

# OTIMIZAÇÃO DA AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR DE MICROALGAS EM ESTUDOS EXPERIMENTAIS

Rafael Rodrigues de Paiva<sup>1</sup>, Marcela Miranda<sup>2</sup>, Anderson Freitas Vilela<sup>3</sup>, Maria Carolina Silva Soares<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Mestrando. Pós-graduação em Ecologia. Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Biologia; Laboratório de Ecologia Aquática; e-mail: [rafaelrpaiva@gmail.com](mailto:rafaelrpaiva@gmail.com)

<sup>2</sup> Mestre em Ecologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Laboratório de Ecologia Aquática;

<sup>3</sup> Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Laboratório de Ecologia Aquática;

<sup>4</sup> Professora do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Juiz de Fora, MG.

## Resumo

Ao estudar a ecologia de microalgas, busca-se obter ferramentas para a melhor compreensão para sua ocorrência, assim como fatores chave para o entendimento e manejo destes organismos. Os principais parâmetros de quantificação da variação do crescimento das microalgas são avaliação da densidade celular e biovolume, bem como concentrações de carbono intracelular. Entretanto, essas análises são demoradas e trabalhosas, especialmente em desenhos experimentais longos e com muitos tratamentos. Visando simplificar a obtenção dos resultados de experimentos com estes organismos, o objetivo deste trabalho foi realizar curvas de calibração de quatro variáveis (clorofila-*a*, carbono intracelular, densidade celular e densidade ótica) para três cepas de algas (*Cylindropermopsis raciborskii*, *Microcystis aeruginosa* e *Scenedesmus* sp.). Em geral, houve uma elevada relação entre as quatro variáveis avaliadas para as três cepas. Estes resultados permitem que fórmulas de regressões sejam usadas na determinação de carbono, clorofila-*a* e densidade a partir de apenas uma variável. O uso destas fórmulas de regressão será importante principalmente para determinar a concentração de variáveis que exigem um maior tempo de análise a partir daquelas com uma determinação mais rápida.

**Palavras-chave:** cianobactérias, ecologia aquática, experimentos, métodos.

## Introdução

A realização de experimentos em laboratório proporciona uma melhor compreensão da ocorrência, biologia e comportamento de vários organismos. Ao estudar a ecologia de microalgas, busca-se obter ferramentas para a melhor compreensão da sua ocorrência, assim como fatores chave para o entendimento e manejo de florações de cianobactérias. Florações de cianobactérias representam um grave problema em ecossistemas aquáticos continentais. As ocorrências de florações estão, na maioria dos casos, diretamente relacionadas às atividades antrópicas, como a eutrofização artificial de ambientes aquáticos (AZEVEDO et al. 2008). Tal fato pode levar à perda da qualidade da água, mudanças na cadeia trófica, perda de diversidade, mortalidade de peixes e animais domésticos e prejuízo à saúde dos humanos (CARMICHAEL et al., 2001; PAERL e HUISMAN, 2009). Experimentos realizados com microalgas são longos e geralmente demandam um grande esforço de trabalho, principalmente na quantificação da densidade celular e biovolume, bem como nas concentrações de clorofila-*a* e carbono intracelular.

A técnica utilizada para a quantificação de amostras de microalgas de contagem em microscópios óticos usando câmeras de contagem (Neubauer, Sedwick-Rafter, etc) é um processo trabalhoso e demorado (VALER E GLOCK, 1998). Sua maior desvantagem é o tempo necessário para cada análise e a subjetividade do profissional. Uma forma mais avançada de detecção de cianobactérias principalmente as tóxicas, é por quantificação via PCR, porém os reagentes químicos e o equipamento utilizado nessa técnica tornam esta análise ainda muito cara. A espectrofotometria, análise da densidade ótica (absorbância a 750) e clorofila-*a* são técnicas baratas e muito eficientes na quantificação de microalgas. Dentre estas variáveis, CHORUS E BARTRAN (1999) apontam

que a utilização dos valores de clorofila-*a* seria mais eficiente uma vez que a quantidade por célula varia muito entre os organismos e condições ambientais.

