

## **CUSTO DO CULTIVO DE *Messastrum gracile* EM LABORATÓRIO COM USO DE MEIO DE CULTURA ALTERNATIVO E INSERÇÃO DE SUBPRODUTO DA AGROINDÚSTRIA SOB DIFERENTES INTENSIDADES DE LUZ**

Débora Cristina Fenerick<sup>1</sup>

Livia Clara Colla<sup>2</sup>

Lúcia Helena Sipaúba Tavares<sup>3</sup>

**Sistemas de produção sustentável (Agricultura Orgânica, Permacultura, Biodinâmica, Agroecologia)**

### *Resumo*

O objetivo deste trabalho foi avaliar o custo de produção da microalga *Messastrum gracile* em meio de cultura alternativo de extrato da macrófita (*Eichhornia crassipes* - ME) em cultivos, foto-autotrófico e mixotrófico, utilizando melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono utilizando duas intensidades luminosas (60 e 90  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). O meio ME na luminosidade de 90  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  obteve a maior densidade celular média de  $117 \times 10^5$  cels  $\text{mL}^{-1}$  em cultivo foto-autotrófico. O tempo de duplicação e a taxa específica de crescimento foram melhores para a intensidade 90  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para as duas condições de cultivo com  $k = 2,15$  e  $\text{TD} = 0,46$  (foto-autotrófico) e  $k = 2,10$  e  $\text{TD} = 0,48$  (mixotrófico). Os teores de lipídio foram mais elevados em 90  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para condição de cultivo foto-autotrófica com maior valor no 21º de cultivo (4%), Os teores de proteína foram mais elevados no 7º dia, em 90  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  na condição mixotrófica (1,9  $\text{mg mL}^{-1}$ ) onde também se encontra a melhor relação custo/benefício com produção de biomassa de 2,2  $\text{g L}^{-1}$  e maior lucro operacional (US\$ 9,043). Os resultados obtidos permitem concluir que o meio de macrófita com adição do melaço de cana-de-açúcar é eficaz para o desenvolvimento de *M. gracile*, pois com exceção do crescimento celular e dos teores lipídicos, a condição mixotrófica apresentou melhores resultados para proteína e lucro operacional em relação ao cultivo foto-autotrófico.

**Palavras-chave:** Microalga; Macrófita; Luminosidade; Lucro; Melaço de cana-de-açúcar.

<sup>1</sup>Mestranda. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Jaboticabal – Centro de Aquicultura Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton (CAUNESP), deborafenerick@hotmail.com.

<sup>2</sup>Graduanda. Faculdade de Tecnologia Nilo De Stéfani (FATEC Jaboticabal), liviacolla01@hotmail.com.

<sup>3</sup>Profª. Drª. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Jaboticabal – Centro de Aquicultura – Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton (CAUNESP), lucia.sipauba@unesp.br.



## INTRODUÇÃO

A utilização de um subproduto da agroindústria (melaço de cana-de-açúcar) e resíduo da aquicultura (macrófitas), são estratégias alternativas biotecnológicas utilizadas como forma de baratear o custo, sem afetar a produção de algas, sendo este microrganismo empregado em diferentes campos comerciais, desde indústria alimentícia até produção de biodiesel.

O maior custo relacionado a produção de biomassa algal é o preço dos meios de cultura comerciais. Dessa forma, meios alternativos a partir de plantas aquáticas foram propostos como forma de substituir os compostos inorgânicos presentes nesses meios de cultura (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009). O extrato da macrófita *Eichhornia crassipes*, é frequentemente utilizado como meio de cultura, pois desfruta de propriedades luxuriantes de absorver nutrientes dos sedimentos e da água, principalmente, nitrogênio e fósforo que são essenciais para o cultivo de microalgas (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009, 2018). Dentre as técnicas de cultivo para auxiliar na redução do custo de produção das microalgas se encontra as fontes de carbono orgânico (GUARAV et al., 2016), onde esses microrganismos podem combinar fotossíntese do cultivo foto-autotrófico e assimilação da fonte de carbono com eliminação da luminosidade do cultivo heterotrófico em um processo denominado mixotrófico.

