



16 a 20  
outubro  
2016

Centro de  
Convenções de  
GOIÂNIA - GO

# MICROALGAS E SUA APLICAÇÃO EM BIONERGIA E AGRICULTURA

**Diva S. Andrade**

Eng. Ag., Ph.D. E-mail: [diva@iapar.br](mailto:diva@iapar.br)

Instituto Agronômico do Paraná [www.iapar.br](http://www.iapar.br), Londrina - PR



Nesta palestra, apresentaremos parte dos resultados Download

Vol 1 [http://www.iapar.br/arquivos/File/zip\\_pdf/MicroalgasV1.pdf](http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/MicroalgasV1.pdf)

Vol 2 [http://www.iapar.br/arquivos/File/zip\\_pdf/MicroalgasV2.pdf](http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/MicroalgasV2.pdf)

Vol 3 [http://www.iapar.br/arquivos/File/zip\\_pdf/MicroalgasV3.pdf](http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/MicroalgasV3.pdf)



# Projetos

**1- Microalgas: bioenergia Apoio: IAPAR/Copel**

**2- Prospecção, identificação e genômica funcional de microalgas isoladas de ambientes aquáticos brasileiros com potencial para produção de lipídeos e carotenoides UFRJ/IAPAR Apoio: CNPq**

**IAPAR: CULTIVOS EM RACEWAYS DE CEPAS SELECIONADAS**

**3- Dissertações e teses IAPAR/UEL**

# Conteúdo

## **1- Introdução**

- O que é microalgas? isolamento, caracterização, preservação.

## **2- Microalgas como matéria prima para bioenergia.**

- Sistemas de cultivos, temperatura; meios de cultivos e colheita.

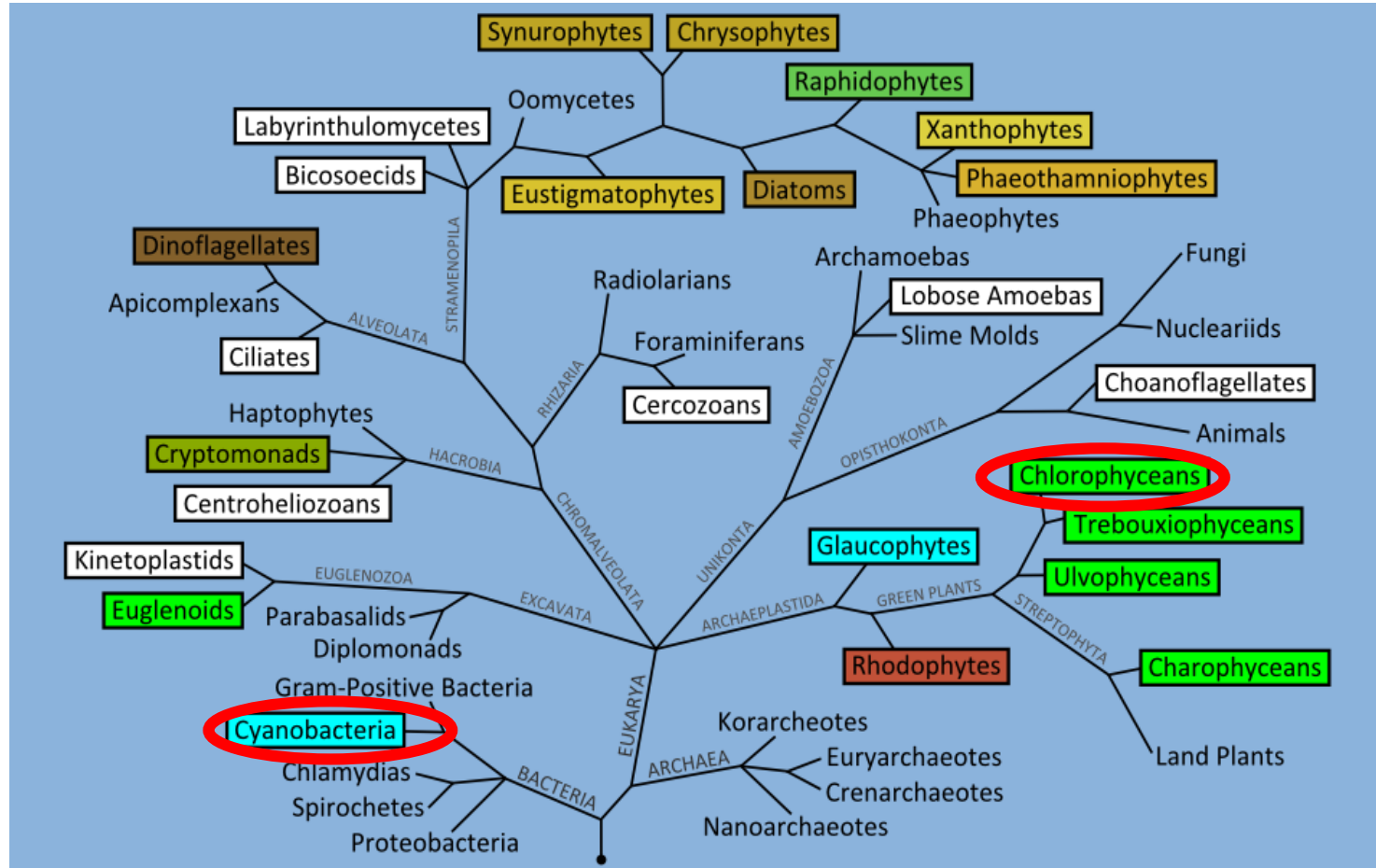
## **3- Aplicações agronômicas**

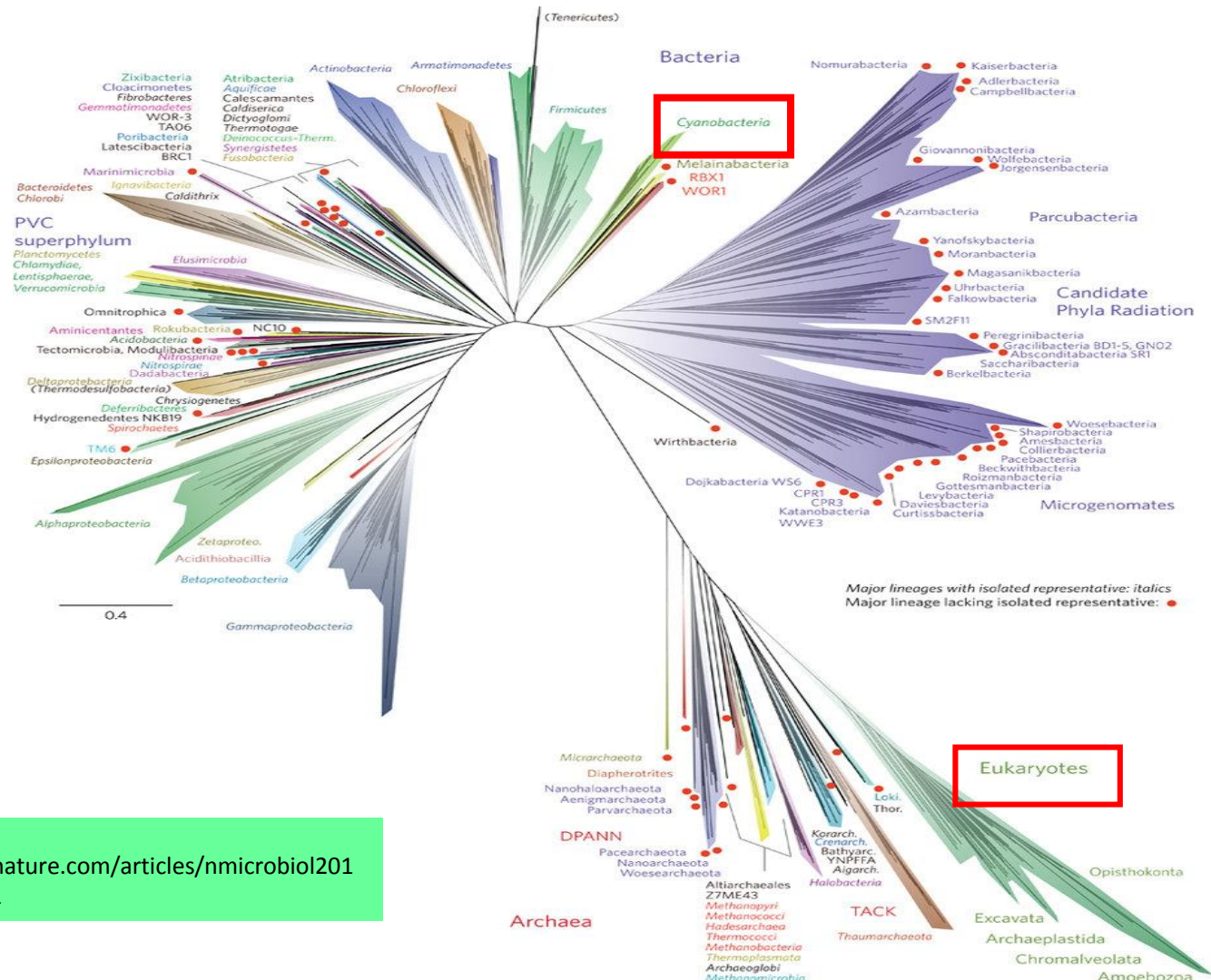
- FBN, controle biológico e promotores de crescimento.

# 1- Introdução

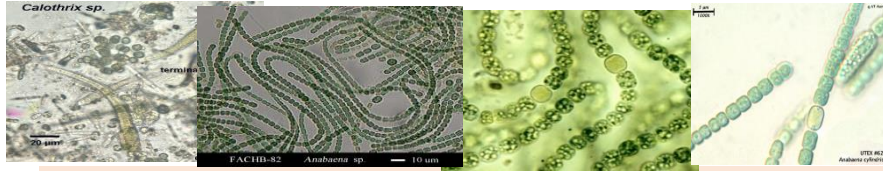
- Microalgas engloba um grupo diversificado de microrganismos fotossintéticos, multicelulares ou unicelulares, incluindo procariotos e eucariotos.
- Fotoautotróficos (luz e dióxido de carbono), heterotróficos (substrato orgânico) ou mixotróficos (ambos).

# Diversidade dos microrganismos fotossintetizantes



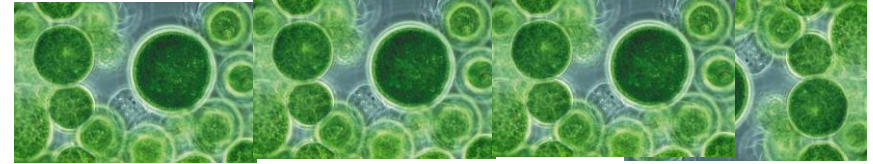


# Microalgas



## Divisão Cyanophyta: Microalgas procariontes. Algas azuis / Cianófitas / Cianobactérias.

- *Gram-negativos*;
- fotossíntese oxigênica;
- os mais primitivos organismos fotossintéticos na terra;
- Parede celular: Mureína, camada lipopolissacarídica;
- Podem apresentar envoltório mucilaginoso;
- Talo filamentosos: heterócitos e acinetos;
- Gêneros: *Nostoc* sp. e *Anabaena* sp.



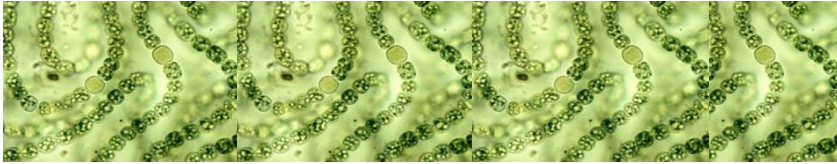
## Divisão chlorophyta: Microalgas eucariontes.

### Algas verdes/ Clorófitas .

- Núcleo e organelas envoltórias;
- Líquidos membranosos;
- Cromossomos complexos;
- Células individuais, geralmente maiores que as das cianófitas;
- Microalgas GM: Ex: *Clorella zofingiensis*
- (gene *Chlamydomonas reinhardtii*).

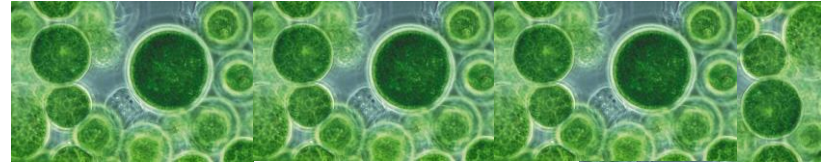


# Microalgas



## Cianobactérias

- Habitat Solo X Água;
- Alimentação humana e animal;
- Fixação de N e ligação partículas solo;
- Vida livre;
- Combustíveis, vários metabolitos (vitaminas/enzimas), corantes, rações, fertilizantes etc;
- Relatos controle nematoide.

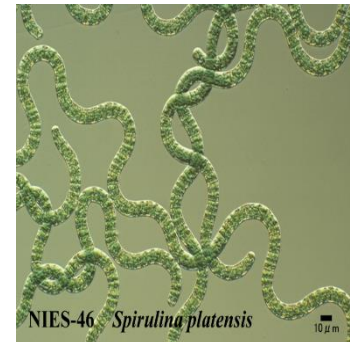
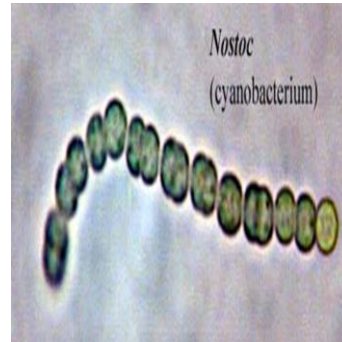
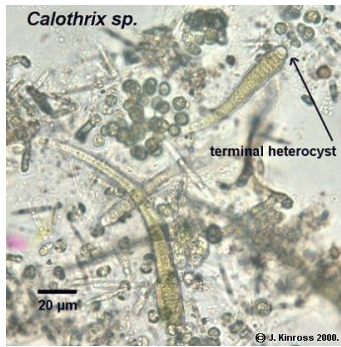


## Clorófitas

- Habitat Solo X Água;
- Alimentação humana e animal;
  - Remoção  $\text{NH}_4$ ,  $\text{NO}_3$  e  $\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$  residuais;
  - Produção energia;
  - Agricultura: Fertilizantes;
  - Industria: biopolímeros, proteínas, polissacáridos, pigmentos, etc.

