Para a preparação do extrato cerca de 82g de *E. crassipes* e 164g de *P. stratiotes* secas foram moídas e posteriormente fervidas em 1,8L e 2,2L de água destilada, respectivamente. Cada extrato ainda quente foi filtrado e autoclavado a 120°C, durante 20 minutos.

### 2.3 O experimento

Foram testados seis tratamentos, além do controle, todos realizados em tréplica. Os experimentos foram feitos em erlenmeyers de 500 mL, com volume final de 316 mL com a seguinte composição:

- 1- **Controle:** 316 mL de meio ASM1
- 2- **NPK:** 316 mL de água destilada e 0,11g de NPK
- 3- **Pis+NPK:** 16 mL de extrato de *P. stratiotes* adicionados a 300 mL de água destilada e 0,11g de NPK
- 4- **Eic+NPK:** 16 mL de extrato de *E. crassipes* adicionados a 300 mL de água destilada e 0,11g de NPK
- 5- **Eic40:** 40 mL de extrato de *E. crassipes* adicionados a 276 mL de água destilada
- 6- **Eic85:** 85 mL de extrato de *E. crassipes* adicionados a 231 mL de água destilada
- 7- **Eic130:** 130 mL de extrato de *E. crassipes* adicionados a 186 mL de água destilada

A turbidez de cada tratamento foi determinada no início do experimento conforme apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1**– Turbidez do controle e dos seis tratamentos.

|                       | ASM1 | NPK | Pis+NPK | Eic+NPK | Eic40 | Eic85 | Eic130 |
|-----------------------|------|-----|---------|---------|-------|-------|--------|
| <b>Turbidez (NTU)</b> | 0    | 0   | 5,78    | 18,3    | 50,33 | 126,9 | 209,98 |

**Fonte:** Dados do autor

O pH das unidades experimentais no início do experimento foi 7,0.

O experimento foi realizado na sala de cultivo do Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Algas Continentais (LATEAC), com iluminação fornecida por duas lâmpadas do tipo *daylight* de 40 W, por bancada, à temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 24h.

O inóculo acrescentado resultou em uma concentração inicial (dia 0) de  $30,7 \times 10^4$  n° células.mL<sup>-1</sup>.

## 2.4 Análise dos nutrientes

Amostras dos extratos de *P. stratiotes* e *E. crassipes*, e de meio com NPK puro foram enviados ao laboratório CQA (Centro de Qualidade Analítica LTDA) para a determinação, nas três amostras, da concentração ortofosfato, pelo método EPA 3050B / 1996, nitrogênio amoniacal pelo método SM4500, nitrito, nitrato pelo FQ-0279-02, e nos extratos de macrófitas foram quantificados também ferro, manganês, cobre, zinco e boro pelo método EPA 6010B/1996; e enxofre, pelo EPA SW 846/1994.

## 2.5 Avaliação do crescimento de *Scenedesmus acuminatus*

Para a composição da curva de crescimento, foram retiradas alíquotas de 1mL de cada unidade experimental, a cada dois dias, durante vinte e quatro dias. A quantificação dos indivíduos (ind./ml) foi feita por meio de câmara de Neubauer.

A taxa de crescimento (K) foi calculada utilizando a fase exponencial da curva de crescimento, representada pelo número de divisões celulares da população por dia, de acordo com Stein (1973).

## 2.5 Biovolume

Para análise do volume celular foram realizadas medições da altura e do diâmetro ( $\mu\text{m}$ ) de 20 células de *S. acuminatus*. A figura geométrica que melhor representou a forma da alga usada foi a de dois cones acoplados. O volume celular médio ( $\mu\text{m}^3$ ) foi calculado utilizando a fórmula 1 (INAP, I.P., 2011):

$$V = \pi/12 * d^2 * h \quad (1)$$

Onde:

V=volume

d=diâmetro

h=altura

O biovolume ( $\text{mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$ ) foi calculado multiplicando o volume celular médio ( $\mu\text{m}^3$ ) pelo n° de células contadas ( $\text{cél} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) no 20º dia, quando os experimentos já haviam atingido a fase estacionária (fórmula 2).

$$\text{Biovolume (mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}) = \text{n}^\circ \text{ de células} \cdot \text{mL}^{-1} * \text{volume celular (}\mu\text{m}^3) * 10^{-9} \quad (2)$$

## 2.6 Tratamento estatístico

Os dados foram submetidos a teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov), sendo os dados paramétricos comparados por ANOVA seguido de teste de Tukey e os não paramétricos pelo teste Kruskal-Wallis seguido de teste de student-Newman-Keuls, utilizando o programa BIOESTAT 5.0. Foram considerados dados com variação significativa para o nível de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). As análises descritivas também foram feitas utilizando o mesmo programa.