Diminuir os custos de produção e aumentar a produtividade, são fatores essenciais para um cultivo de microalgas bem-sucedido. A energia elétrica é um dos principais custos de produção deste microrganismo, porém também apresenta alto impacto quando usada de modo apropriado, pois pode elevar a biomassa algal (YAN et al., 2016).

A microalga estudada no presente trabalho, *Messastrum gracile*, é uma espécie rica em proteína, lipídio e antioxidantes, sendo de interesse comercial para alimentação animal principalmente, na aquicultura sendo de fácil manejo, rápido crescimento e bem adaptada aos meios de cultura alternativos como, fertilizantes inorgânicos e plantas aquáticas (SIPAÚBA-TAVARES et al. 2017, 2018).

Portanto, o intuito deste trabalho foi utilizar o meio de cultura de extrato da macrófita *Eichhornia crassipes* (ME) utilizando um subproduto da agroindústria (melaço

de cana-de-açúcar) sob duas intensidades luminosas (60 e 90  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) para avaliar o crescimento celular, desenvolvimento bioquímico e os aspectos econômico da microalga *M. gracile*.

## METODOLOGIA

A microalga *Messastrum gracile* linhagem (CCMA-UFSCar5) foi cultivada em sistema estático não axênico, com aeração constante ( $6 \pm 1 \text{ mg L}^{-1}$ ), em temperatura de  $22 \pm 2$  °C, com fotoperíodo de 24 horas com luz de led na intensidade de 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . O experimento foi realizado em volume de 2 L, durante o período de 21 dias com coletas no 7º, 14º e 21º dia de experimento em triplicatas para todos os tratamentos. Foram empregadas duas condições de cultivo: um mixotrófico utilizando o melão de cana-de-açúcar como fonte de carbono orgânico (Tedesque et al., 2021) e outro foto-autotrófico, em meio de cultura com extrato da macrófita *Eichhornia crassipes* (ME), de acordo com metodologia proposta por Sipaúba-Tavares et al. (2009) sob duas intensidades luminosas de 60 e 90  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Nos 21 dias de cultivo, para avaliar densidade celular média, crescimento e biomassa, a densidade celular foi removida diariamente em alíquotas de 1 mL do meio de cultura em triplicata. Subamostras de  $2 \times 1 \mu\text{L}$  foram contadas em hemocítmetro de Neubauer, o total foi expresso em número de células  $\text{mL}^{-1} \times 10^5$ , para calcular a taxa específica de crescimento (k) e tempo de duplicação utilizou-se metodologia de Guillard (1973). A biomassa algal foi coletada, centrifugada e liofilizada para análise dos teores de lipídio extraído com éter de petróleo e quantificado gravimetricamente segundo A.O.A.C. (1990). Os teores de proteína da microalga foram de acordo com o protocolo de Fan et al. (2018) e determinada pelo método de Brandford (1976).

A avaliação econômica foi realizada considerando uma unidade produtiva com capacidade de 100.000 L por períodos de produção (7, 14 e 21 dias), todos os valores foram projetados para um período produtivo de 42 dias, para padronização do tamanho do período e comparação entre os tratamentos avaliados. Inicialmente, foram determinados os valores de investimento em capital fixo, com exceção das construções prediais. A depreciação de