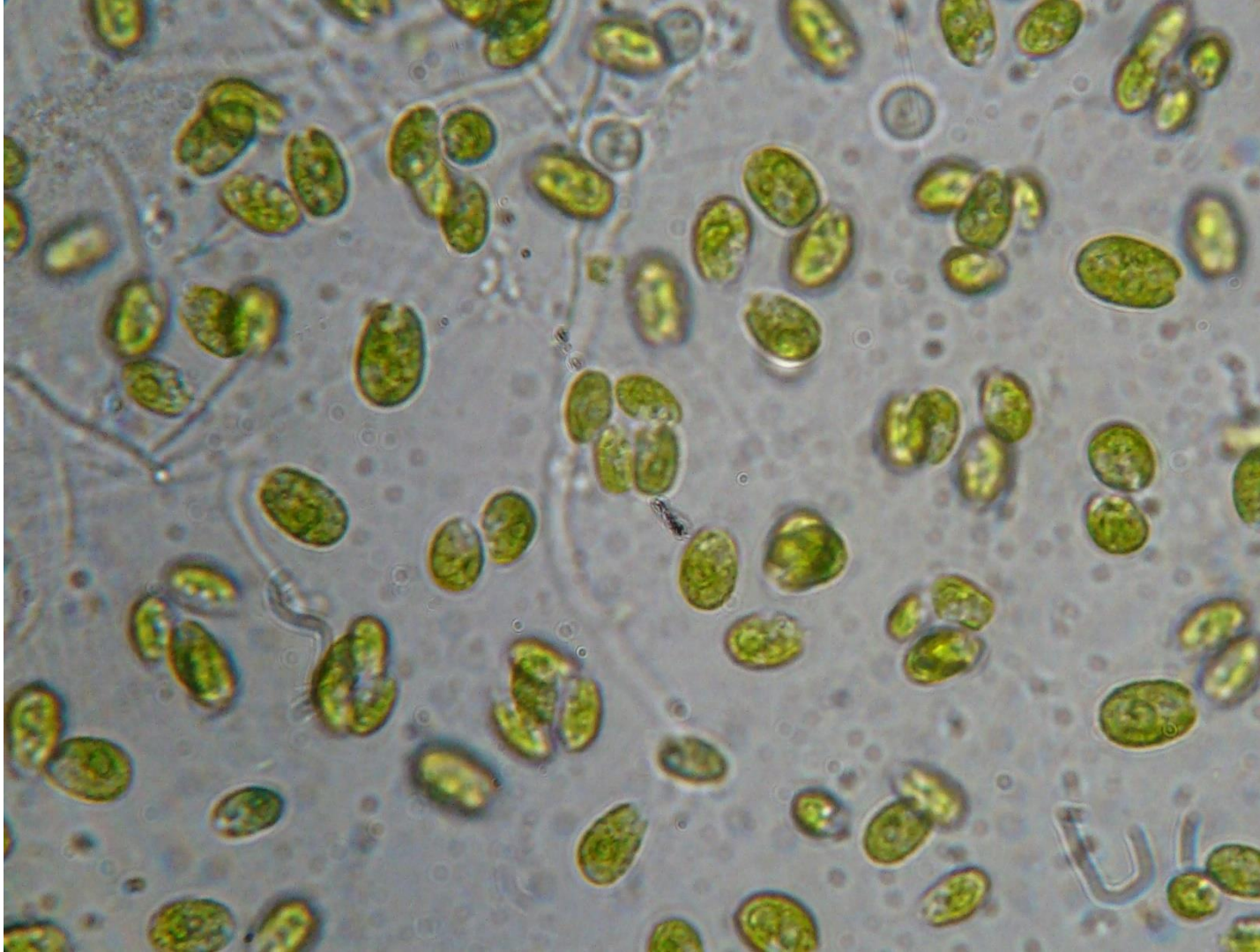
# Cianobactéria

- A maioria das cianobactérias que realiza a fixação biológica de nitrogênio (FBN) possui heterocistos, células especializadas que protegem a nitrogenase do oxigênio, a qual por sua vez, catalisa a conversão do  $N_2$  em amônia.
- As cianobactérias contribuem para fertilização do solo e representam alternativa promissora para aumentar a biodiversidade do solo.



# Clorófitas

- Eucariotos, armazenam amido nos cloroplastos, contem clorofilas *a* e *b*. Esse grupo é extremamente diverso, e inclui representantes da água doce e marinhos.
- ***Chlorella***: utilizada para elucidar “dark reactions” da fotossíntese;
- ***Chlamydomonas***: que é fonte da maioria do conhecimento da genética dos cloroplastos;
- ***Haematococcus***: produzem astaxantina e outros compostos corantes de grande aplicação comercial.



IPR7091

# Isolamento, caracterização e manutenção

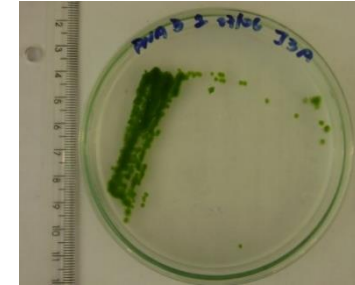
Coleta



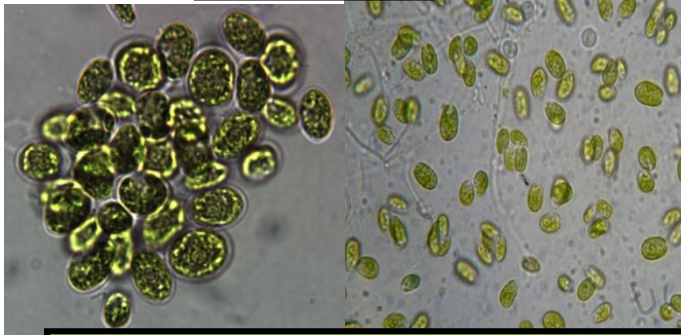
Meio de cultura (BG11 ou BBM).  
Crescimento, filtra e diluir as amostras.



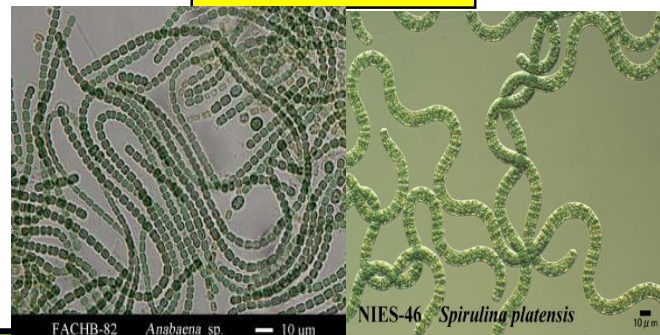
Plaqueamento



Clorófitas



Cianobactéria



Coleção de microalgas (IPR) no IAPAR

# Caracterização de colônias

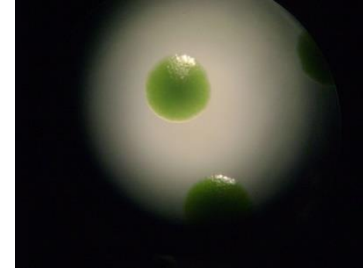


Cultivo 10 dias

Crescimento 10-12 dias



Caracterização



Form



Punctiform



Circular



Filamentous



Irregular



Rhizoid



Spindle

Elevation



Flat



Raised



Convex



Pulvinate



Umbonate

Margin



Entire



Undulate



Lobate



Erose

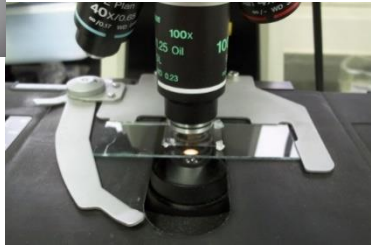


Filamentous

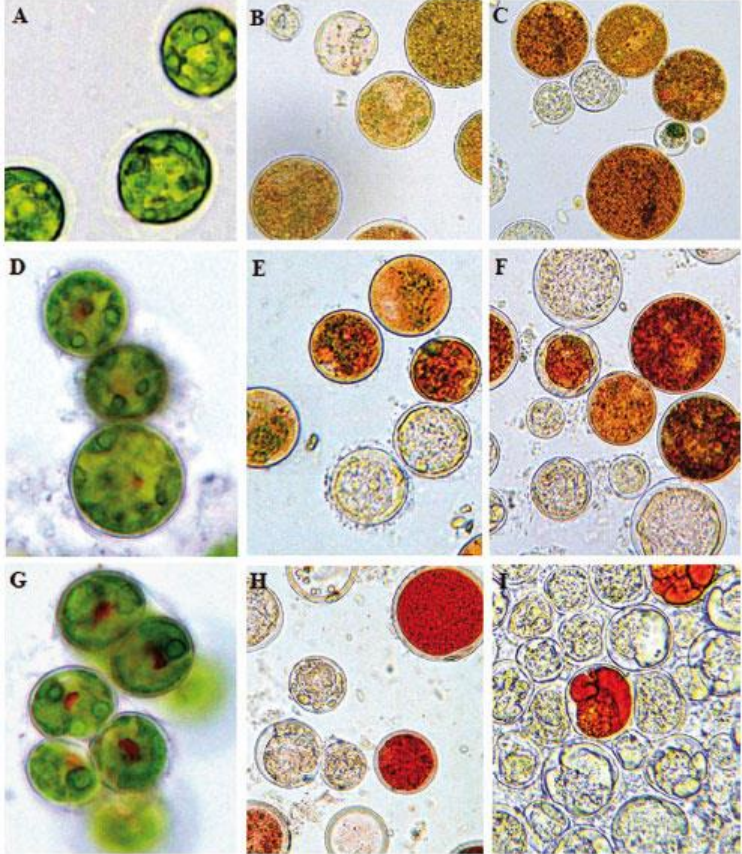
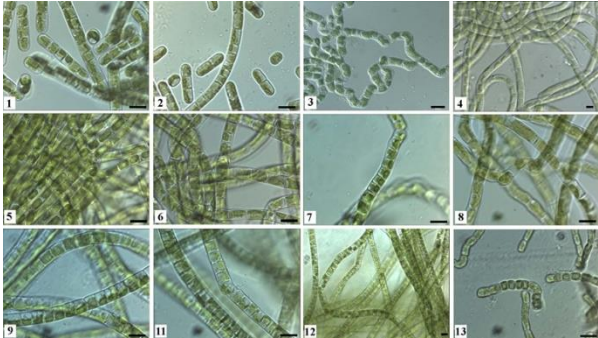


Curled

# CARACTERIZAÇÃO CELULAR



Cianobactéria



## **Coleção de Culturas de Microalgas**

A manutenção de coleções de microalgas, em meios líquidos ou semi-sólidos, é laboriosa, cara e sujeita a contaminação e a troca do material genético das estirpes.

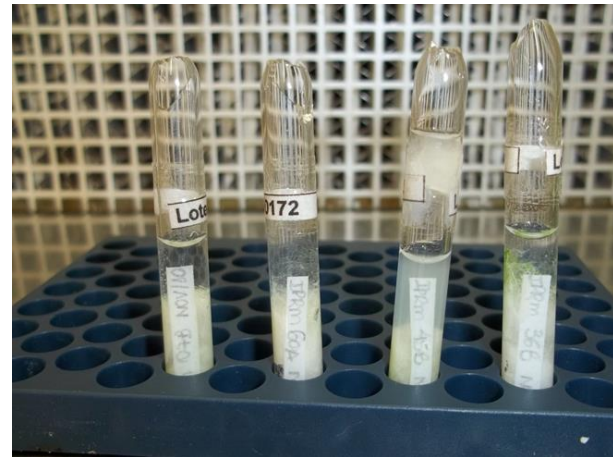


# Preservação

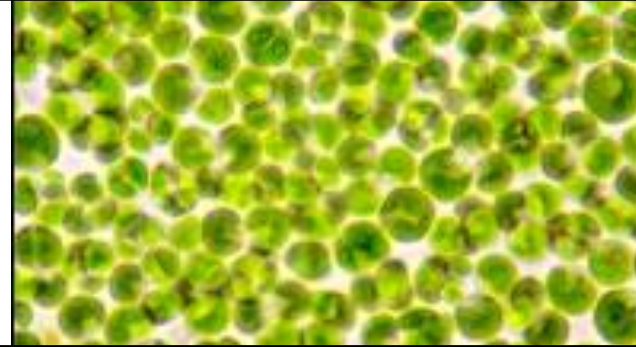
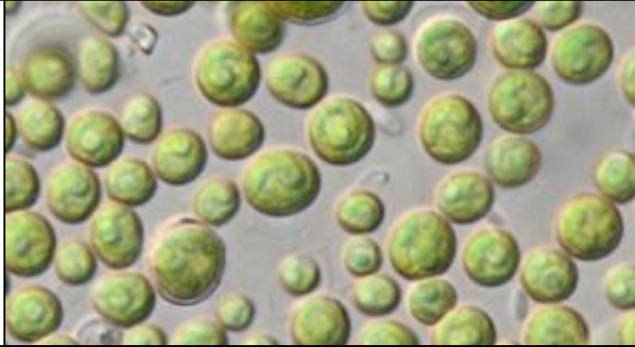
- Criopreservação –  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ , nitrogênio líquido.

