

## Desenvolvimento de um meio de cultura alternativo para produção da microalga *Galdieria sulphuraria*

## Development of an alternative culture medium to produce the microalgae *Galdieria sulphuraria*

### RESUMO

Isabella Kuroki de Carvalho  
[isabellakuroki@hotmail.com](mailto:isabellakuroki@hotmail.com)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Eduardo Bittencourt Sydney  
[eduardosydney@utfpr.edu.br](mailto:eduardosydney@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

O Allen's Medium é o meio de cultura mais utilizado na literatura científica e indicado por bancos de microalgas (SAG) para o cultivo de *G. sulphuraria*. Porém por experiência em laboratório mostrou-se ser um meio que resulta em crescimento lento e reduzido. Foi então desenvolvido um meio de cultivo alternativo para manutenção da microalga, visando o aumento na produção da biomassa, maior praticidade na execução e diminuição dos custos. O estudo foi realizado através de comparações entre os dois meios de cultura, o meio Allen's e o meio alternativo, avaliando assim a diferença da cinética de crescimento da microalga *Galdieria Sulphuraria*, nos dois meios, utilizando o método de contagem direta de células por câmara de Neubauer e peso seco. O maior crescimento da *G. sulphuraria*, em ambas análises realizadas, foi observado no novo meio proposto. A produção de biomassa no novo meio, em células/L, foi aproximadamente dez vezes maior, enquanto que em g/L foi mais que o dobro, quando comparado ao meio Allen's. O meio proposto demonstrou ser uma alternativa aos meios tradicionais de cultivo de *G. sulphuraria*, uma vez que foi capaz de produzir maior quantidade de biomassa necessitando de menos reagentes e demandando menos trabalho em sua preparação.

**PALAVRAS-CHAVE:** Microbiologia. Meios de cultura. Algas vermelhas.

### ABSTRACT

**Recebido:** 19 ago. 2020.

**Aprovado:** 01 out. 2020.

**Direito autorial:** Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



Allen's Medium is the most used culture medium in the scientific literature and recommended by microalgae banks (SAG) for the cultivation of *G. sulphuraria*. However, by laboratory experience it has proved to be a culture that results in slow and reduced growth. An alternative means of cultivation was then developed to maintain the microalgae, aiming at increasing the production of biomass, making it more practical to execute and reducing costs. The study was carried out through comparisons between the two culture media, the Allen's medium and the alternative medium, them evaluating the difference in the growth kinetics of the *Galdieria Sulphuraria* microalgae, in the two mediums, using the method of direct cell count by chamber Neubauer and dry weight. The greatest growth of *G. sulphuraria*, in both analyzes, was observed in the proposed new culture. The proposed culture proved to be an alternative to the traditional means of cultivation of *G. sulphuraria*, since it was able to produce a greater amount of biomass requiring less reagents and requiring less work in its preparation.

**KEYWORDS:** Microbiology. Culture media. Algae, Red.

## INTRODUÇÃO

Na última década as microalgas tornaram-se mais conhecidas e despertaram um expressivo aumento no interesse de diferentes indústrias, pelos seus benefícios e utilizações de potencial biotecnológico.

A *Galdieria Sulphuraria*, pertencente à família das *Cyanidiales*, um grupo de algas vermelhas (*Rhodophyta*), é a microalga escolhida para esse estudo. Acredita-se que há muito a ser estudado acerca dessa microalga por suas características únicas, podendo ser capaz de se desenvolver a pH 0,5-4 e temperaturas até 56 °C, utilizando metabolismo auto, mixo e heterotrófico. Diferente das demais *Cyanidiales*, a *Galdieria Sulphuraria* cresce em mais de 50 fontes de carbono, e se desenvolve em diferentes tipos de ambientes, inclusive em locais secos (YOON et al., 2002).

Os meios de cultivo devem fornecer os nutrientes necessários para a manutenção e propagação das células semelhantes. As quatro principais matérias primas para o cultivo de microalgas incluem fósforo, nitrogênio, dióxido de carbono e energia luminosa (Blanken et al., 2013). Basicamente existem dois grandes grupos de meios de cultivo, ou seja, meios sintéticos e meios complexos. Chamam-se sintéticos os meios cuja composição química é qualitativa e quantitativamente conhecida. Os meios complexos são aqueles que apresentam um composto cuja composição química não é perfeitamente definida, como peptonas, extrato de levedura, dentre outros (MADIGAN et al., 2010).