## 3 Resultados

Os nutrientes disponíveis nos meios antes do experimento são apresentadas nas Tabelas 2 e 3.

**Tabela 2** – Composição química do meio ASM1.

| Componente                            | mg/316mL |
|---------------------------------------|----------|
| NaNO <sub>3</sub>                     | 53,7200  |
| MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O | 15,4840  |
| MgCl <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O | 12,9560  |
| CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O | 9,1640   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>       | 5,4984   |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 4,4619   |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>        | 0,7837   |
| MnCl <sub>2</sub> • 4H <sub>2</sub> O | 0,4392   |
| FeCl <sub>3</sub> • 6H <sub>2</sub> O | 0,3413   |
| ZnCl <sub>2</sub>                     | 0,1059   |
| CoCl <sub>2</sub> • 6H <sub>2</sub> O | 0,0060   |
| CuCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O | 0,0004   |
| EDTA • Na <sub>2</sub>                | 2,3510   |

**Fonte:** Gorham et al. (1964)

**Tabela 3** - Composição nutricional dos meios testados.

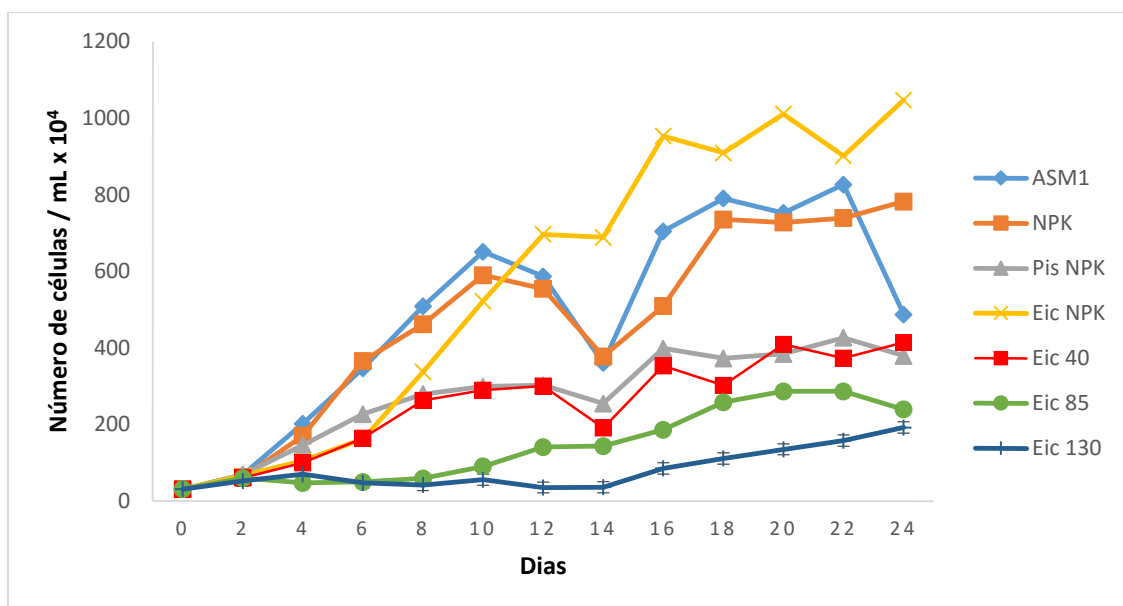
| Componente  | Pis+NPK<br>(mg/316mL) | Eic+NPK<br>(mg/316mL) | NPK<br>(mg/316mL) | Eic40<br>(mg/316mL) | Eic85<br>(mg/316mL) | Eic130<br>(mg/316mL) |
|-------------|-----------------------|-----------------------|-------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| Ortofosfato | 12,15                 | 12,01                 | 8,52              | 8,73                | 18,55               | 28,37                |
| N-amoniacal | 109,18                | 108,88                | 96,38             | 31,24               | 66,38               | 101,53               |
| N-nitrito   | 2,55                  | 2,53                  | 2,41              | 0,30                | 0,64                | 0,98                 |
| N-nitrato   | 0,31                  | 0,31                  | 0,30              | 0,04                | 0,08                | 0,12                 |
| Ferro       | 0,06                  | 0,06                  | -                 | 0,16                | 0,34                | 0,51                 |
| Manganês    | 0,23                  | 0,39                  | -                 | 0,98                | 2,08                | 3,19                 |
| Cobre       | **<LQ                 | **<LQ                 | -                 | **<LQ               | **<LQ               | **<LQ                |
| Zinco       | **<LQ                 | **<LQ                 | -                 | **<LQ               | **<LQ               | **<LQ                |
| Boro        | **<LQ                 | **<LQ                 | -                 | **<LQ               | **<LQ               | **<LQ                |
| Enxofre     | 8,20                  | 1,92                  | -                 | 4,80                | 10,20               | 15,60                |