Meios líquidos e sólidos +  
criopreservantes (Metanol;  
DMSO)

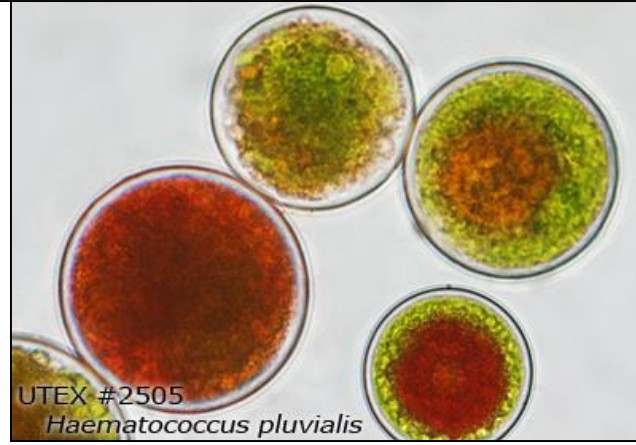
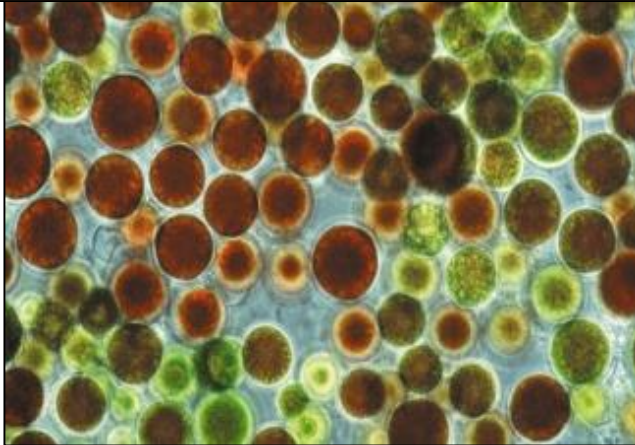
- Liofilização - leite 10%



**Luteína:** *Muriellopsis sphaerica* –(esquerda) e *Chlorella zofingiensis* (direita)



**Astaxantina:** *Haematococcus pluvialis*



# Coleção (IPR) de 153 isolados de microalgas

## *Chlorophyta* -70,5%

Unicelular - 80%

Circular - 79,3%

Fusiforme - 9,7%

Cilindrica - 7,5%

Falcada - 3,5%

Filamentosa - 5,2%

Cilindrica - 100%

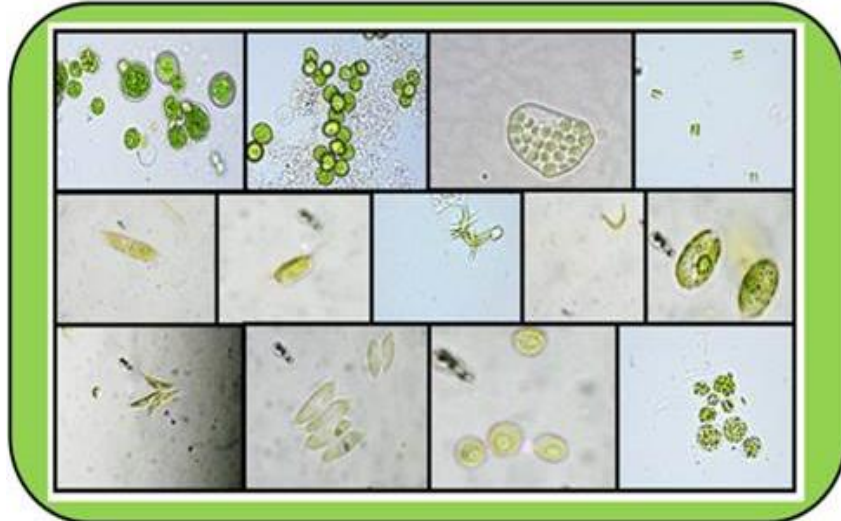
Colonial - 14,8%

Circular - 17,6%

Fusiforme - 23,5%

Cilindrica - 53,0%

Falcada - 5,9%



## *Cyanophyta* -29,5%

Unicelular - 70,8%

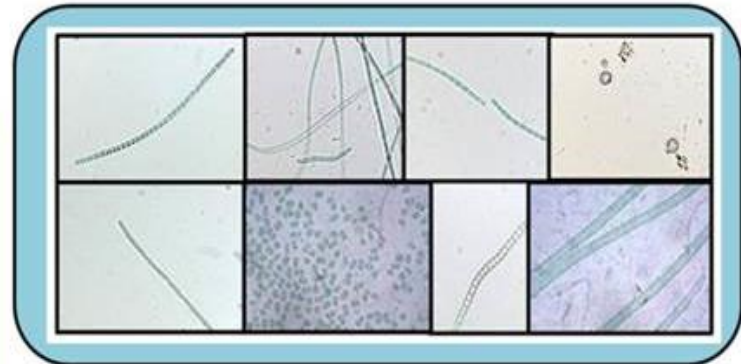
Circular - 59,0%

Fusiforme - 25,5%

Falcada - 15,5%

Filamentosa - 29,2%

Cilindrica - 100%



# Caracterização Genética



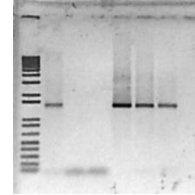
Cultivo  
10 dias



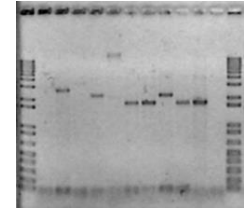
Extração  
do DNA



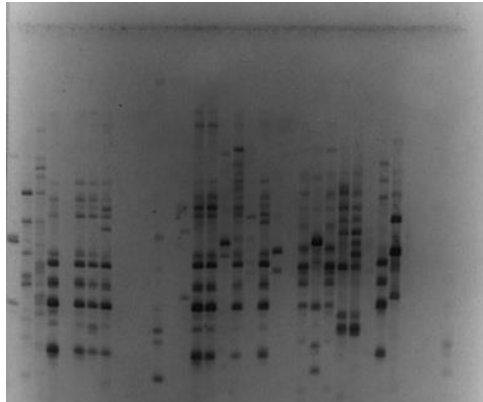
Amplificação  
do DNA



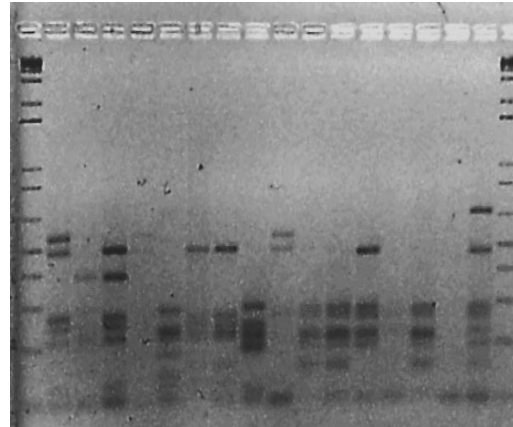
primers de regiões do  
gene 16S de procariotos



primers de regiões do  
gene 18S de eucariotos

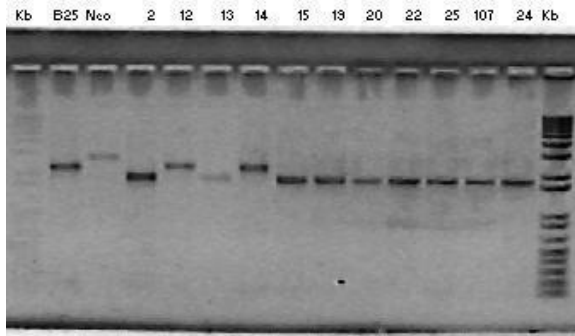


Amplification DNA with primers  
BOX AIR



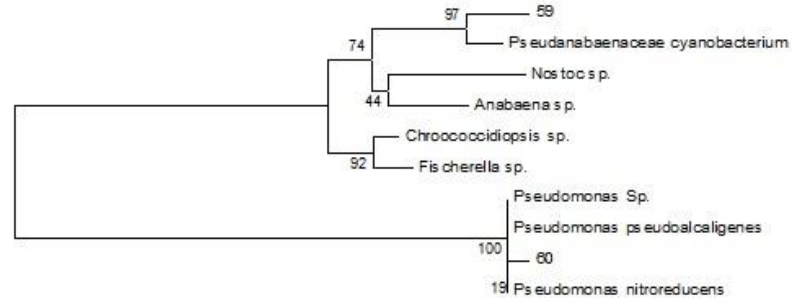
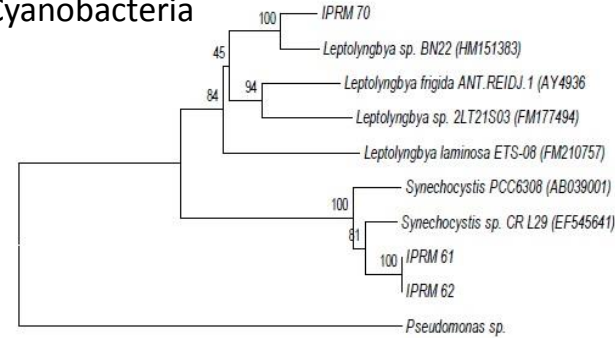
RFLP: DNA PCR

# Caracterização genética - sequenciamento

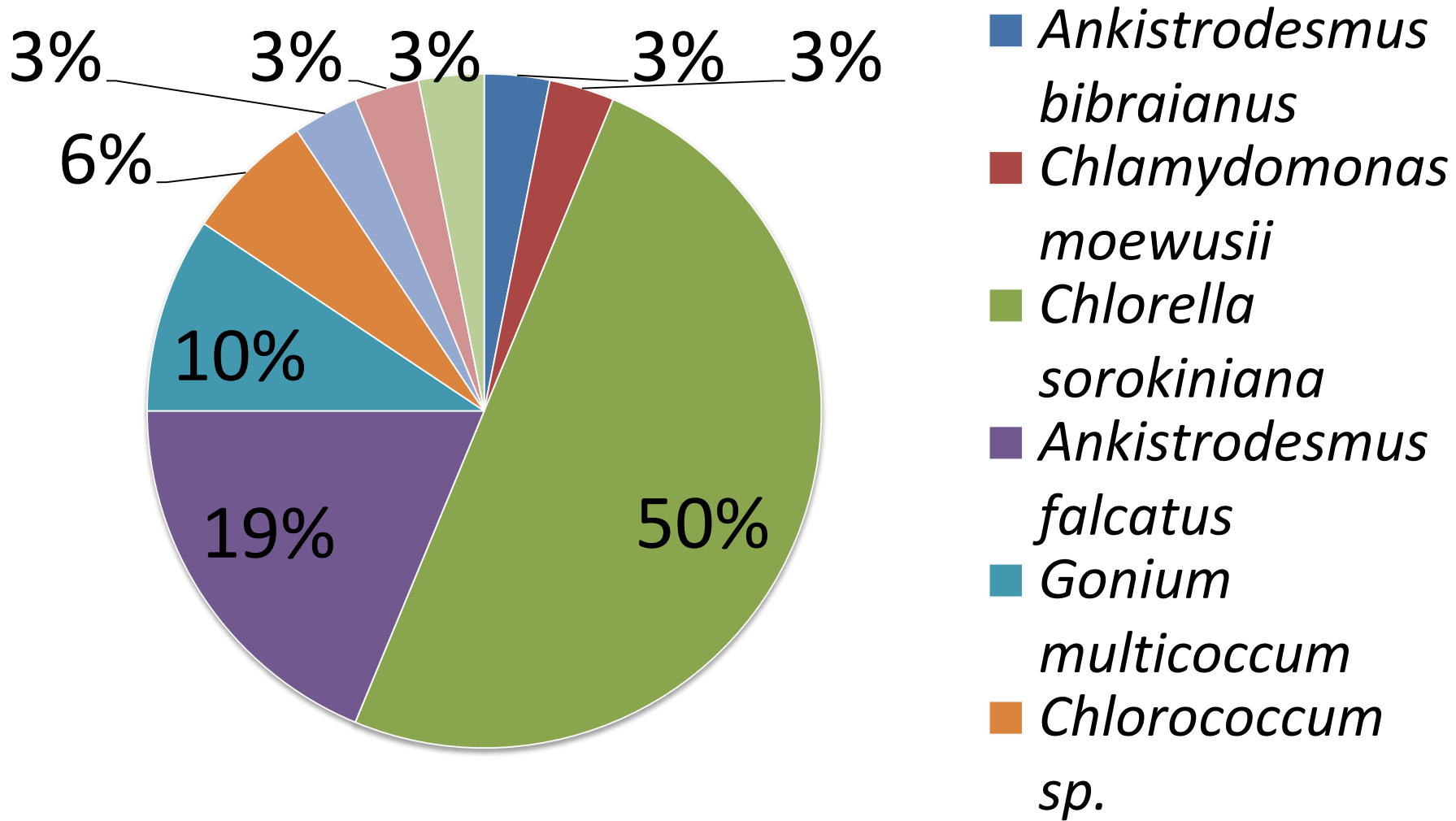


**F** Produto da amplificação do gene 18S rDNA a partir do DNA total de estirpes de microalgas em gel de agarose . KB= peso molecular; B25=*Chlorella protothecoides*, Neo=*Neochloris oleoabundans*, IPR 7002, 7012, 7014, 7015, 7019, 7020, 7022, 7025, 7107 e 7024.

## Cyanobacteria



0.05



## **2- Microalgas: matéria prima para bioenergia.**

- Durante as últimas décadas, além dos estudos de diversidade e ecologia das microalgas, o foco das pesquisas tem sido aplicação biotecnológica para produção de biocombustíveis, proteína e coprodutos, tais como os pigmentos.

## **2- Microalgas: matéria prima para bioenergia.**

- Microalgas produzem metabolites de interesse para produção de biocombustíveis, tornando fonte renovável de energia.
- Cultivos de microalgas são mais caros e complicados, quando comparados as práticas da agricultura conventional.