As formulações de meios de cultura sintéticos, não são viáveis para a produção de biomassa microalgal se avaliado em escala industrial. Economicamente falando, em larga escala de produção é significativo reduzir os custos de matéria prima para o cultivo da produção (TEIXEIRA, 2015). Por isso foram estabelecidos, inicialmente, quais os reagentes que iriam ser modificados do meio “padrão. A redução dos compostos químicos em um meio mais simplificado apresenta uma diminuição no custo tendo em vista que mesmo o meio Allen’s sendo o meio de cultura mais utilizado na literatura científica e indicado por bancos de microalgas (SAG, por exemplo), promove um crescimento lento e reduzido das células, como foi observado em laboratório, a partir do uso do meio Allen’s para a manutenção da microalga. Nesse sentido, para maximizar a produção de biomassa microalgal, foi criado o meio de cultura alternativo, um meio complexo.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo de otimização do meio de cultivo foi realizado através de comparações entre dois meios de cultura, o meio Allen’s (Tabela 1) e o meio alternativo (Tabela 2), avaliando assim a diferença da cinética de crescimento da microalga *Galdieria Sulphuraria*, nos dois meios.

O inóculo utilizado para a realização dos estudos foi a microalga *Galdieria sulphuraria* (SAG107.79), adquirida da Coleção de Culturas de Algas da Universidade de Göttingen (SAG).

Tabela 1 – Composição do meio Allen’s

Reagente	Fórmula	Concentração
Sulfato de Amônio	$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	1,32 g/L

Reagente	Fórmula	Concentração
Fosfato de Potássio	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,27 g/L
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,25 g/L
Cloreto de Cálcio Dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,074 g/L
Cloreto de Ferro	$\text{FeCl}_3$	11 mg/L
Ácido Bórico	$\text{H}_3\text{BO}_3$	2,8 mg/L
Cloreto de Manganês	$\text{MnCl}_2$	1,8 mg/L
Sulfato de Zinco Heptahidratado	$\text{Zn SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,218 mg/L
Sulfato de Cobre	$\text{CuSO}_4$	0,05 mg/L
Metavanadato de Amônio	$\text{NH}_4\text{VO}_3$	0,023 mg/L
Molibdato de Sódio	$\text{Na}_2\text{MoO}_4$	0,024 mg/L

Fonte: SAG (2019).

Para maximizar a produção de biomassa microalgal, foi criado o meio de cultura alternativo, um meio complexo.

Tabela 2 – Composição do meio alternativo

Reagente	Fórmula	Concentração
Sulfato de Amônio	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,00 g/L
Fosfato de Potássio	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,02 g/L
Sulfato de Magnésio Heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,02 g/L
Extrato de Levedura	-	0,5 g/L
Extrato de Malte	-	0,5 g/L

Fonte: Autoria própria (2019).

Já que a microalga estudada é a *G. sulphuraria*, o pH dos meios de cultura foram ajustados a 2,0 com adição de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85% de pureza). Cultivada em Erlenmeyer, mantida durante 15 dias em estufa incubadora BOD, sob a temperatura de 45 °C com iluminação constante (3500 lux). Para otimizar a absorção de  $\text{CO}_2$  e a homogeneização do cultivo, foi utilizada bomba de aquário promovendo a aeração.

Os materiais e os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave durante 15 minutos a 121 °C e os procedimentos foram conduzidos em câmara de fluxo laminar.

Para efetuar as curvas de cinética de crescimento da microalga *Galdieria Sulphuraria*, amostras (alíquotas) foram retiradas todos os dias, dos dois meios, por 15 dias consecutivos, e submetidas a dois métodos para obtenção da concentração celular e de biomassa: contagem das células e peso seco.

O método da contagem direta de células foi realizado com aumento de 40 vezes em microscópio ótico (Opton, TIM- 2008), com auxílio de uma câmara de contagem (câmara de Neubauer) para a obtenção da concentração celular, expressa em número de células por mililitro de cultivo (cel.mL<sup>-1</sup>).

Já para determinar a concentração de biomassa em peso seco, centrifugou-se durante 15 minutos a 5000 rpm (Centrífuga Excelsa 4, modelo 280 R), a alíquota do meio de cultivo, em tubos previamente pesados, descartando sempre, o sobrenadante. A biomassa encontrada no fundo do tubo, foi seca em estufa a 80 °C por 24 horas. Em seguida, contendo a biomassa seca, os tubos foram alocados em dessecador para o resfriamento, evitando assim a absorção de umidade. Rapidamente os tubos são retirados e pesados para a determinação da biomassa.