equipamentos e utensílios foram calculadas pelo método linear (Matsunaga et al., 1976). Não foram considerados as despesas com embalagem, comercialização e impostos. Para um sistema de produção com coleta no 7º dia de crescimento da microalga *Messastrum gracile* foram obtidos 6 cultivos durante os 42 dias, para coletas no 14º dia foram obtidos 3 cultivos e para coletas realizadas no 21º dia foram obtidos 2 cultivos. A receita foi determinada considerando 50% do valor de mercado de microalgas Chlorophyceae, com preço de US\$ 0,03 por grama. Com base nos custos de produção e receita obtidas com a venda da produção foram determinados os seguintes indicadores econômicos: Custos unitários ou Custos Médios = COT/Produção, Receita Bruta (RB) = Produção\*Preço de venda, Lucro Operacional (LO) = RB-COT (Martin et al., 1994).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maior densidade celular média da microalga *Messastrum gracile* foi observada em  $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  na condição de cultivo foto-autotrófica com  $117 \pm 136 \times 10^5$  cels  $\text{mL}^{-1}$  (Figura 1). O tempo de duplicação e a taxa específica de crescimento foram melhores para a intensidade  $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para as duas condições de cultivo com  $k = 2,15$  e  $\text{TD} = 0,46$  (foto-autotrófico) e  $k = 2,10$  e  $\text{TD} = 0,48$  (mixotrófico) (Tabela 1). Cecchin et al. (2018) cultivando *Chlorella sorokiniana* verificou que no meio de cultura contendo fontes reduzidas de carbono como acetato, a produção de biomassa, densidade celular e produtividade diária desta microalga foi maior em cultivo mixotrófico em relação ao foto-autotrófico.

Tabela 1: Parâmetros biológicos da microalga *Messastrum gracile*

Parâmetros	Intensidades de luz ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )			
	60		90	
	FOTO	MIXO	FOTO	MIXO
TD	2,25	2,24	2,18	2,10
k	0,44	0,45	0,46	0,48
Dmed	$115 \pm 104$	$75 \pm 79$	$117 \pm 136$	$80 \pm 104$
Biomassa	1,5	1,7	1,8	2,2

TD: tempo de duplicação (dias); k: taxa de crescimento; Dmed: densidade celular média ( $\times 10^5$  cels  $\text{mL}^{-1}$ ); Biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ).