## **Usinas propõem ao governo adoção do B20 até 2030**

A participação do biodiesel na Matriz Energética Brasileira deve alcançar pelo menos 3,31% em 2030.

O setor propõe um aumento gradual da mistura obrigatória, que poderá seguir o cronograma mínimo B8 em 2017 e B10 até 2019, conforme já previsto em Lei, chegando a B15 em 2025 e B20 em 2030.

setor de biodiesel ao secretário de Petróleo, Gás e Combustíveis Renováveis do Ministério de Minas e Energia

<https://www.biodieselbr.com/noticias/usinas/info/usinas-propoe-governo-adocao-b20-2030-071016.htm>

## Seleção de estirpes de Microalgas

- A seleção de estirpes é uma das mais importantes etapas, porque irá determinar os nutrientes e a forma de cultivo.

# PIGMENTOS



Cultivo (12 d)

Acetona  
90%

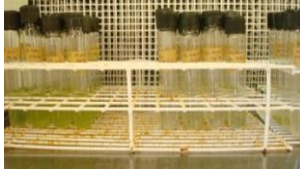
Diluição a 0,06 (670 nm)  
(3 h)

Leitura 480 nm; 510 nm; 630 nm; 645 nm;  
647 nm; 663 nm; 664 nm; 750 nm

Add HCl 1M., reading at 664 nm e 750 nm

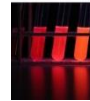
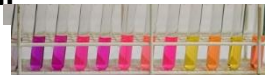


Extraction – ultrafreezer  
(24 h)



# Determinação de lipídeos

Nile Red – fluorescence of lipid in cell

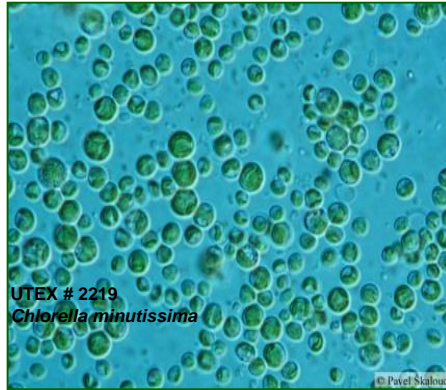


Leitura em espectrofluorométrica (2 h)

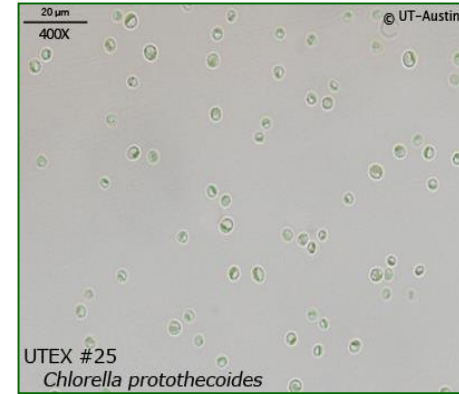


# Teor de Lipídeos ou pigmentos

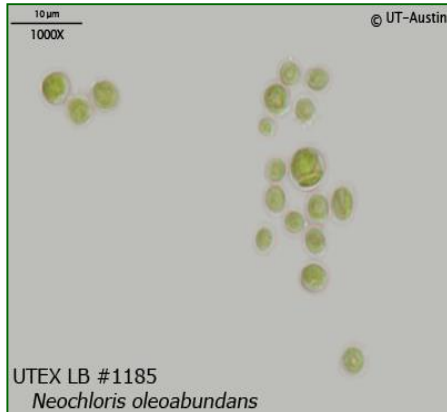
Lipídeo ~30%



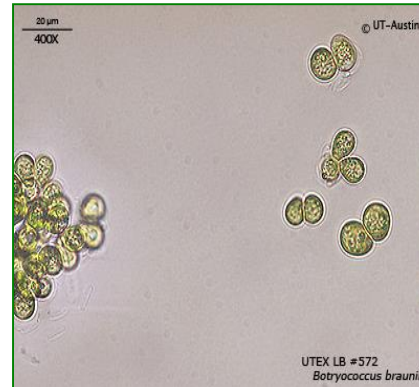
Lipídeo 15-55%



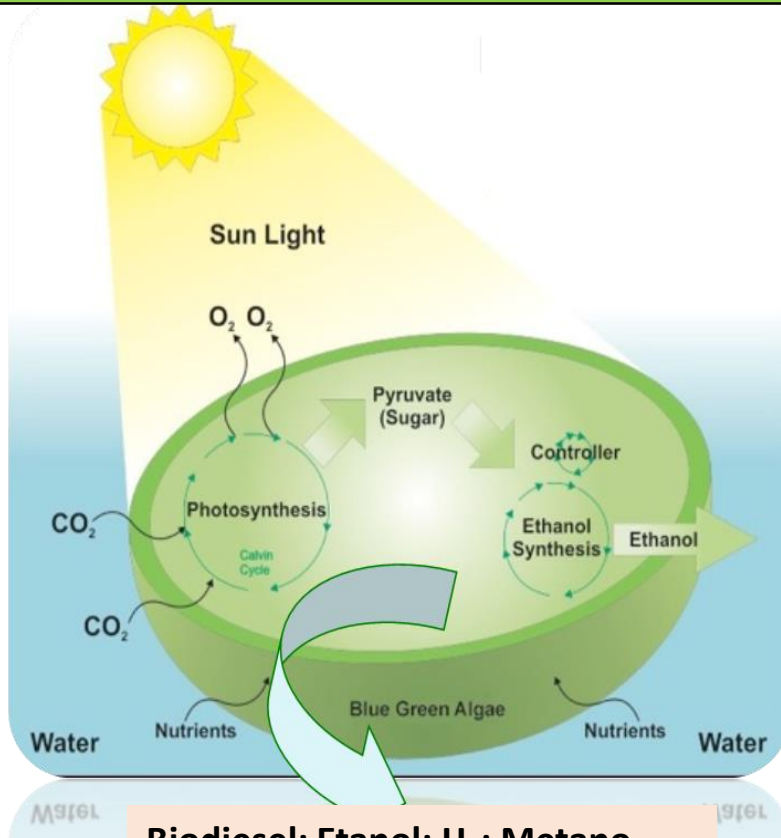
Lipídeo 29-65%



Lipídeo 25-86%



## 2- Microalgas: matéria prima para bioenergia

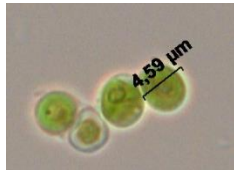


Biodiesel; Etanol;  $H_2$ ; Metano

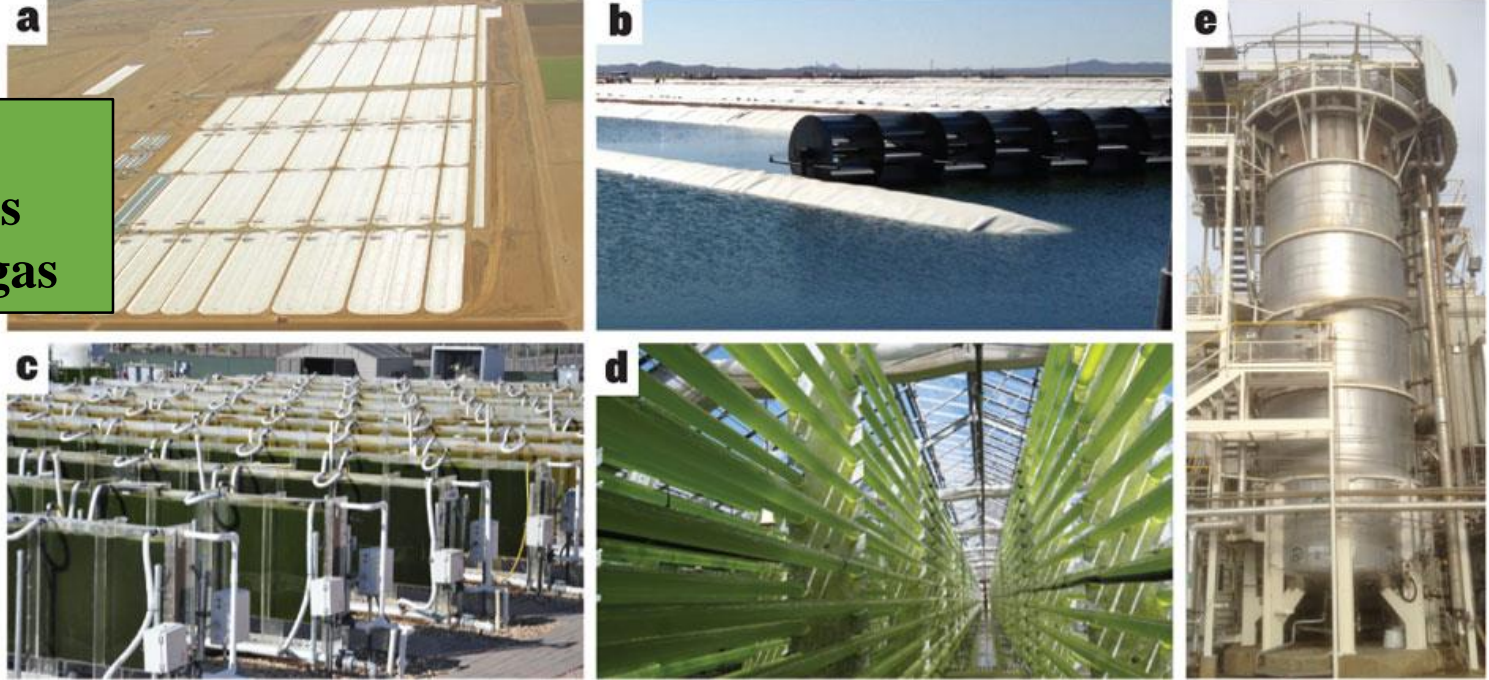
- Produzindo biocombustível de algas explora a capacidade de produzir óleos, com apenas luz solar, carbono e água.
- Microalgas acumulam óleo como lipídeos **não-polar**, tais como triacilglicerídeos (TAGs).
- As membranas fotossintéticas e celular das algas também contém **lipídeos polar** (glicolipídios, fosfolipídios e esteróis). Óleos de microalgas podem produzir biodiesel pela transesterificação, e gasolina (petróleo) ou combustível aviação através da destilação e cracking.

## 2- Microalgas: matéria prima para bioenergia

- Cultivo comercial em grande-escala (1960), já o uso de biomassa da microalga como fonte de energia renovável foi durante a crise energética (1970).
- Podem ser a opção mais adequada para obter matéria prima sustentável para biocombustíveis, atendendo a demanda global devido a alta taxa de crescimento, capacidade de fixação de  $\text{CO}_2$  e grande acúmulo de óleo, comparado a outras culturas oleaginosas.