Conhecido o volume do meio centrifugado e determinada a biomassa contida no tubo foi possível determinar a concentração de biomassa (g/L).

Por meio dessas análises foi possível determinar a velocidade máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ), produtividade celular (P), tempo de geração celular (G) e produção máxima (R).

A Equação (1) descreve a velocidade máxima de crescimento, segundo Bastos (2010):

$$\mu_{\max} = \ln \frac{(X/X_0)}{t - t_0} \quad (1)$$

Onde,

$\mu_{\max}$  = velocidade máxima de crescimento (h<sup>-1</sup>)

$X_0$  = é a concentração celular no início da fase exponencial de crescimento

$X$  = concentração celular no final da fase exponencial de crescimento

$t - t_0$  = intervalo de tempo correspondente apenas à fase exponencial de crescimento

A relação entre a variação da concentração celular pela variação da duração de tempo do cultivo determina a produtividade celular. O cálculo, de acordo com Borzani e colaboradores (2001), é descrito pela Equação (2).

$$P = \frac{x - x_0}{t - t_0} \quad (2)$$

Onde,

P= Produtividade celular (cél/mL.h)

$X_0$ = é a concentração celular inicial

$X$ = concentração celular final

$t - t_0$ = intervalo de tempo do início ao fim do cultivo

O tempo de geração, tempo que o microrganismo leva para duplicar a sua biomassa, segundo Bastos (2010), está descrito na Equação (3).

$$G = \frac{\ln(2)}{\mu_{\max}} \quad (3)$$

Onde,

$G$  = tempo de geração (h)

$\mu_{\text{máx}}$  = velocidade máxima de crescimento ( $h^{-1}$ )

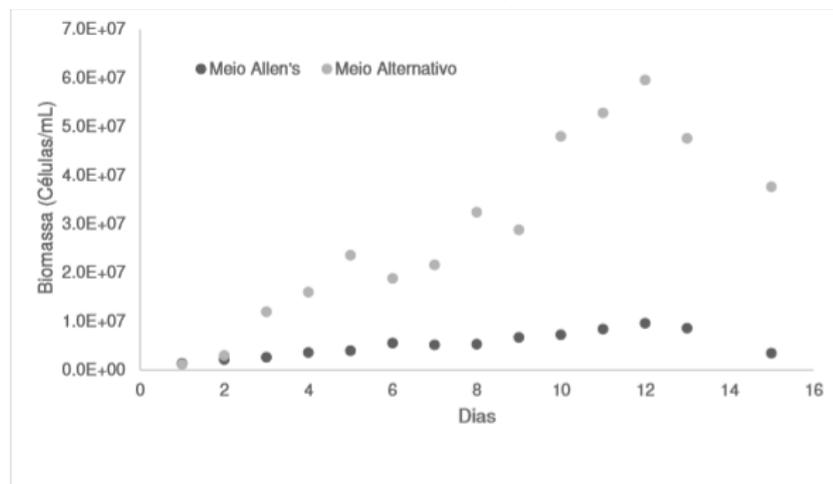
“A produção máxima das culturas ( $R$ ) foi determinada a partir da subtração número máximo de células atingido ao final do cultivo pelo número de células no inóculo inicial” (ZIMERMANN, 2019, p. 38).

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foi desenvolvido um meio de cultivo alternativo para manutenção da *Galdieria sulphuraria*, visando o aumento na produção da biomassa, maior praticidade na execução e diminuição dos custos. A redução de reagentes no novo meio, torna sua preparação mais rápida e simples, pois não há a necessidade de autoclavar alguns reagentes separadamente, como no meio Allen's, por exemplo, visto que os reagentes utilizados não promovem o escurecimento do meio quando esterilizados conjuntamente.