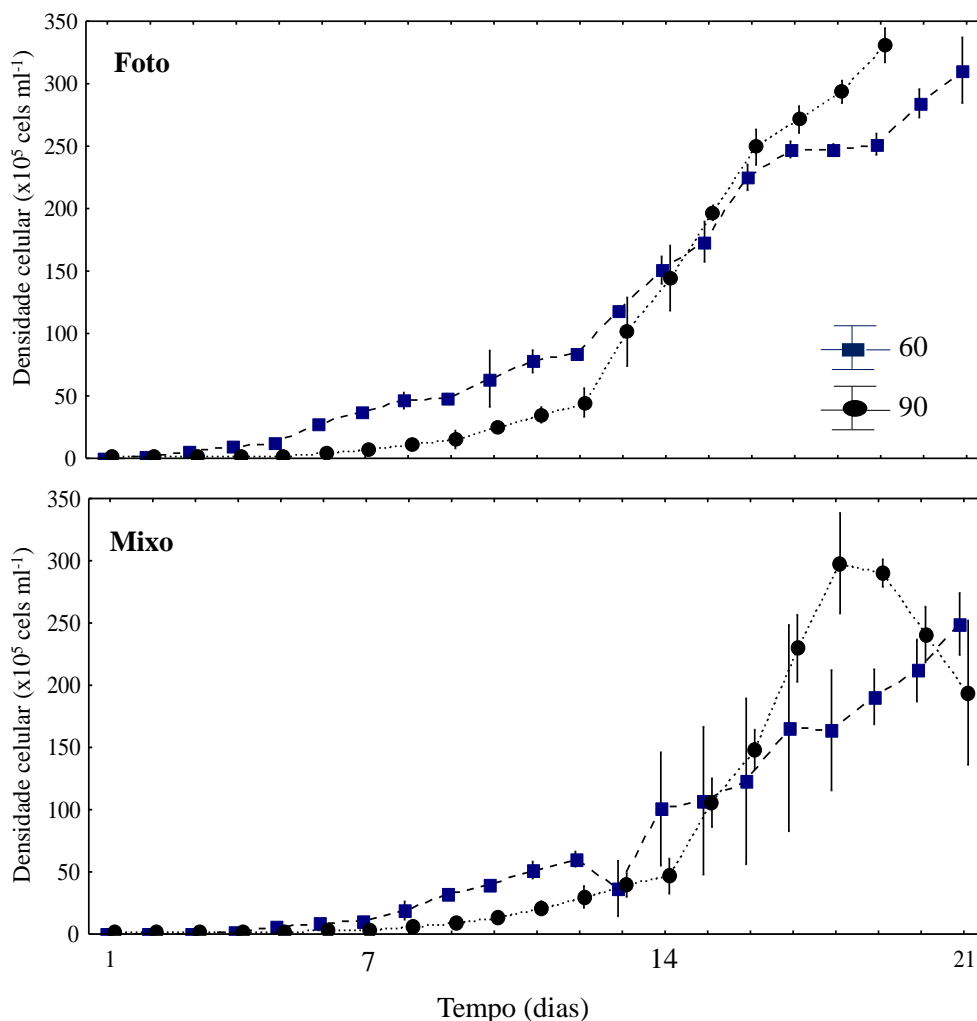


Figura 1: Gráfico de crescimento celular da microalga *Messastrum gracile* em meio de cultura ME nas duas condições de cultivo foto-autotrófico (foto) e mixotrófico (mixo) sob duas intensidades de luz ( $60$  e  $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Os teores de proteína em condições mixotróficas de cultivo foram mais elevados em meio de cultura ME à  $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  com  $1,9 \text{ mg mL}^{-1}$  no sétimo dia (Figura 2), onde também apresentou o maior lucro do estudo de US\$ 9,043 (Tabela 3). De acordo com Kadkhodaei et al. (2015) a adição de glicose como fonte de carbono orgânico na concentração de  $15 \text{ g L}^{-1}$  elevou a biomassa e teor de proteína da microalga *Dunaliella salina*.

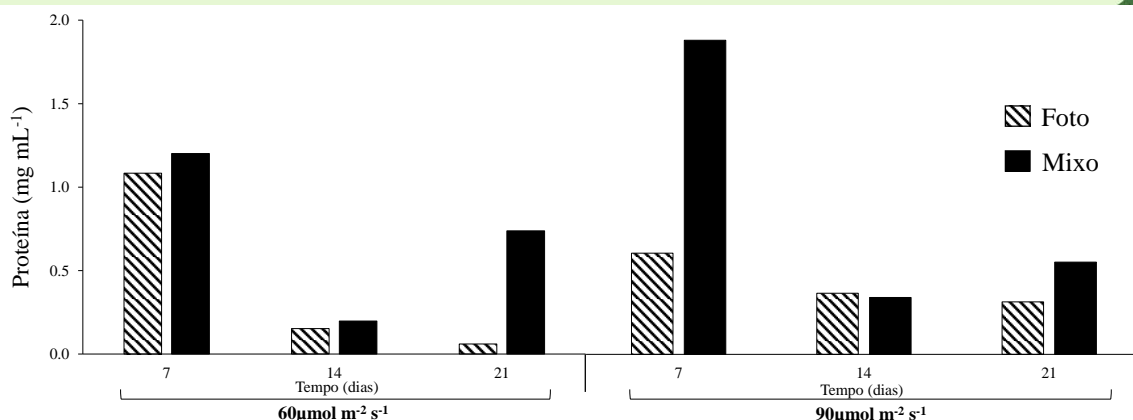


Figura 2: Gráfico de teores de proteína da microalga *Messastrum gracile*.

As condições de cultivos utilizadas neste estudo (foto-autotrófico e mixotrófico) apresentaram elevada biomassa, dessa forma, este fator pode explicar os baixos teores de lipídios encontrados neste trabalho, uma vez que a quantidade de biomassa não está associada com valor nutricional. Segundo Cheah et al. (2018), a acumulação do lipídio inicia após o esgotamento dos nutrientes que são utilizados no crescimento da microalga, principalmente, o nitrogênio que promove a produção de lipídios e carboidratos. Isto explica o comportamento da *M. gracile*, pois no geral ao final do experimento apresentou teores lipídicos melhores, principalmente, no cultivo foto-autotrófico (Figura 3).