Fonte: dados do autor.

\*\*<LQ: Menor que o limite de quantificação

As curvas de crescimento nos seis tratamentos e no controle estão demonstradas na Figura 1. Somente Eic85 e Eic130 apresentaram fase de adaptação. No primeiro essa fase durou até o 6º dia, e no segundo, até o dia 14, iniciando sua fase log a partir deste até o fim do experimento. Todos os outros tratamentos e o controle apresentaram fase exponencial a partir do primeiro dia indo até o 10º dia, no controle (ASM1) e NPK; até o dia 12 em Eic+NPK; até o dia 12 para Pis+NPK e Eic40, e o Eic85 teve a fase exponencial identificada do dia 6 a 20.

Figura 1– Curvas de crescimento de *Scenedesmus acuminatus* em cada tratamento



Fonte: dados do autor



O tratamento Eic+NPK foi o que atingiu maiores densidades celulares,  $1047 \times 10^4$  cél.mL<sup>-1</sup> no 24º dia, seguido do ASM1 ( $826 \times 10^4$  cél.mL<sup>-1</sup>) no 22º dia, NPK ( $782 \times 10^4$  cél.mL<sup>-1</sup>) no 24º dia, Pis+NPK ( $426 \times 10^4$  cél.mL<sup>-1</sup>), no 22º dia e Eic40 ( $414 \times 10^4$  cél.mL<sup>-1</sup>), no 24º dia, Eic85 ( $286 \times 10^4$  cél.mL<sup>-1</sup>), no 20º dia e Eic130 ( $192 \times 10^4$  cél.mL<sup>-1</sup> no 24º dia).

A queda dos crescimentos apresentada no dia 14 foi caracterizada por uma variação metodológica comum aos tratamentos, portanto não deve ser considerada na avaliação dos tratamentos.

As médias das taxas de crescimento, biovolume e volume das células são apresentadas Tabela 2.

**Tabela 4** – Valores médios de taxa de crescimento (K), biovolume e volume celular de *S. acuminatus* nos tratamentos.

| Tratamentos | K        | Biovolume (mm <sup>3</sup> .L <sup>-1</sup> ) | Volume (µm <sup>3</sup> ) |
|-------------|----------|---|---------------------------|
| ASM1        | 0,439 a  | 1,052 a                                       | 135,427 ab                |
| NPK         | 0,425 a  | 0,964 abc                                     | 152,257 ab                |
| Pis NPK     | 0,395 ab | 1,092 a                                       | 336,996 a                 |
| Eic NPK     | 0,408 a  | 1,273 a                                       | 86,780 b                  |
| Eic 40      | 0,323 b  | 0,928 ab                                      | 220,586 a                 |
| Eic 85      | 0,201 c  | 0,515 b                                       | 155,871 ab                |
| Eic 130     | 0,150 c  | 0,268 c                                       | 100,401 b                 |

**Fonte:** dados do autor

\* Letras diferentes na mesma coluna representam diferenças significativas (p<0,05).

As taxas de crescimento de ASM1, NPK, Eic+NPK e Pis+NPK foram respectivamente 0,439, 0,425, 0,408, 0,395, e não apresentaram diferença significativa entre si (Tabela 4), sendo este último semelhante estatisticamente também ao Eic40, cuja taxa foi de 0,323, menor do que dos primeiros citados. Os menores valores de k obtidos foram para Eic85 e Eic130, de 0,201 e 0,150 respectivamente, não apresentando diferença significativa entre si.

O volume de ASM1, NPK, Eic40, Eic85 e Eic130 (135,42 µm<sup>3</sup>; 152,257 µm<sup>3</sup>; 220,586 µm<sup>3</sup>; 155,871 µm<sup>3</sup>; 100,401 µm<sup>3</sup>) não apresentaram diferença significativa entre si, o Pis+NPK, apesar de ter apresentado o valor mais alto, de 336,996 µm<sup>3</sup>, apresentou semelhança estatística com Eic40 e Eic85. O Eic+NPK apresentou o menor valor de volume (86,780 µm<sup>3</sup>), porém, estatisticamente semelhante ao Eic85 e Eic130.