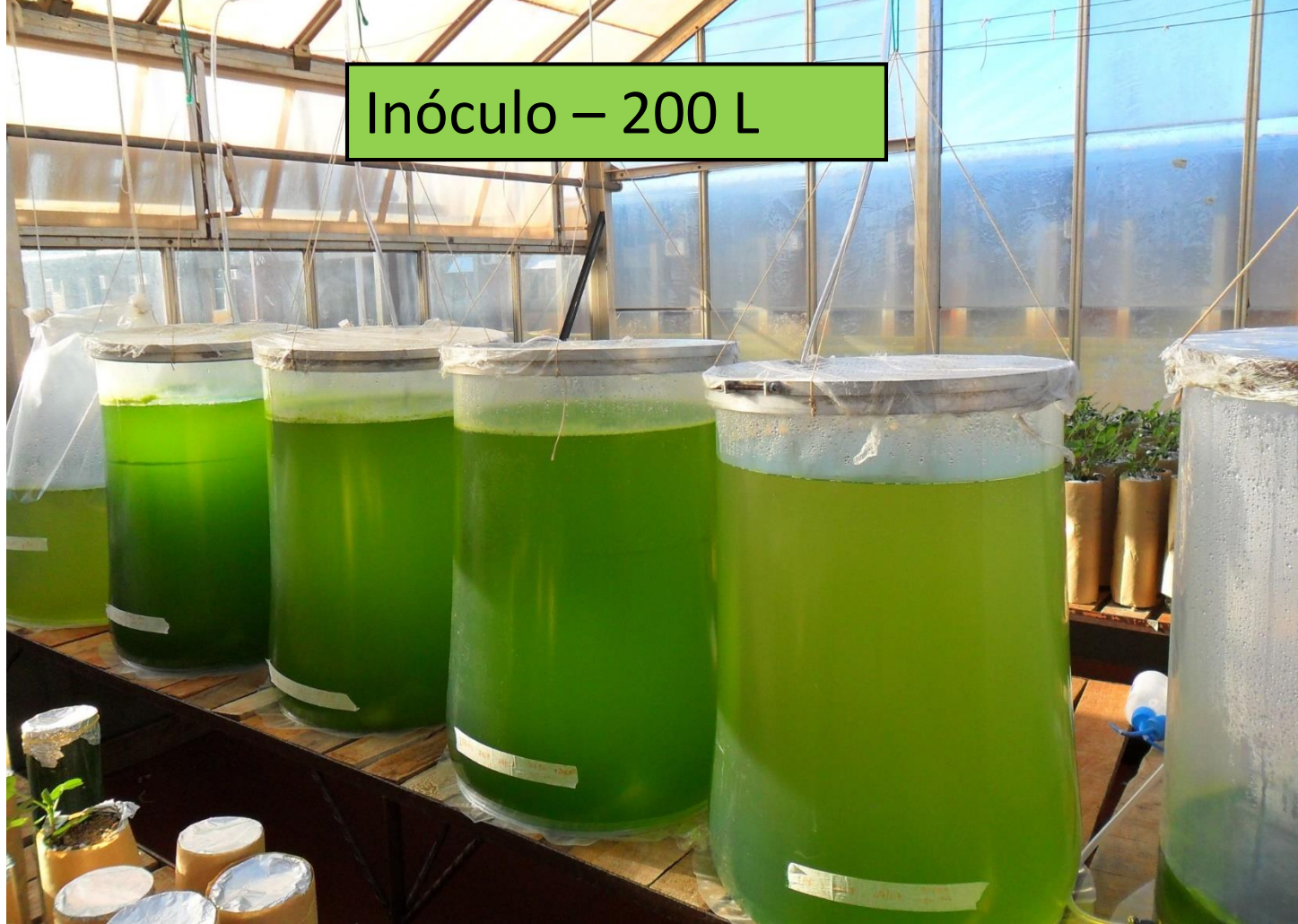


## Sistemas de cultivos de microalgas



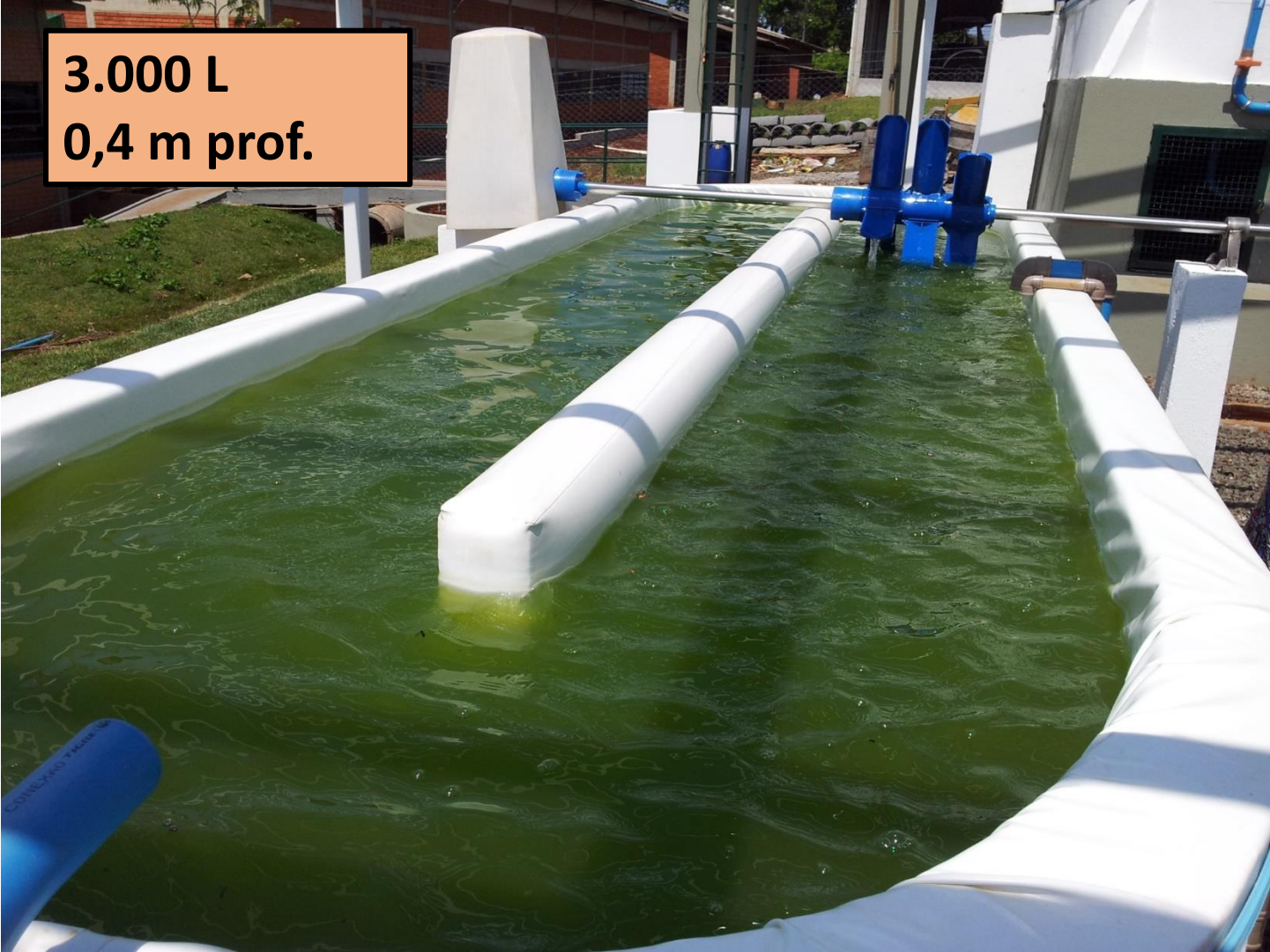
**Sistemas de cultivos escala comercial a)** Lagos de 0,5 ha e 1,0 ha, EUA, Sapphire Energy's Integrada Algal BioRefinery. **b)** lago de 1-milhão-litros com rodas giratórias, instalações de Columbus. **c)** Fotobioreactor painel plano, escala piloto no Laboratory for Algae Research and Biotechnology Universidade Arizona. **d)** fotobioreactor tubular. **e)** Fermentador para cultivo heterotrófico no Martek Biosciences, DSM in Heerlen, Holanda.

Inóculo – 200 L



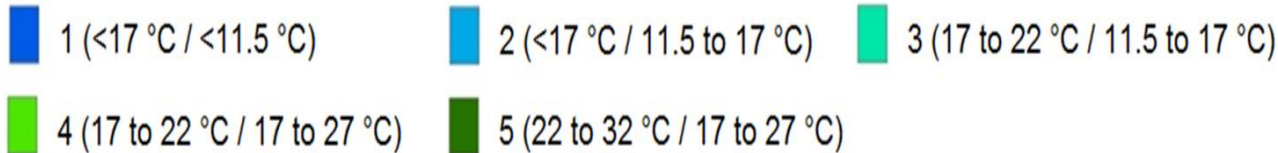
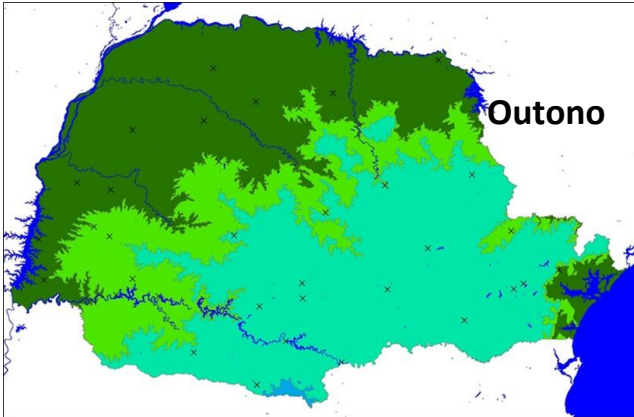
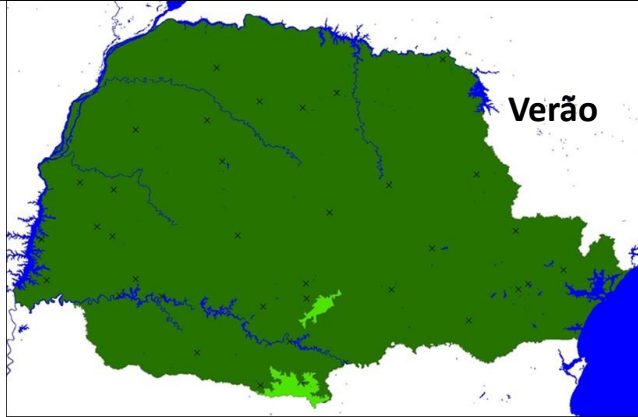
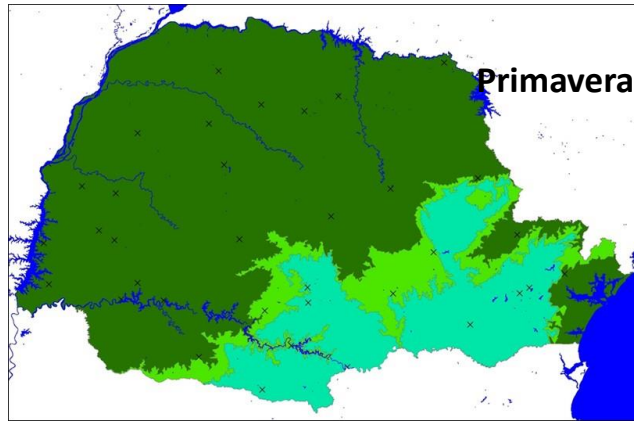
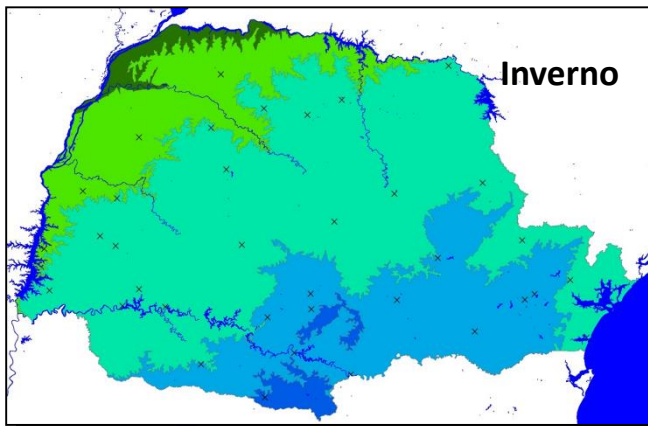


**3.000 L**  
**0,4 m prof.**



# Cultivo microalgas: temperatura

- Os efeitos da temperatura na produção de biomassa, lipídeos e pigmentos por microalgas clorofitas foram avaliados para inferir o potencial de produção em larga escala, nas condições do Paraná.



Com base em dados de temperaturas (+30 anos) e de acordo com produção de biomassa e/ou lipídeos, em condições controlada, foi mapeado quais estirpes são mais adequadas para cultivo em tanques abertos (raceway).

Estirpes IPR e UTEX

# Condições de cultivo

No geral, existem quatro tipos principais de condições de cultivo para microalgas: **fotoautotrófico, heterotrófico, mixotrófico, e fotoheterotrófico.**

## Fotoautotrófico

Cultivo **fotoautotrófico**, células de microalgas podem utilizar luz como fonte de energia e assimilar  $\text{CO}_2$  como fonte de carbono.

## Fotoheterotrófico

**Fotoheterotrófico** processo requer luz e compostos orgânico como fonte de carbono.

## Heterotrófico

**Heterotrófico** utiliza compostos orgânico (e.g., glucose, acetate, glycerol) como fonte de energia e de carbono em escuro total.

## Mixotrófico

**Mixotrófico** é definido como o crescimento no qual  $\text{CO}_2$  e carbono orgânico são assimilados simultaneamente, ambos metabolismos respiratório e fotossintético operam concorrentemente

## Tratamento de águas residuais por microalgas

O cultivo em grande escala é um sério problema devido a enorme quantidade de água potável que pode competir com agricultura e uso humano.

# Cultivos em águas residuais



**Rresidue suínos produção biogás**



**Indústria de suco de laranja**



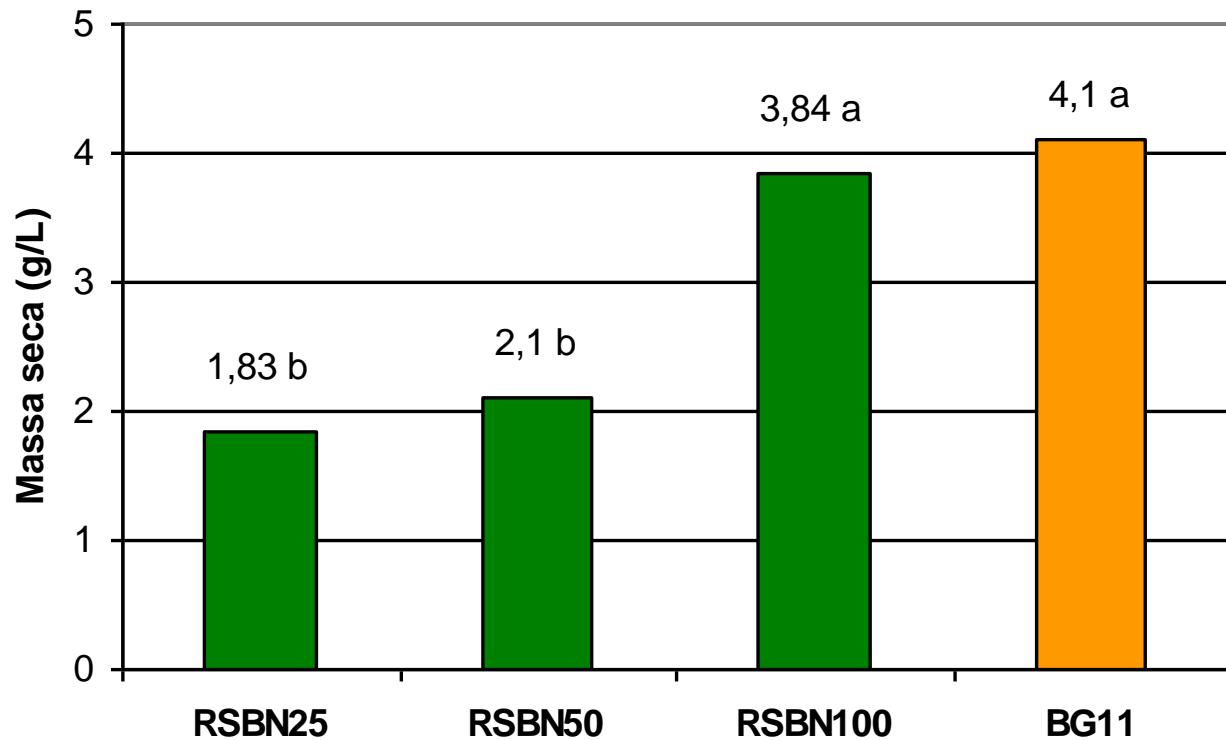
**Vinhaça**



**Lixiviado urbano**

**Para cultivo Heterotrófico**  
**Soro de leite,**  
**Análises composição.**

Biomassa de *Chlorella vulgaris* (g L<sup>-1</sup>) cultivada em com resíduo da produção de biogás, com três doses de N, equivalente a 25% (RSBN25), 50% (RSBN50) e 100% (RSBN100) comparado ao meio de cultivo BG-11 (Costa et al., 2014).