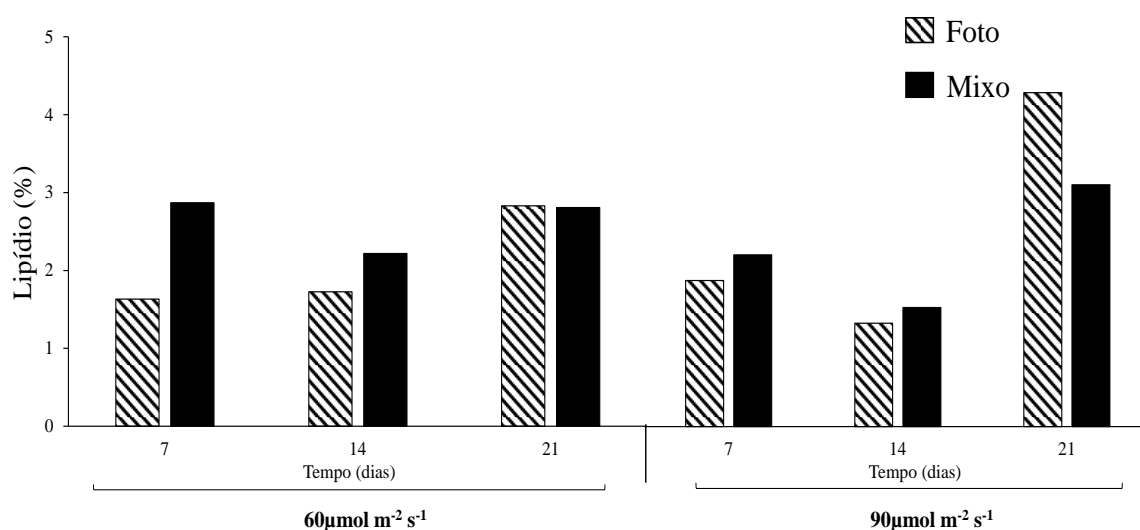


Figura 3: Gráfico de teores de lipídio da microalga *Messastrum gracile*.

O investimento para uma unidade de produção algal de 100.000 L por período de tempo (7, 14 e 21 dias) para cultivo de *M. gracile* foi de US\$ 40,298, incluindo como um dos principais elementos para composição desse valor os tanques de fibra de vidro (custo total US\$ 25,839). Os aparelhos necessários para manutenção técnica de cultivo como microscópio, centrífuga, autoclave e fluxo de ar apresentaram custo elevado, com valor variando de US\$ 1,787 a 5,219 dólares (Tabela 2).

Tabela 2: Investimento do custo total em US\$ dólar\* (excluindo instalação predial) para produção de 100.000 L por 42 dias de *Messastrum gracile*

Componentes laboratoriais	Unidade	Quant.	Valor unitário	Valor total	Vida útil (anos)
Bomba d' água	pç	1	90.7	90.7	8
Bomba de ar	pç	2	17.3	34.7	8
Tanques de Fibra de vidro (850 L)	pç	118	219.0	25,839.4	10
Microscópio	pç	1	5,219	5,219	5
Ar condicionado	pç	2	277.2	554.4	5
Camara de neubauer	pç	2	47.9	95.7	5
Balança	pç	1	587.7	587.7	10
Centrifuga	pç	1	1,786.9	1,786.9	10
Fluxo de ar (esterilização algal)	pç	1	1,964.6	1,964.6	5
Freezer	pç	1	310	310.0	16
Lâmpada de led	pç	30	2.5	76.1	5
Pipetador automatico	pç	2	41.1	82.1	5
Microalga <i>Messastrum gracile</i>	cepa	1	16.4	16.4	5
Autoclave	pç	1	3,640.3	3,640.3	10
<b>Investimento total</b>				<b>40,298</b>	

\*Taxa de câmbio (Abril 2021) US\$1.00=R\$5,48, Quant=Quantidade; pç= peça.

Em condição mixotrófica a adição do melão de cana-de-açúcar encarece a produção em 9,7%. A mão-de-obra e a manutenção dos equipamentos apresentaram participação similares para custo operacional total (COT), variando de 5% a 11%.