O biovolume de ASM1, NPK, Pis+NPK, Eic+NPK e Eic40 ( $1,052 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $0,964 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $1,092 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $1,273 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $0,928 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$ ) apresentaram valores estatisticamente semelhantes, sendo Pis+NPK, Eic+NPK e Eic40 semelhantes também ao Eic85 ( $0,515 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$ ) e o Eic130 ( $0,268 \text{ mm}^3 \cdot \text{L}^{-1}$ ) apresentou o valor mais baixo e estatisticamente semelhante somente ao Eic85.

#### 4 Discussão

Os seis meios de cultura apresentaram valores de nitrato menores do que o controle ASM1, porém, compensaram esse valor com nitrogênio amoniacal, não presente no meio comercial. O nitrogênio amoniacal tem vantagens em relação ao nitrato pelo fato de ser mais facilmente absorvido pelas algas, uma vez que não precisa ser reduzido a nitrito e a amônio antes de ser incorporado (YIN et al., 1998), gerando uma economia energética.

O fósforo, por sua vez, foi encontrado em quantidades aproximadamente iguais em quase todos os meios em comparação com o ASM1, exceto Eic85, que apresentou quase o dobro e Eic130, com quase o triplo. Esse nutriente é requerido em pequenas quantidades pelas algas. Quando em grandes quantidades, podem causar inibição como documentado em Baumgartner et al. (2013). Essa inibição pode ter contribuído para menor densidade apresentada em Eic85 e Eic130.

Os micronutrientes detectados nos extratos foram manganês, ferro e enxofre. Os demais micronutrientes estavam abaixo da capacidade de quantificação dos testes químicos usados, o que não significa que eles não estavam presentes.

Lima et al. (2003) comparando massa seca de *Eichhornia* e *Pistia*, não encontraram diferenças significativas entre os macro e micro nutrientes das duas espécies, assim como a quantificação nutricional dos extratos das duas macrófitas do presente trabalho não diferiu grandemente entre si.

A quantificação dos nutrientes do extrato de *Eichhornia* + NPK em Sipaúba-Tavares et al. (2009) apresentou valores muito menores do que os encontrados no presente trabalho (Tabela 4). Além disso, o valor de fosfato encontrado por aqueles autores foi superior aos valores de nitrogênio, o que é atípico, visto que compostos nitrogenados, normalmente, são mais abundantes do que fósforo em NPK (20:05:20) e em macrófitas (HENRY-SILVA; CAMARGO, 2006; HENRY-SILVA; CAMARGO, 2002, SIPAÚBA-TAVARES; BRAGA, 2007)

**Tabela 4** – Comparação dos nutrientes presentes nos extratos *Eichhornia* + NPK dos dois trabalhos

|                         | Sipaúba-Tavares et al. (2009) | Presente estudo |
|-------------------------|-------------------------------|-----------------|
| Amônia (mg/316 mL)      | 0,028                         | 108,88          |
| Nitrito (mg/316 mL)     | 0,00021                       | 2,53            |
| Nitrato (mg/316 mL)     | 0,045                         | 0,315           |
| Ortofosfato (mg/316 mL) | 0,098                         | 12,01           |

**Fonte:** Sipaúba-Tavares et al. (2009) e dados do próprio autor

Essas variações podem ter ocorrido por alguma diferença metodológica na confecção do extrato, ou pelo fato do NPK ser de marca diferente ou pelas *Eichhornias* terem sido coletadas de lugares distintos, tendo, portanto, variações nutricionais.

Assim como no presente trabalho, Henry-Silva e Camargo (2006) também registraram valores maiores de manganês e ferro na massa seca de *Pistia* e *Eichhornia*, em relação aos outros micronutrientes. Igualmente, Sipaúba-Tavares e Braga (2007) também encontraram a mesma proporção em extrato de *Eichhornia*.