Dentre outros métodos, a obtenção do número de célula da espectrofotometria pode ser realizada a partir da densidade ótica (absorbância a 750) ou clorofila-*a* (PHYTO-PAM) para uma cultura unialgal. Para esta combinação, equações de regressão podem ser feitas a fim de se prever o número de células de uma amostra baseada na espectrofotometria. Estas regressões permitem uma maior agilidade e rapidez na obtenção dos resultados. O ideal é ter uma curva de calibração para a cada espécie de microalga e condições analisadas. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a relação (correspondência matemática) entre densidade celular x densidade ótica, densidade celular x clorofila-*a* e densidade celular x carbono intracelular de três cepas de algas, visando simplificar a obtenção dos resultados de experimentos com estes organismos.

## Material e Métodos

As cepas utilizadas neste experimento foram CYRF-01 (*Cylindrospermopsis raciborkii*), MIRF-01 (*Microcystis aeruginosa*) e LEA-06 (*Scenedesmus sp.*). As duas primeiras cepas foram isoladas do Reservatório do Funil/RJ e a última do Reservatório de Itumbiara/GO. Estas cepas são mantidas no banco de culturas do Laboratório de Ecologia Aquática (LEA), da UFJF em meio WC modificado (LÜRLING e BEEKMAN, 1999), 25°C, 35  $\mu\text{mol}$  de fótons. $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  e fotoperíodo 12 horas.

A densidade de células foi estimada em câmara de Neubauer, em microscópio Olympus BX41, a aumento 40X. Já a densidade ótica foi estimada através da absorbância em 750 nm (A750), usando o meio de cultivo WC para calibrar o branco. As leituras foram realizadas no espectrofotômetro Beckman-Cuchilla DU-640. A clorofila-*a* foi obtida através da fluorescência, utilizando um espectrofluorímetro PHYTO-PAM (Heins Walz GmbH, Alemanha). Para análises de carbono intracelular das culturas, as amostras secas foram queimadas a 1000 °C em fluxo constante de O<sub>2</sub> gasoso ultra-puro. O método utilizado consiste na conversão de todas as formas de carbono presentes na amostra em carbono inorgânico (CO<sub>2</sub>), através da combustão total da amostra por um Boat Sampler. Os resultados CO<sub>2</sub> foram detectados com por um analisador padrão NDIR que utiliza um sensor de infravermelho não dispersivo para o monitoramento contínuo da emissão (Phoenix 8000 – Tekmar Dohrmann).

O crescimento das três algas foi avaliado ao longo de 12 dias. Foram feitas tréplica para cada cepa, que foram mantidas nas mesmas condições controladas do banco de culturas. Amostras foram retiradas diariamente para avaliação da clorofila-*a*, densidade celular e densidade ótica. E a cada três dias para a análise de carbono. A taxa de crescimento destes organismos foi calculada a partir da inclinação da reta que indica o comportamento de cada alga ao longo de 12 dias. Análises de regressão foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SPSS ® 13.0 com posterior determinação de equações das retas.

## Resultados e Discussão

A cepa CYRF-01 cresceu exponencialmente até o 12º dia da curva ( $r^2 = 0.97$ ), possuindo uma taxa de crescimento exponencial de  $0.39 (\pm 0.03) \text{d}^{-1}$  e total de  $0.37 (\pm 0.00) \text{d}^{-1}$ . A cepa LEA-06 também cresceu exponencialmente até o 12º dia do experimento ( $r^2 = 0.97$ ), apresentando taxas de crescimento exponencial e total de  $0.31 (\pm 0.01) \text{d}^{-1}$ . Finalmente, o crescimento exponencial também aconteceu até o 12º para a cepa MIRF-01 ( $r^2 = 0.93$ ), com taxas de crescimento exponencial e total de  $0.32 (\pm 0.03)$  e  $0.30 (\pm 0.02)$ , respectivamente.