# Meios de cultivo.

Silva et al. *AMB Expr* (2016) 6:10  
DOI 10.1186/s13568-016-0180-5

 **AMB Express**  
a SpringerOpen Journal

ORIGINAL ARTICLE

Open Access



## Combining glucose and sodium acetate improves the growth of *Neochloris oleoabundans* under mixotrophic conditions

Helder Rodrigues Silva<sup>1,4</sup>, Cassio Egidio Cavenaghi Prete<sup>1</sup>, Freddy Zambrano<sup>1,4</sup>, Victor Hugo de Mello<sup>4,3</sup>, Cesar Augusto Tischer<sup>2</sup> and Diva Souza Andrade<sup>4\*</sup>

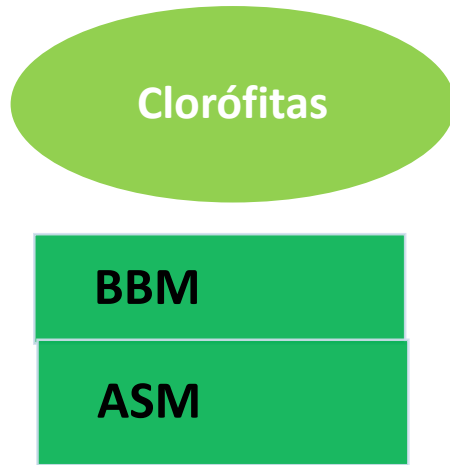
### Abstract

Mixotrophic cultivation is a potential approach to produce microalgal biomass that can be used as raw materials for renewable biofuels and animal feed, although using a suitable, cost-effective organic carbon source is crucial. Here, we used a Box–Behnken design with three factors, the glucose and sodium acetate concentrations, and the percentage of Bold's basal medium (BBM), to evaluate the effects of different carbon sources on biomass productivity and the protein and lipid contents of *Neochloris oleoabundans* (UTEX#1185). When grown at optimal levels of these factors, 100 % BBM plus 7.5 g L<sup>-1</sup> each of glucose and sodium acetate, *N. oleoabundans* yielded 1.75 g L<sup>-1</sup> of dry biomass, with 4.88 ± 0.09 % N, 24.01 ± 0.29–30.5 ± 0.38 % protein, and 34.4 % ± 0.81 lipids. A nuclear magnetic resonance spectrum (1H NMR) of a lipid extract showed that the free fatty acid content was 11.25 %. Thus, combining glucose

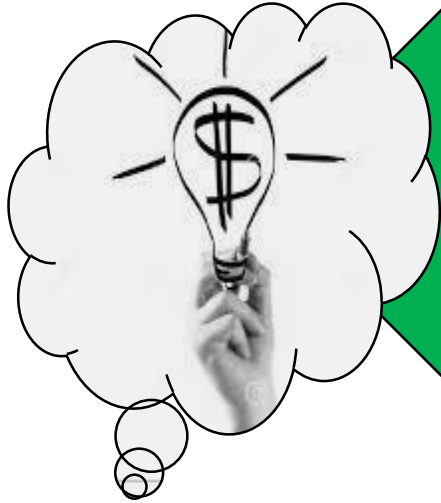


## OTIMIZAÇÃO DE MEIO DE CULTURA ECONOMICAMENTE VIÁVEL

- Meios sintéticos



**A produção de biomassa em escala comercial requer otimizações nos sistemas de produção, para tornar o processo economicamente viável.**



**Uso de meios  
alternativos**

**Substrato eficiente de  
menor custo**

**Cultivos mixotróficos  
compostos de  
Fertilizantes agrícolas**

## Meio de cultivo baseado em nutrientes fertilizantes para Hidroponia

FERTILIZANTES	Zn	Mo	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Fe
	%										
1. MAP			12	61							
2. CaNO <sub>3</sub>			15,5			18					
3. NPKMgS			8	10	40		1,8	2,4			
4. Micronutrientes	10	1					5	11	3	1	0,5

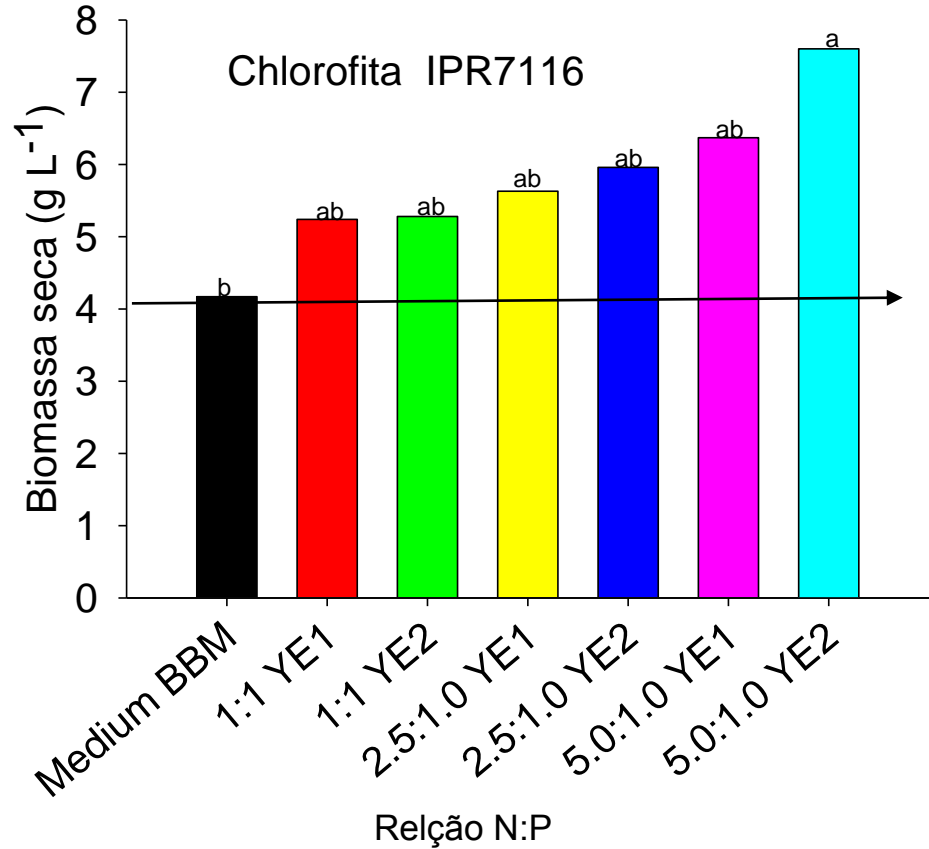


EXTRATO DE LEVEDURA

# Crescimento mixotrófico

O objetivo deste estudo foi avaliar o crescimento de microalgas em meio de cultura contendo: nitrato de cálcio ( $\text{CaNO}_3$ ), fosfato monoammonium ( $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ), formulado N/P/K/Mg/S e micronutrientes.

✓ Extrato de levedura foi adicionado em intervalos de um dia (YE1) e dois dias (YE2) como fonte nitrogênio, carbono orgânico, e vitaminas.



# Colheita de Microalgas

***Desafios !!***

## Colheita da biomassa

Após cultivo, a biomassa tem que ser separada do meio de cultivo e recuperada para o processamento. Entretanto, as microalgas crescem em suspensões diluídas ( $<0,5 \text{ kg m}^{-3}$  biomassa seca) e superfície de carga negativa resulta em suspensões dispersas e estáveis de algas (Sanyano et al .,2013).

# Colheita da biomassa

Apesar das muitas vantagens, o gargalho dessa tecnologia ainda é representada pelos custos do processo, economico e energetico. Por exemplo, colheita e secagem da biomassa das microalgas de cultivos com grandes volumes de água consumen energia no processo.

# Colheita da biomassa

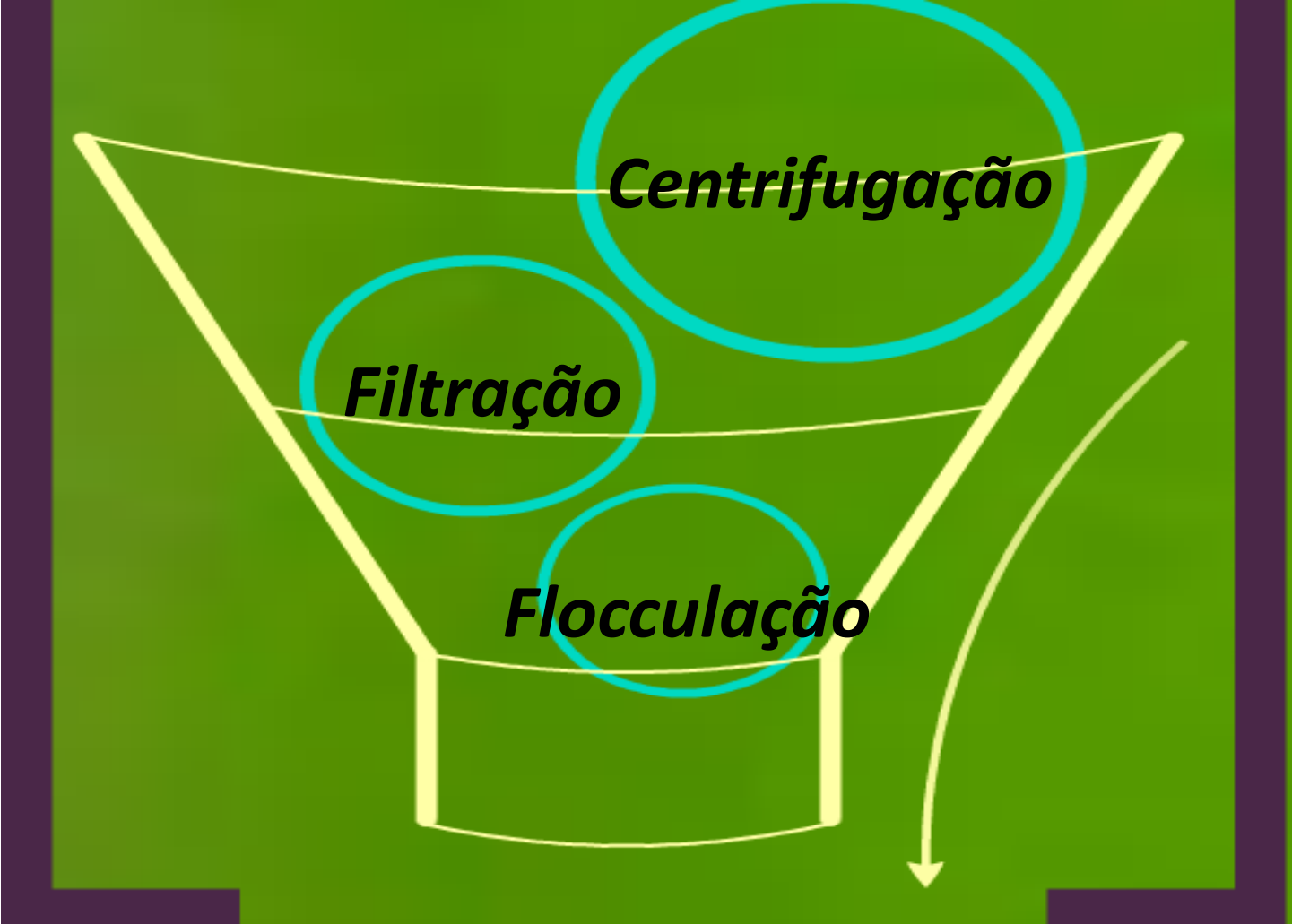
- Colheita consiste na separação da microalga pela sedimentação ou floculação, seguida pela filtração ou centrifugação para remover a água. Secagem da microalga é uma etapa que consome energia, a qual é uma das maiores restrições ao desenvolvimento comercial.
- Secagem solar é uma opção, mas ainda problemática com a atual tecnologia, considerando o tempo e o espaço requerido.