Como as macrófitas aquáticas são filtradoras do meio em que vivem, absorvendo os nutrientes do ambiente e incorporando em sua biomassa, esses valores nutricionais provavelmente são passíveis de mudanças. Dessa forma, os nutrientes encontrados no extrato podem refletir os ambientes em que vivem. Em estudo realizado na lagoa Juara, Almeida e Fernandes (2013) registraram altas concentrações de ortofosfato, fósforo total, nitrogênio total e nitrogênio amoniacal, classificando esse ambiente como eutrófico. Duarte (2014) registrou concentração de ferro de 1,237 a 2,614 mg/L, superior ao valor máximo estabelecido pelo CONAMA (0,3 mg/L) para lagoas e concentrações de manganês de 0,04 a 0,056 mg/L. Isso pode ter influenciado nas concentrações registradas no extrato das duas macrófitas.

O alto índice de enxofre encontrado nos extratos pode ser compreendido pela abundância desse elemento em matéria orgânica principalmente na composição de aminoácidos (LOURENÇO, 2006).

Os compostos encontrados nos extratos de *Pistia* e *Eichhornia* apresentaram variedade e concentrações suficientes para o crescimento de *Scenedesmus acuminatus*. Porém, o tratamento Pis+NPK apresentou valores de crescimento menores do que NPK puro, sugerindo que a adição do extrato prejudicou um pouco o crescimento da alga. Esse fato pode ser explicado por algum possível composto alelopático produzido pela

macrófita *Pistia*, o qual acabou sendo transferido para o extrato. Já foi documentada ação inibitória de metabólitos secundários produzidos por esta macrófita sobre algas (GRECA et al., 1999).

Os valores de K obtidos no presente trabalho para Eic+NPK e controle (0,408 e 0,439, respectivamente) foram parecidos aos registrados por Sipaúba-Tavares et al. (2009), cultivando *Ankistrodesmus gracilis*, (0,36 e 0,40, respectivamente), entretanto o meio comercial usado por eles foi o CHU<sub>12</sub>.

Da mesma forma como ocorrido no presente estudo, no qual a densidade de Eic+NPK alcançou densidade superior ao controle, a densidade máxima alcançada pelo extrato enriquecido de Sipaúba-Tavares et al. (2009) ( $525,02 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>) também foi maior do que o meio convencional ( $447,93 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>), demonstrando o potencial do extrato dessa macrófita acrescido de NPK em substituir os meios de cultura comerciais.

Sipaúba-Tavares et al. (2011) também usaram NPK e EIC+NPK, porém em três diferentes recipientes (recipiente de fibra de vidro, garrafão e sacola plástica) para cultivar *A. gracilis* e as taxas de crescimento foram menores em todos os tratamentos, em comparação com o presente estudo. Os valores de K obtidos para Eic+NPK, na ordem recipiente de fibra de vidro, garrafão e sacola plástica, foram: 0,30; 0,14; 0,16. Os resultados foram justificados devido à coloração escura do extrato. Apesar da diluição ter sido a mesma usada no presente trabalho, o volume dos recipientes foi de 13L, e isso pode ter intensificado a coloração final, trazendo mais prejuízo em comparação ao volume usado nesta pesquisa (316 mL).

Os resultados de K para NPK, do trabalho citado, na mesma ordem anterior (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2011), foram: 0,38; 0,24; 0,46. Somente o cultivo em sacola plástica apresentou valor de K próximo ao encontrado no tratamento com NPK no presente estudo (0,425). Os outros recipientes apresentaram taxas de crescimento menores. Somente o meio controle usado por aqueles autores (CHU<sub>12</sub>) apresentou resultados de K e densidade celular próximos ao nosso controle (ASM1): 0,40; 0,42; 0,44 e  $70,85 \times 10^5$ ;  $62,92 \times 10^5$ ;  $73,06 \times 10^5$  (recipiente de fibra de vidro, garrafão e sacola plástica, respectivamente).

Baumgartner et al. (2013), cultivando *S. acuminatus* em meio com NPK (20:05:20) e dois meios de cultura comerciais MC e DM, apresentou piores resultados para taxa de crescimento no meio com NPK em relação aos meios comerciais. Eles justificaram esse resultado pelo alto valor de fósforo presente nesse meio. De fato, a

concentração desse componente no meio foi de 515 mg / 316 mL (ou 1,63 g.L<sup>-1</sup>), muito maior se comparado aos 8,52 mg / 316 mL encontrados no presente estudo, que obteve resultados satisfatórios do NPK em relação meio de cultura comercial. Com esses resultados pode-se inferir que altas doses de nutrientes, principalmente fósforo, podem vir a ser prejudiciais ao desenvolvimento da espécie estudada.