Os custos com a energia elétrica aumentaram de acordo com a elevação da intensidade luminosa variando de US\$ 139.3 ( $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a US\$ 209 ( $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). A variação de luz representou neste estudo quase 12% dos custos totais, Sipaúba-Tavares & Pereira (2008), cultivando *Ankistrodesmus gracilis* à  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  em meio de cultura NPK, observaram que a eletricidade representou 20% do custo total, sendo o item mais



dispendioso para o cultivo. A utilização de água ocorreu nas mesmas proporções, independente do sistema de cultivo, sendo este, o parâmetro que menos influenciou o custo total deste empreendimento (US\$ 191).

Tabela 3: Lucro operacional US\$ dólar\* da biomassa de *Messastrum gracile* para produção de 100.000 L para um período de 42 dias

Condição de cultivo	Luz <sup>(2)</sup>	Dias	COT <sup>(3)</sup> (US\$)	Biomassa (kg)	Custo unitário	RB <sup>(4)</sup> (US\$)	LO <sup>(5)</sup> (US\$)
Foto	60	7	3,190	114	28.0	4,056.6	866.7
		14	2,279	106	21.5	3,771.9	1,492.6
		21	1,976	173	11.4	6,156.0	4,180.2
	90	7	3,260	88	37.0	3,131.4	-128.2
		14	2,349	101	23.3	3,594.0	1,244.9
		21	2,046	234	8.7	8,326.6	6,281.1
Mixo	60	7	3,768	166	22.7	5,906.9	2,138.7
		14	2,569	164	15.7	5,835.8	3,267.2
		21	2,169	188	11.5	6,689.8	4,521.2
	90	7	3,838	362	10.6	12,881.4	9,043.4
		14	2,638	243	10.9	8,646.9	6,008.6
		21	2,238	159	14.1	5,657.8	3,419.5

\*Taxa de câmbio (Abril 2021) US\$1.00=R\$5,48, 2) Luz ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), 3) COT – Custo operacional total, 4) LO – Lucro operacional.

O mercado de microalgas e componentes derivados dependem da área global onde são produzidos, da situação real do mercado e, especialmente, da qualidade do produto. Segundo Lundquist et al. (2010), a produção de *Chlorella* está em cerca de 5.000 toneladas ao ano e, vendida aproximadamente a US\$ 20  $\text{kg}^{-1}$ , sendo os principais países produtores, Japão e Taiwan. Tendo como referência o valor de Lundquist et al. (2010), os tratamentos desse estudo são viáveis para comercialização, com custo de US\$ 8.7  $\text{kg}^{-1}$  (21º dia) em condição foto-autotrófica e em condição mixotrófica com US\$ 10.6  $\text{kg}^{-1}$  (7º dia), US\$ 10.9  $\text{kg}^{-1}$  (14º dia) sob intensidade de luz de 90  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos resultados obtidos neste estudo, conclui-se que o meio de cultura de extrato da macrófita *Eichhornia crassipes* proporcionou excelente desempenho para a



produção de *Messastrum gracile* em elevada intensidade luminosa independente da condição de cultivo (foto-autotrófico e mixotrófico), sendo, uma tecnologia laboratorial com decréscimo no custo de produção algal. O cultivo mixotrófico foi um método viável obtendo alta produção de teor proteico na intensidade de  $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Portanto, utilizar subprodutos da agroindústria e resíduos biológicos são técnicas alternativas a serem adotadas no cultivo da microalga *M. gracile* para um maior rendimento do produto a ser produzido. Assim, esses produtos que seriam descartados e posteriormente poderiam causar danos ao meio ambiente podem ser transformados em compostos de qualidade em diversos setores da indústria que utilizam a microalga como produto de mercado.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o financiamento concedido pelo CNPq (Processo nº 157160/2019-0) e FAPESP (Processo nº 2019/21053-1) pelas bolsas de mestrado e auxílio de reserva técnica, respectivamente.

## REFERÊNCIAS

A.O.A.C. Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, The Association: Arlington, VA, v. II, 15th ed. Sec.985.29, 1990.

BRANDFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-259, 1976.

CECCHIN, M., BENFATTO, S., GRIGGIO, F., MORI, A., CAZZANIGA, S., VITULO, N., BALLOTTARI M Molecular basis of autotrophic vs mixotrophic growth in *Chlorella sorokiniana*. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018.

CHEAH, W.Y., SHOW, P.L., JUAN, J.C., CHANG, J.S., LING, T.C. Enhancing biomass and lipid productions of microalgae in palm oil mill effluent using carbon and nutrient supplementation. **Energy Conversion and Management**, v. 164, p. 188-197, 2018.

FAN, H., LIU, H., DONG, Y., CHEN, C., WANG, Z., GUO, J., DU, S. Growth inhibition and oxidative stress caused by four ionic liquids in *Scenedesmus obliquus*: role of cations and anions. **Science of the Total Environment**, v. 651, p. 570-579, 2019.



GAURAV, K., SRIVASTAVA, R., SHARMA, J.G., SINGH, R., SINGH, V. Molasses-based growth and lipid production by *Chlorella pyrenoidosa*: a potential feedstock for biodiesel. **International Journal of Green Energy**, v. 13, n. 3, p. 320-327, 2016.

GUILLARD, R.R.L. Division rates. In: STEIN, J. R. (Ed.). Handbook of phycollogical methods: culture methods and growth measurements, London: Cambridge University Press, p. 289-311, 1973.

KADKHODAEI, S., ABBASILIASI, S., SHUN, T.J., MASOUMI, H.F., MOHAMED, M.S., MOVAHEDI, A., ARIFF, A.B. Enhancement of protein production by microalgae *Dunaliella salina* under mixotrophic conditions using response surface methodology. **RSC Advances**, v. 5, n. 48, 2015.

LUNDQUIST, T.J., WOERTZ, I.C. A Realistic Technology and Engineering Assessment of Algae Biofuel Production. **Energy Biosciences Institute**, p. 1-178, 2010.

MARTIN, N.B., SERRA, R., ANTUNES, J.F.G., OLIVEIRA, M.D.M., OKAWA, H. Custos: sistema de custo de produção agrícola. **Informações Econômicas**, SP, v. 24, n. 9, 1994.

MATSUNAGA, M., BEMELMANS, P.F., TOLEDO, PEN., DULLEY, R.D., OKAWA, H., PEDROSO, I.A. Metodologia de custo de produção utilizada pelo IEA. - Agricultura em São Paulo, SP, v. 23, n. 1, p. 123-139, 1976.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H., PEREIRA, A.M.L. Large scale laboratory cultures of *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) and *Diaphanosoma birgei* Korinek, 1981 (Cladocera). **Braz. J. Biol.**, v. 68, n. 4 p. 875-883, 2008.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H., IBARRA, L.C., FIORESI, T.B. *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korshikov (Chlorophyta) laboratory cultured in CHU<sub>12</sub> and macrophyte with NPK media. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35 n. 1, p. 111-118, 2009.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H., SEGALI, A.M.D.L., SCARDOELLI-TRUZZI, B. Development of low-cost culture media for *Ankistrodesmus gracilis* based on inorganic fertilizer and macrophyte. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 29, n. 5, 2017.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H., FLORÊNCIO, T., SCARDOELLI-TRUZZI, B. Aquaculture biological waste as culture medium to cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korshikov. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 3 p. 579-587, 2018.

TEDESQUE, M.G., SCARDOELLI-TRUZZI, B., SIPAÚBA-TAVARES, L.H. *Messastrum gracile* (Chlorophyceae) growth using sugarcane molasses-based macrophyte extract culture media. **Journal of Applied Phycology**, 2021.

YAN, C., ZHU, L., WANG, Y. Photosynthetic CO<sub>2</sub> uptake by microalgae for biogas upgrading and simultaneously biogas slurry decontamination by using of microalgae photobioreactor under various light wavelengths, light intensities, and photoperiods. **Applied Energy**, v. 178, n. 15 p. 9-18, 2016.