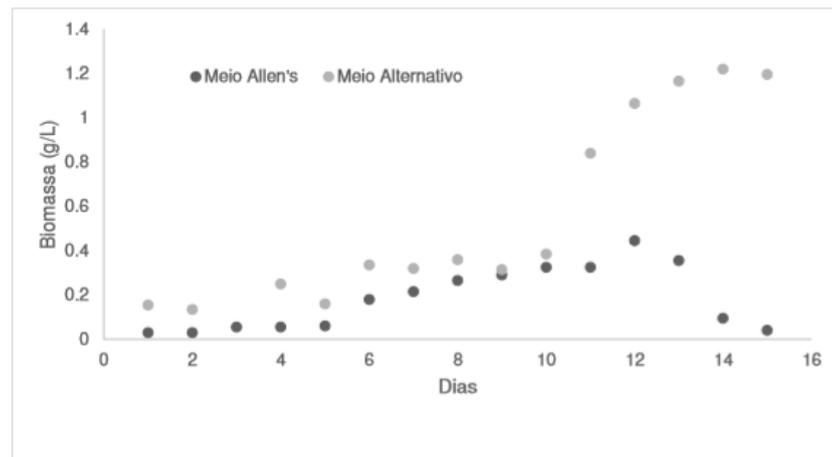
A Figura 1 e 2 representam a curva de crescimento da *G. sulphuraria* em um dos meios sintéticos mais utilizados para o cultivo dessa espécie de microalga, o meio Allen's, e o novo meio proposto.

Figura 1 – Curva de crescimento da biomassa da *G. sulphuraria* em diferentes meios de cultura em células/mL



Fonte: Autoria própria (2019).

Figura 2 – Curva de crescimento da biomassa da *G. sulphuraria* em diferentes meios de cultura em g/L



Fonte: Autoria própria (2019).

A maior produção de biomassa da *G. sulphuraria*, foi observada no novo meio proposto. No 12º e no 14º, ocorreu a concentração máxima de células no meio Allen's e no meio alternativo, respectivamente. A produção de biomassa no novo meio, em células/L, foi aproximadamente dez vezes maior. Em g/L foi mais que o dobro, quando comparado ao meio Allen's.

A divergência observada no comportamento entre os gráficos de contagem celular e massa celular pode ser atribuída à massa celular individual. O expressivo aumento da massa celular do meio alternativo ocorreu no 11º dia. Por outro lado, a contagem celular demonstrou que o número de células já havia aumentado consideravelmente antes desse período. Assim, as células apresentaram variação nos seus tamanhos ao longo do cultivo.

## CONCLUSÃO

O meio proposto demonstrou ser uma alternativa aos meios tradicionais de cultivo de *G. sulphuraria*, uma vez que foi capaz de produzir maior quantidade de biomassa necessitando de menos reagentes e demandando menos trabalho na sua preparação.

## REFERÊNCIAS

BASTOS, R. G. **Tecnologia das fermentações: fundamentos de bioprocessos**. São Carlos: EdUFSCar, 2010.

Blanken W, Cuaresma M, Wijffels RH, Janssen M. 2013. **Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost**. Algal Research 2(4):333-340. Disponível em: [https://www.dresden-pillnitzer.de/wp-content/uploads/2012/11/13\\_2013\\_Algal-Research\\_Ward-Kopie.pdf](https://www.dresden-pillnitzer.de/wp-content/uploads/2012/11/13_2013_Algal-Research_Ward-Kopie.pdf). Acesso em: 29 de jul. 2020.

BRASIL, B. S. A. F., e COSTA, L., 2016. **Microalgas**. Agroenergia em revista. Embrapa Agroenergia, Brasil. Ano IV, dez. 2016, nº 10, p. 04-54. Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/153095/1/Agroenergia-Revista-microalgas-ed10-red.pdf>. Acesso em: 23 de jul. 2020.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, A. U.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial**. Volume 2, São Paulo: Edgar Bülcher, 2001.

MADIGAN, Michael T.; MARTINKO, John M.; DUNLAP, Paul V.; CLARK, David P. **Microbiologia de Brock**. 12ªed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

TEIXEIRA, D.A. **Processo de simplificação de meio de cultura para produção de microalgas com potencial de aplicações energéticas**. 2015. 70 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Engenharia Ambiental, Escola Politécnica e Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

YOON, H. S. al. **A single origin of the peridinin-and fucoxanthin-containing plastids in dinoflagellates through tertiary endosymbiosis**. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 99, n. 18, p. 11724-11729, 2002.

ZIMERMANN, Jéssika D’Arc Fernandes. **Cultivo da microalga Galdieria sulphuraria em permeado de soro de leite**. 2019. 75 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2019. Disponível em:  
<https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/4572/1/estudocultivomicroalgagaldieriasulphuraria.pdf>. Acesso em: 17 de jul. 2020.