Em vários estudos as macrófitas aquáticas já demonstraram possuir nutrientes suficiente em sua composição para serem usadas na fertilização de culturas. Tepe et al. (2006) usaram massa seca de três espécies de macrofitas e lodo como única fonte de nitrogênio para cultivo de *Scenedesmus acuminatus*. A macrófita *Nymphaea*, por possuir maior porcentagem de nitrogênio em sua composição (1,96%) em relação a *Typha* e *Myriophyllum* (1,21% e 1,53%), apresentou cultivo com maior densidade (158 x 10<sup>4</sup> indivíduos.mL<sup>-1</sup>), seguido de *Myriophyllum* (129,3 x 10<sup>4</sup> indivíduos.mL<sup>-1</sup>) e *Typha* (112 x 10<sup>4</sup> indivíduos.mL<sup>-1</sup>). Essas três densidades encontradas por Tepe et al. (2006) foram inferiores às encontradas no presente trabalho para os tratamentos e o controle, isso se deve ao fato da densidade usada por Tepe et al. (2006) ser do 6º dia de crescimento algal, portanto um experimento curto que poderia ter alcançado densidades maiores nos tratamentos, porém, não tinha esse objetivo. Além disso, podem ocorrer variações de densidade de microalgas entre os trabalhos, mesmo usando mesmas espécies, devido a diferenças de metodologias e cepas usadas.

Ao analisar o resultado obtido nos três tratamentos com diferentes diluições do extrato puro de *Eichhornia* (Eic40, Eic85 e Eic130), foi possível perceber sua capacidade de nutrição para a alga, possibilitando seu crescimento. Entretanto, a turbidez do extrato pareceu influenciar o cultivo de *S. acuminatus*. Apesar dos três tratamentos terem apresentado concentração crescente de nutrientes pela presença de maior volume de extrato (40, 85 e 130 mL), os valores de K e densidade celular máximo foram inversamente proporcionais à turbidez do meio, provocada pela coloração deste. Isso ocorre porque a medida que a turbidez aumenta ocorre maior dispersão e absorção da luz pelas partículas dissolvidas ou não no meio, o que impede que a penetração de luz ocorra favoravelmente em linha reta (SILVA e OLIVEIRA, 2001), diminuindo a disponibilidade desse recurso para as algas e prejudicando a fotossíntese.

Taher (2013) também verificou tal problema na coloração do biodigestor suíno usado em seu trabalho, e a turbidez do seu extrato concentrado prejudicou o crescimento de *Scenedesmus sp.* Apesar da turbidez reduzir o crescimento das algas, o extrato de *Eichhornia* puro apresentou crescimento satisfatório (principalmente Eic40) com custo

zero. Portanto, esta é uma opção muito econômica para a produção em larga escala, desde que seja ajustada sua diluição para proporcionar turbidez adequada.

Com relação ao volume das células encontrados, os tratamentos não apresentaram diferenças significativas que possam ser atribuídas a algum aspecto do meio. Variações de tamanho peso em algas como *Scenedesmus* são normais e demonstram uma plasticidade comum a algumas espécies (ROCHA, et al., 2003; SIPAÚBA-TAVARES et al., 2011). Apesar disso, é possível perceber uma certa tendência entre as três diluições Eic40, Eic85 e Eic130, de aumento de volume celular. Isso pode ser explicado pelo fato da turbidez crescente diminuir a penetração de luz para a cultura e assim diminuir a fotossíntese e a síntese de compostos estruturais e fisiológicos responsáveis pelo crescimento celular. Claustre e Gostan (1987) documentaram em *Hymenomonas elongata* a relação entre os menores tamanhos de células com a menor intensidade luminosa.

O baixo volume do cultivo em Eich+NPK poderia ser explicado pela turbidez de 18,3 NTU desse tratamento somado ao auto-sombreamento provocado pela alta densidade encontrada.

O valor do biovolume traduz a densidade do dia 20 e o volume das células. Dessa forma, quase todos os tratamentos apresentaram valores próximos, somente o Eic130 apresentou valor muito menor e diferente dos demais. Esse tratamento apresentou menor biovolume, principalmente, por apresentar densidade celular muito pequena no dia 20 em comparação aos outros tratamentos.

Eic+NPK mesmo apresentando menor volume de todos, teve o maior biovolume pelo fato da densidade algal do dia 20 ter sido muito superior aos outros tratamentos, inclusive ao controle.

## 5 Conclusões

Os dados obtidos permitem concluir que os tratamentos NPK, Pis+NPK e Eic+NPK apresentaram taxas de crescimento, densidade celular e biovolume compatíveis ao meio de cultura comercial (ASM1), em especial Eic+NPK. Este apresentou maior densidade celular e biovolume do que o controle, representando assim alternativa aos meios de cultura convencionais, juntamente com os demais.