A concentração média de carbono intracelular foi de  $12.2 (\pm 14.1) \text{mgC.L}^{-1}$  para CYRF-01,  $0.09 (\pm 0.08) \text{mgC.L}^{-1}$  para MIRF-01 e  $22.6 (\pm 27.6) \text{mgC.L}^{-1}$  para LEA-06. Para clorofila-*a*, as concentrações médias foram de  $340.1 (\pm 331.3)$ ,  $447.9 (\pm 427.5)$  e  $1333.6 (\pm 1115.9) \mu\text{g.ml}^{-1}$  para

CYRF-01, MIRF-01 e LEA-06, respectivamente. A densidade média foi de  $3.14 \times 10^6 (\pm 3.71 \times 10^6)$  céls.ml<sup>-1</sup> para CYRF-01,  $1.59 \times 10^6 (\pm 1.51 \times 10^6)$  céls.ml<sup>-1</sup> para MIRF-01 e  $1.49 \times 10^6 (\pm 1.49 \times 10^6)$  céls.ml<sup>-1</sup> para LEA-06. Os valores médios de absorvância (densidade ótica) para CYRF-01, MIRF-01 e LEA-06 foram de 0.1 ( $\pm 0.09$ ), 0.09 ( $\pm 0.08$ ) e 0.2 (0.19), respectivamente.

Em geral, houve uma relação alta entre as variáveis: densidade celular x densidade ótica, densidade celular x clorofila-*a* e densidade celular x carbono intracelular para as três cepas estudadas. As equações encontradas a partir de regressões estão indicadas na TABELA 1. Esta alta relação entre as variáveis analisadas permitem que as fórmulas de regressões sejam usadas na determinação de carbono intracelular, clorofila-*a* e densidade em posteriores estudos nos quais as condições de cultivo das algas tenham sido similares às deste presente estudo. O uso destas fórmulas de regressão será importante principalmente para determinar a concentração de variáveis que exigem um maior tempo de análise (e.g. carbono, densidade e biovolume celular) a partir daquelas com uma determinação mais rápida (e.g. clorofila-*a*, densidade ótica). Deste modo, a obtenção dos resultados ao longo dos experimentos poderá ser simplificada.

Tabela 1: Equações da reta obtidas a partir de regressões.

	Densidade ótica (DO)	Carbono (CARB)	Clorofila- <i>a</i> (ChL)
CYRF-01	DN = -46591.427 + (28369392.576 * DO) $r^2=0.92, p<0.05$	DN = 402062.516 + (215799.581 * CARB) $r^2=0.95$	DN = 295288.294 + (6903.656 * ChL) $r^2=0.75$
LEA-06	DN = 101224.900 + (6512388.436 * DO) $r^2=0.92, p<0.05$	DN = 311565.458 + (53744.632 * CARB) $r^2=0.97$	DN = -58768.968 + (1074.583 * ChL) $r^2=0.86$
MIRF-01	DN = -84226.474 + (18251122.091 * DO) $r^2=0.9, p<0.05$	DN = 219292.191 + (117615.056 * CARB) $r^2=0.96$	DN = 62849.380 + (3418.748 * ChL) $r^2=0.94$

## Referências

- AZEVEDO, S. M. F. CHERNOFF, N., FALCONER, I. R., GAGE, M. HILBORN, E.D, HOOTH, M. J., JENSEN, K., MACPHAIL, R., ROGERS, E., SHAW, G. R., STEWART, I. 2008. Human health effects workgroup report. **Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs**, 619:579-606.
- CARMICHAEL, W. W., AZEVEDO, S. M. F. O., NA, J. S., MOLICA, R. J. R., JOCHIMSEN, E. M., LAU, S., RINEHART, K. L., SHAW, G. R. & EAGLESHAM, G.K. 2001. Human fatalities from cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins. **Environmental Health Perspectives**, 109(7):663-668.
- CHORUS, INGRID & BARTRAM, JAMIE. 1999. Toxic Cyanobacteria in Water – A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management. E & FN Spon: London and New York.
- LÜRLING, M.; BEEKMAN, W. 1999. Grazer-induced defenses in *Scenedesmus* (Chlorococcales; Chlorophyceae): coenobium and spine formation. **Phycologia**, 38(5):368-376.
- PAERL, H. W.; HUISMAN, J. 2009. Climate change: a catalyst for global expansion of harmful cyanobacterial blooms. **Environmental Microbiology Reports**, 1(1):27-37.
- VALER, R. M., GLOCK, L. 1998. Quantificação de algas clorofíceas de interesse ecotoxicológico através do método espectrofotométrico. **Acta Limnológica Brasilienses**, 11:(210).