# Colheita da biomassa





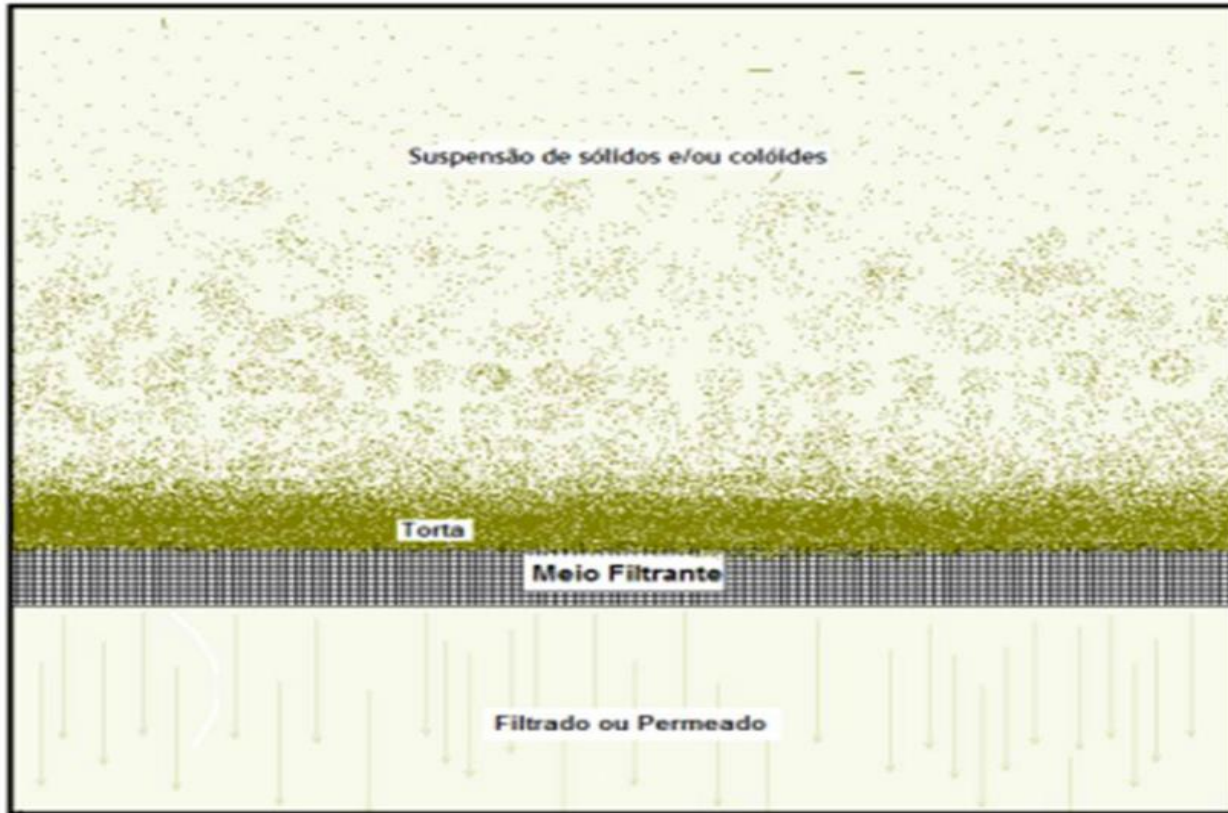


# Centrifugação

- Técnica sucesso em escala de laboratório
- Alta eficiência: acima de 90%
- Alto consumo de energia, considerada uma técnica não-viável para grandes produções (Mohn 1988).

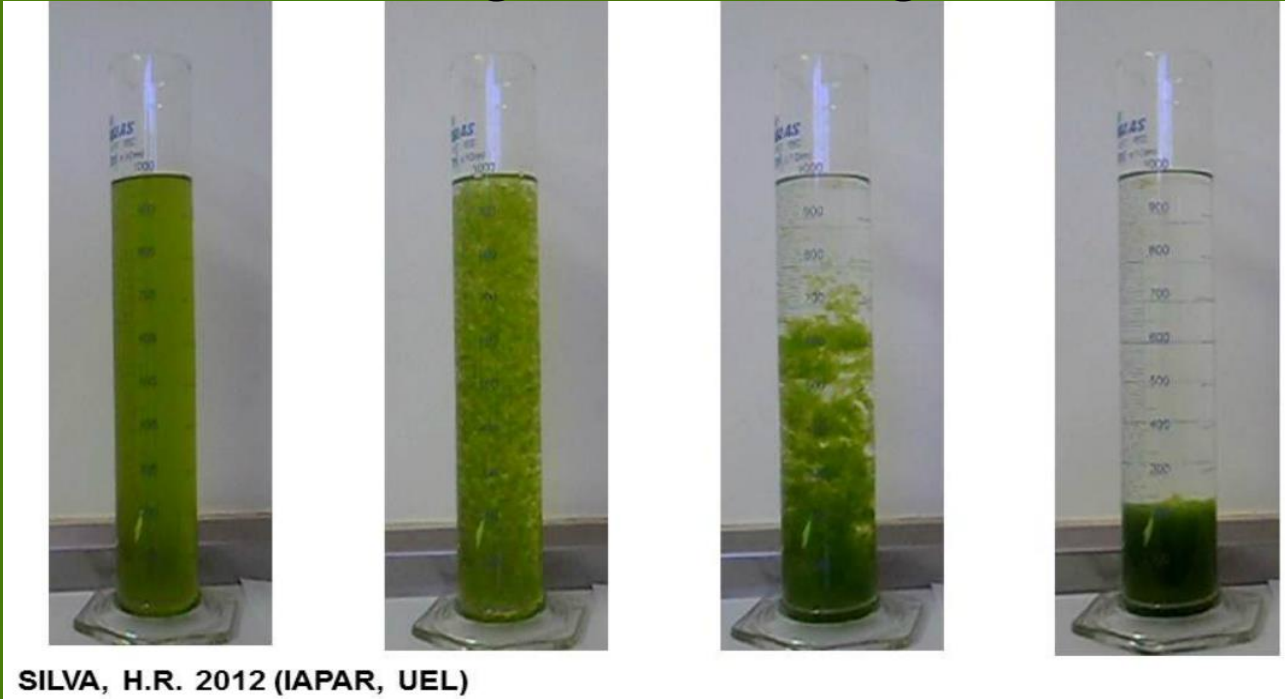


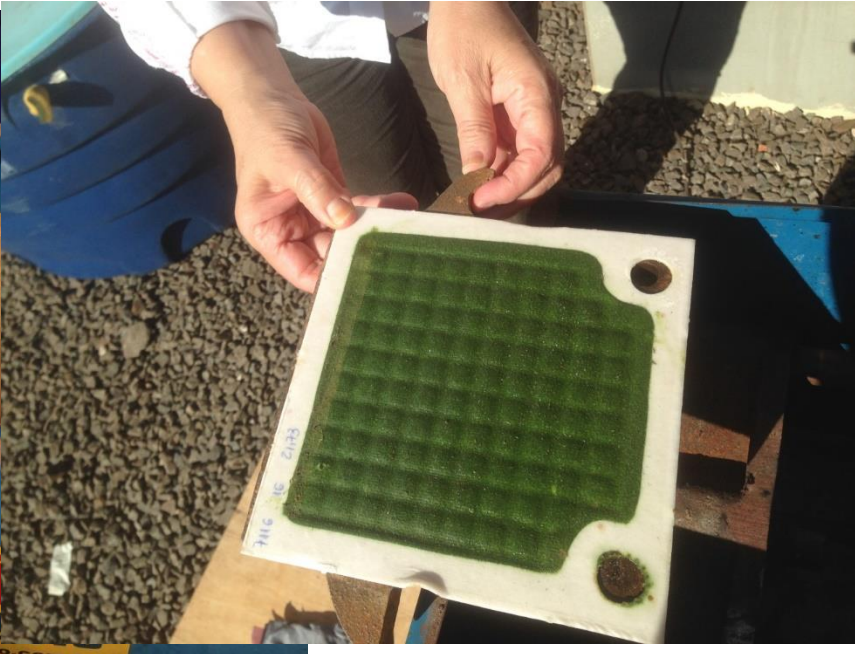
# Filtração



# Floculação

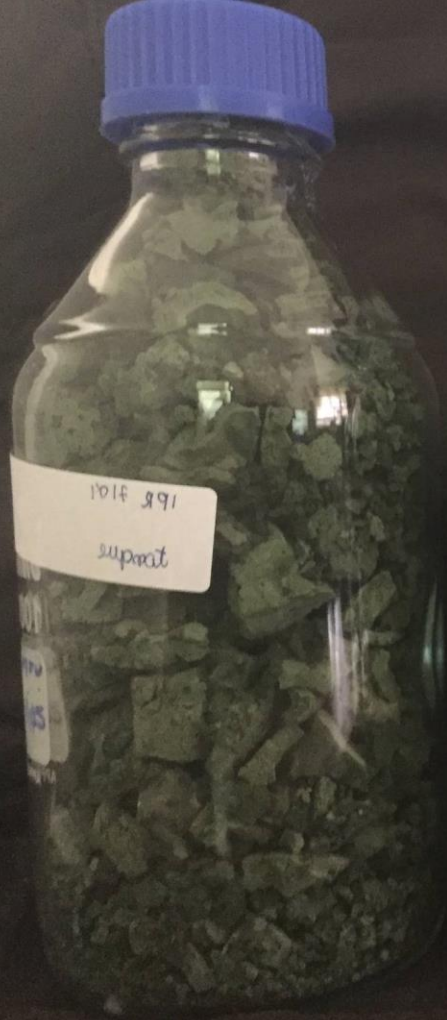
- Alta eficiência: acima de 90 %,
- Floculantes orgânicos ou inorgânicos.

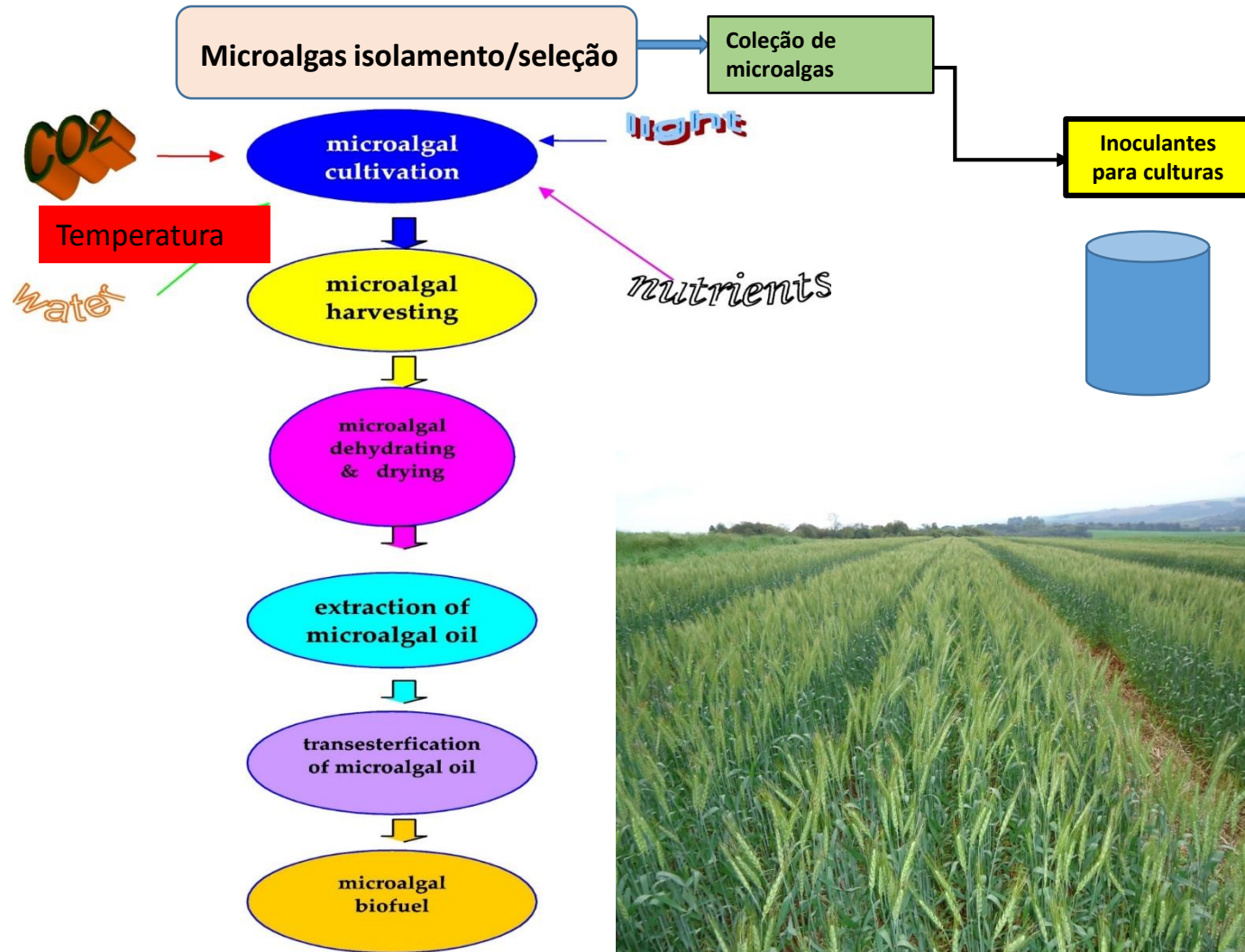






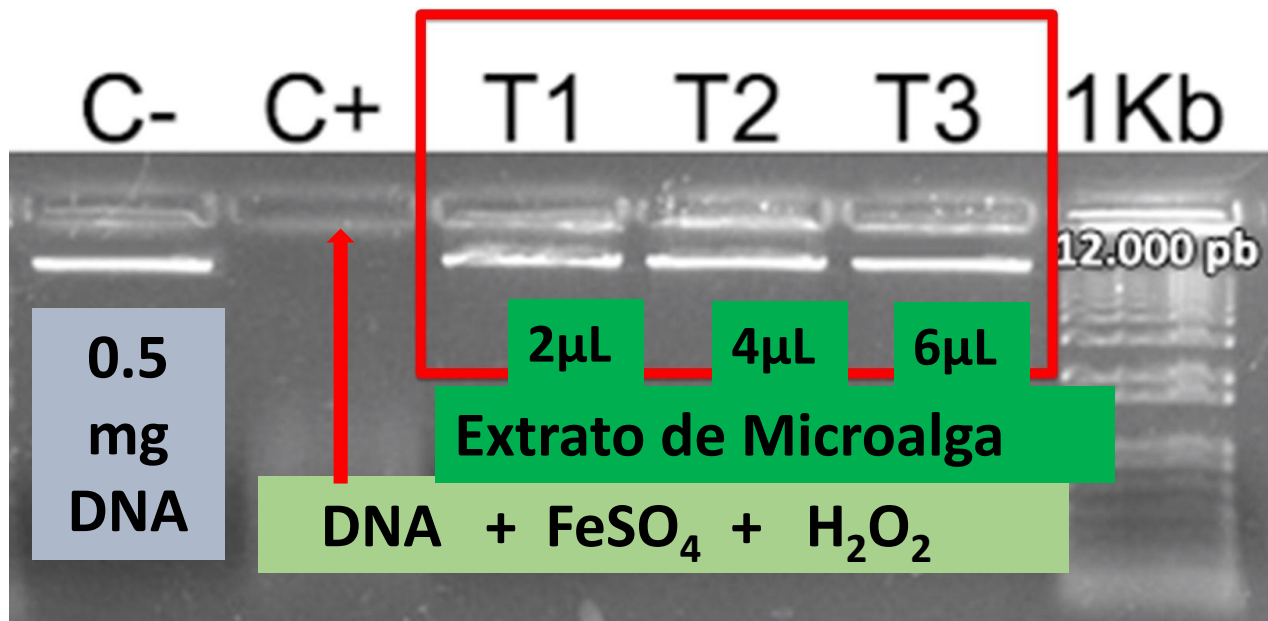






## Atividade antioxidante

Perfil eletroforético das diferentes concentrações do extrato hidro-alcoólico de *Chlorella sorokiana* (IPR7175) sobre a integridade do DNA de *Rhizobium* sp.