Dos tratamentos com extrato puro, Eic40 apresentou resultados satisfatórios e com custo zero, podendo ser usado para o cultivo de *S. acuminatus*, desde que, observada

a diluição ideal para evitar elevada turbidez do meio e consequente inibição do crescimento da alga.

Mais estudos devem ser realizados a fim de verificar a potencialidade do extrato puro de *Pistia* e investigar com mais detalhamento a possível produção de compostos alelopáticos.

## 6 Agradecimentos

À CAPES pelo auxílio financeiro por meio da concessão da bolsa de mestrado.

## 7 Referências bibliográficas

ALMEIDA CCS (2007) Avaliação do crescimento, padrões metabólicos e capacidade fotossintética de *Microcystis panniformis* Komárek et al. (Cyanobacteria) e *Ankistrodesmus gracilis* (Reich) Korsikov (Chlorophyta) em fontes de nitrogênio inorgânicas e orgânicas. Ouro Preto, Brasil, 62 p. (M.Sc. Dissertation. Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos. UFOP).

ALMEIDA SZ, FERNANDES VO (2013) Effects of intensive fish-farming and domestic wastewater on the periphytic algal community in a tropical coastal lagoon (Juara, Brazil). *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 35 (3) :335-342.

BAUMGARTNER TRS, BURAK JAM, KOGIKOSKI ME, SEBASTIEN NY, ARROYO PA (2013). Avaliação da produtividade da microalga *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat em diferentes meios de cultivo. *Revista Brasileira de Biociência*, 11(2):250-255.

BECKER EW (1994) *Microalgae: biotechnology and microbiology*, Ed. Baddiley, J. et al., Cambridge Univ. Press, Cambridge, New York.

CAMARGO AFM, PEZZATO MM, HENRY-SILVA, GG (2003) Fatores limitantes à produção primária. In THOMAZ SM, BINI LM. ed. *Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas*. Maringá: Eduem, 59-83.

CLAUSTRE HE, GOSTAN J (1987) Adaptation of biochemical composition and cell size to irradiance in two microalgae: possible ecological implications, *Marine Ecology Progress Series*, 40: 167-174.

DALRYMPLE OK, HALFHIDE T, UDOM I, GILLES B, WOLAN J, ZHANG Q, ERGAS S (2013) Wastewater use in algae production for generation of renewable resources: a review and preliminar results. *Aquatic Biosystems* 9(1):2

DERNER RB, OHSE S, VILLELA M, CARVALHO SM, FETT R (2006), Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural* 36(6): 1959-1967.

DUARTE ID, Qualidade da água da lagoa Juara (Serra/ES): Avaliações físicas, químicas e respostas fisiológicas e citogenéticas em plantas. Vitória, Brasil. 102p. (M.Sc. Dissertation. Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal. UFES).

FERRELL J, SARISKY-REED V (2010) National algal biofuels technology roadmap. A technology roadmap resulting from the national algal biofuels workshop Washington U.S. Department of Energy, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, Biomass Program.

Available:[http://www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/algal\\_biofuels\\_roadmap.pdf](http://www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/algal_biofuels_roadmap.pdf).

FIORESI TB, SIPAÚBA-TAVARES LH (2008) Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (Chlorophyta) em laboratório à base de esterco suíno, *Revista Biotemas*, 21 (1): 7-16.

GORHAM, PR, MCLACHLAN J, HAMMER UT, KIM WK (1964) Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Bréb. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 15: 796-804.

GOUVEIA L, OLIVEIRA AC (2009) Microalgae as a raw material for biofuels production. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36(2): 269-274.

GRECA MD, FIORENTINO A, MONACO P, PREVITERA L, PINTO G, POLLIO A (1999) Release of potential allelochemical from aquatic plants. In MACIAS FA, GALINDO JCG, MOLINILLO, J.M.G, CUTLER HG (Eds.) *Recent advances in allelopathy*. Cadiz, Serv. Pub. Univ. Cadiz, 255-262.

HENRY-SILVA CG, CAMARGO AFM (2002) Valor nutritivo de macrófitas aquáticas flutuantes (*Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Salvinia molesta*) utilizadas no tratamento de efluentes de aquicultura, *Acta Scientiarum*, 24(2): 519-526.

HENRY-SILVA CG, CAMARGO AFM (2006) Composição química de macrófitas aquáticas flutuantes utilizadas no tratamento de efluentes de aquicultura, *Planta Daninha*, 24(1): 21-28.

INAG, I.P. (2011). Manual para a avaliação da qualidade biológica da água. Guia de utilização da tabela de valores-guia normalizados de biovolumes e determinação do biovolume através de procedimentos laboratoriais. Ministério da Agricultura, Mar, Ambiente e Ordenamento do Território. Instituto da Água, I.P.



- KRUSE O, HANKAMER B (2010) Microalgal hydrogen production. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(3): 238-243.
- LIMA MR de, TAFFAREL AD, REISSMANN CB, CRUZ ACL da, DEPINÉ H Avaliação do crescimento e retenção de nutrientes provenientes da eutrofização, em três macrófitas aquáticas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, Ribeirão Preto, 2003. Anais. Ribeirão Preto: UNESP, SBCS, 2003a. CD-Rom.
- LOURENÇO SO (2006). Cultivo de microalgas marinhas – Princípios e aplicações. Rima, São Carlos SP.
- MARTINS D, COSTA NV, TERRA MA, MARCHI SR, VELINI ED (2003) Caracterização química das plantas aquáticas coletadas no reservatório de Salto Grande (Americana – SP). *Planta Daninha*, 21: 21-25.
- PIÑA P, MEDINA MA, NIEVES M, LEAL S, LÓPEZ-ELIAS JA, GUERRERO MA (2007) Cultivo de cuatro especies de microalgas com diferentes fertilizantes utilizados em acuicultura. *Ver. Invest. Mar.* 28(3): 225-236.
- PRABAKARAN P, RAVINDRAN D (2012) *Scenedesmus* as a potential source of biodiesel among selected microalgae, *Current Science*, 102(4): 606-620.
- ROCHA MSJ, GARCIA JEC, HENRIQUES MHF (2003) Growth aspects of the marine microalga *Nannochloropsis gaditana*. *Biomolecular Engineering*, 20 (4-6): 237-242.
- SAMPAIO, EVSB, OLIVEIRA NMB (2005) Aproveitamento da macrófita aquática *Egeria densa* como adubo orgânico. *Planta Daninha*, 23(2): 169-174.
- SILVA SA, OLIVEIRA R de O (2001) Manual de análises físico-químicas de águas de abastecimento e residuárias. Campina Grande: Paraíba.
- SIPAÚBA-TAVARES LH, ROCHA O (1993) Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes: I – Algas Clorofíceas. *Biotemas*, 6(1): 93-106.
- SIPAÚBA-TAVARES LH, BRAGA FMS (2007) The feeding activity of *Colossoma macropomum* larvae (tambaqui) in fishponds with water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) fertilizer, *Brazilian Journal of Biology*, 67(3): 459-466.
- SIPAÚBA-TAVARES LH, IBARRA LCC, FIORESI TB (2009) Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) em laboratório utilizando meio CHU<sub>12</sub> e de macrófita com NPK. *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo*, 35(1): 111 – 118.
- SIPAÚBA-TAVARES LH, MILLAN RN, BERCHIELLI FA, BRAGA FMS (2011) Use of alternative media and different types of recipients in a laboratory culture of

- Ankistrodesmus gracilis (Reinsch) Korshikov (Chlorophyceae), Acta Scientiarum. Biological Sciences, 33(3): 247-253.
- SIPAÚBA-TAVARES LH, PEREIRA AML (2008) Large scale laboratory cultures of *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) and *Diaphanosoma biergei* Korinek, 1981 (Cladocera), Brazilian Journal of Biology, 68(4): 875-883.
- STEIN JR (1973) Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth measurements. Cambridge University Press, Cambridge.
- TAHER DM (2013) Biodiesel de microalgas cultivadas em dejetos suíno biodigeridos, Curitiba, PR. 102p. (M.Sc. Dissertation. Engenharia e Ciência dos Materiais, Setor de Tecnologia, da UFPR).
- TEPE Y, NAZ M, TÜRKMEN M (2006) Utilization of different nitrogen sources by cultures of *Scenedesmus acuminatus*, Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 6: 123-127.
- TRAINOR FR (1998) Biological aspects of *Scenedesmus* (Chlorophyceae)-phenotypic plasticity. Nova Hedwigia, Beiheft.
- YIN K, HARRISON PJ, DORTCH Q (1998) Lack of ammonium inhibition of nitrate uptake for a diatom grown under low light conditions. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 228: 151–165.