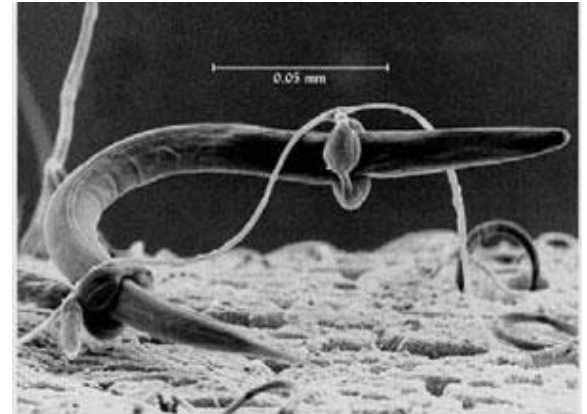
# Interação entre microalgas e rizóbios no manejo de *Heterodera glycines* em soja e feijão

Karen Sinéia de Oliveira (Dissertação mestrado, IAPAR)

Objetivo – Interação Microalgas possuem controle direto ou de indução de resistência às plantas, influenciando na redução da população do nematoide do cisto em soja e feijão

Controle biológico:

- Seguro
- Sustentável ao ambiente.



A nematode being trapped by the hyphae of fungi. Fonte: George Barron.

# Indução de Resistência

- Ação da cianobacteria contra nematoíde não é bem conhecida. - Entretanto, a redução do dano nematoide pode ser atribuído a efeitos diretos da neurotoxinas ou parcialmente a fixação biológica de nitrogênio.
- Cianobactérias suprimiu a população de nematoides da galha de tomateiros e aumentaram o crescimento de plantas. Por reduzir a quantidade de galhas nas raízes e a quantidade de inoculo secundário de nematoides.
- *Anabaena*, *Nostoc* e *Oscillatoria* produzem metabolitos secundarios, por exemplo, compostos de nitrogenio contend, polipolitideos, lipopeptideos, peptideos ciclos e outros.

**Zakaullah Khan, 2015. Beneficial effects of cyanobacteria in the management of plant parasitic nematodes in agricultural crops. Cyanobacteria for Management of Plant Parasitic Nematodes**  
BY: [Dr. Zakaullah Khan](#) Submitted: 2015-09-18 11:02:57

# Bifurcação das raízes

## *“Split-root system”*

Martinuz, Schouten & Sikora (2012) em tomate.

vasos plásticos 700 mL

solo+areia 2:1

esterilizado 160°C por 5 h

7 dias após sementeira



Foto: Karen Sineta

# Cianobacteria como PPG em milho

A pesquisa visa caracterizar e avaliar a inoculação de microalgas na produção de milho, com os objetivos de verificar:

- A capacidade de produzir compostos promotores de crescimento de plantas em condições de laboratório;
- o efeito da inoculação do milho com estirpes selecionadas de cianobactérias em casa de vegetação.
- os efeitos das microalgas como inoculante na produção do milho em condições de campo.



# Microalgas: promotoras de crescimento de plantas

- Para avaliar o efeito da inoculação de cianobacteria no desenvolvimento do milho, um experimento foi conduzido em casa de vegetação com solo natural e autoclavado.
- As estirpes (IPR) de cianobacteria mostraram capacidade de FBN *in vitro*, mas não foram observados efeitos significativos da inoculação na concentração de N total na parte aérea do milho.

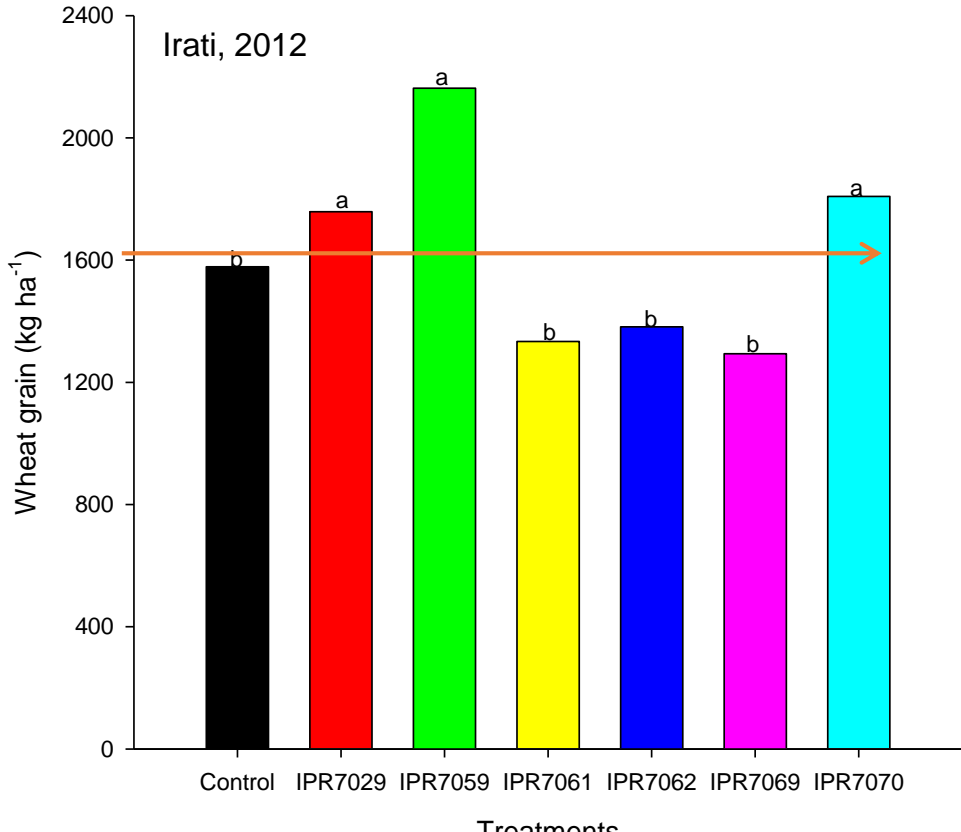




### 3- Microalgas: promotoras de crescimento de plantas

- Resposta do trigo, amendoim, feijão e soja a coinoculação com estirpes de microalgas e de *Azospirillum* ou rizobio autorizadas pelo MAPA para inoculantes.

# Coinoculação de *Azospirillum* e microalgas em trigo aumenta a produção de grãos.

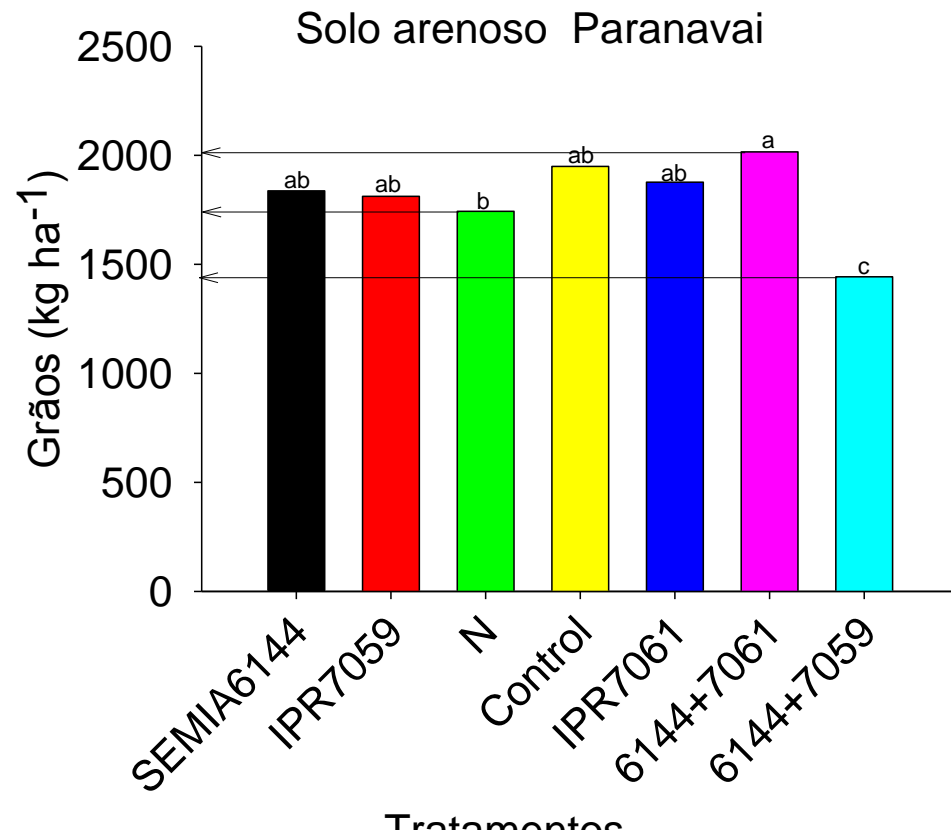


# Coinoculação do amendoim com *Bradyrhizobium* e cianobactéria



***Arachis hypogaea* L. Fabaceae**

# Resposta do amendoim a coinoculation com *Bradyrhizobium* sp. e cyanobacteria



**Aumentos de 25%  
IPR7061 em relação ao  
tratamento com N**

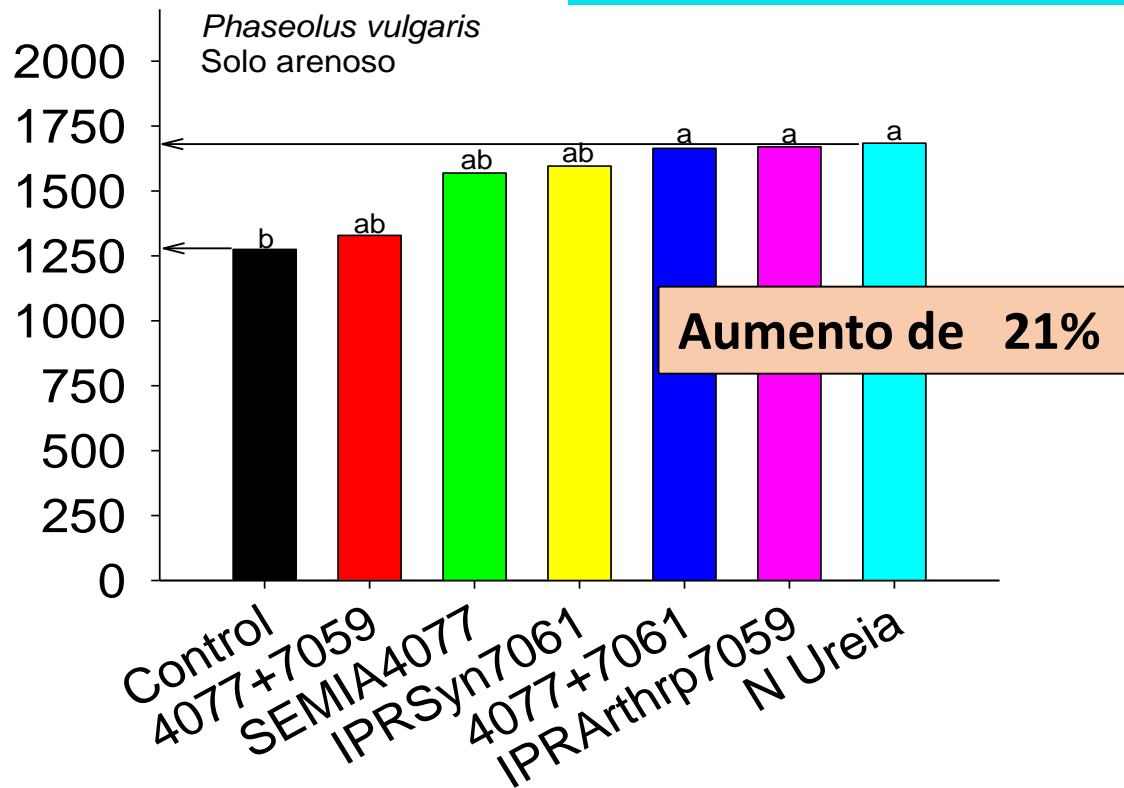
**N fertilizante reduz produção  
quando comparado com  
coinoculação de bradyrhizobia e  
cianobacteria.**

**Microalgas como promotora de  
crescimento de plantas: feijoeiro**

# Resposta do feijoeiro a coinoculação

Grãos (kg por ha)

*Rhizobium tropici* (CIAT899) e cianobactéria



# Perspectivas

- Desenvolvimento de um sistema mixotrófico (heteroautotrófico) eficiente para tratamento de águas residuais e produção de biomassa de microalgas de baixo-custo como matéria prima biocombustível.
- A capacidade de microalgas em aumentar o rendimento das culturas, quando inoculadas com rizóbio/Azospirillum, amplia o papel desses microorganismos fotossintéticos além do uso original na aquicultura / biocombustível.

# Perspectivas

- Concluimos que, no Brasil as microalgas têm grande potencial de cultivo, tanto como fonte de energia renovável, quanto na agricultura como controle biológico e promotores de crescimento de plantas.





Muito obrigada!!!



[diva@iapar.br](mailto:diva@iapar.br)