



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – BACHAREL

MÔNICA ANSILAGO

CINÉTICA DE CRESCIMENTO DA MICROALGA *Pseudokirchneriella subcaptata* (KORSHIKOV) HINDAK (CHLOROPHYCEAE) EM MEIO ALTERNATIVO NPK SOB CONTAMINAÇÃO DE METAIS PESADOS

DOURADOS

2013



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – BACHAREL

CINÉTICA DE CRESCIMENTO DA MICROALGA *Pseudokirchneriella*
subcaptata (KORSHIKOV) HINDAK (CHLOROPHYCEAE) EM MEIO
ALTERNATIVO NPK SOB CONTAMINAÇÃO DE METAIS PESADOS

Autor(a): Mônica Ansilago

Orientador: Prof. Dr. Emerson Machado de Carvalho

Co-Orientador: Prof. Dr. Ivan Ramires

“Trabalho de conclusão de curso apresentado, como parte das exigências para obtenção do título de BACHAREL EM BIOTECNOLOGIA, no Programa de graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados.”

Dourados

2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFGD

589.3 Ansilago, Mônica.
A619c Cinética de crescimento da microalga *Pseudokirchneriella subcaptata* (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) em meio alternativo NPK sob contaminação de metais pesados / Mônica Ansilago – Dourados-MS : UFGD, 2013.
44 f.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Machado de Carvalho.
Monografia (Graduação em Biotecnologia)
Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Microalgas – Cultivo. 2. Densidade algal. I. Título.

CINÉTICA DE CRESCIMENTO DA MICROALGA *Pseudokirchneriella subcaptata* (KORSHIKOV) HINDAK (CHLOROPHYCEAE) EM MEIO ALTERNATIVO NPK SOB CONTAMINAÇÃO DE METAIS PESADOS

Trabalho de conclusão de curso aprovado pela Banca Examinadora do Curso de Biotecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD

Dourados, 09 de Abril de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Emerson Machado de Carvalho – (UFGD) – Orientador

Prof. Dr. Ivan Ramires - (UFGD)

Profa. Dra. Márcia Regina Russo - (UFGD)

A pedra

*“ O distraído, nela tropeçou,
o bruto a usou como projétil,
o empreendedor, usando-a construiu,
o campônio, cansado da lida,
dela fez assento.
Para os meninos foi brinquedo,
Drummond a poetizou,
Davi matou Golias...
Por fim;
o artista concebeu a mais bela escultura.
Em todos os casos,
a diferença não era a pedra.
Mas o homem.”*

(Antônio Pereira)

A

minha mãe Rosineide da Conceição Ansilago e meu Pai Ladi Caetano Ansilago, ao qual me amam incondicionalmente e transmitiram-me os mais preciosos valores e ensinamentos ao qual carregarei eternamente.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, por nos conceder cada pequeno milagre todo dia, e por estar presente em cada momento de angústia, nunca deixando aquele que crê só.

À Universidade Federal da Grande Dourados, pela oportunidade de um sonho.

À Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, em especial ao Centro de Pesquisa em Biodiversidade, pela concessão do espaço e materiais necessários a realização desta pesquisa.

À Dra. Odete Rocha do Laboratório de Limnologia do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (UFSCar) por ter gentilmente cedido a cepa de *P. subcapitata* para os ensaios.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Emerson Machado de Carvalho, pela orientação e pelas horas de trabalho e companhia.

Ao Prof. Dr. Ivan Ramires, pela co-orientação, pelo suporte e pelo companheirismo oferecido.

A todos os professores que nos ministraram aula, por todos os ensinamentos transmitidos.

À minha irmã Michelle Ansilago, por fazer parte da minha vida.

A todos meus familiares, inclusive minha avó Rosa Buchvitz da Conceição e meu avô Rafael Fernandes da Conceição (*in memoriam*), pelas horas de alegria e carinho.

À minha prima Marina Ansilago, pelas horas de conversas infinitas, companheirismo e amizade.

À Franciéli Ottonelli pela grande amizade, companheirismo, pela ajuda e risadas infinitas dentro e fora do laboratório.

Aos meus amigos da Faculdade que amo que sempre estiveram presentes: Nicholas Vinicius Silva, Danielly Beraldo, Suellen Ramalho, Jéssica Casagrande, Pierre Demenjour, Edinaldo Ferreira, Igor Chiarelli, Elton Felipe, Suélen Cristina, Rodrigo Raghiant Borges, Allan Rodrigues, Bruna Paulino Conti, Lara Endres, Luiz Augusto Cauz, Carla Roberta Volobuff, Maykon Avalo Berndt, Dágon Ribeiro, Gabriéla Finotto Cavalheiro.

As minhas duas grandes amigas Suélen Mattoso Bica e Rosimeire Ramires Vaz, pela amizade verdadeira.

A técnica de laboratório Fabiana Gomes da Silva, pela ajuda oferecida.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que esse sonho tão almejado fosse realizado com muito prazer e alegria.

SUMÁRIO

Lista de Ilustrações.....	06
Lista de Tabelas.....	07
Lista de Abreviaturas.....	08
Introdução Geral.....	09
Referências.....	12
Capítulo I - Cinética de crescimento da microalga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) em água natural enriquecida com o fertilizante NPK.	
Resumo.....	15
Abstract.....	16
Introdução.....	17
Material e Métodos.....	19
Resultados e discussões.....	21
Conclusão.....	26
Referências.....	27
Capítulo II. Efeito da contaminação do meio de cultivo por metais pesados na produção da microalga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) em escala de bancada	
Resumo.....	30
Abstract.....	31
Introdução.....	32
Material e Métodos.....	34
Resultados e discussões.....	36
Conclusões.....	41
Referências.....	42

LISTA DE ILUTRAÇÕES

Capítulo I - Cinética de crescimento da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) em água natural enriquecida com o fertilizante NPK.

- Figura 1.** Densidade (média \pm erro padrão) da microalga *P. subcapitata* e potencial hidrogeniônico (pH) do meio dos tratamentos T1- com água destilada autoclavada, T2 - com água natural autoclavada e T3 - com água natural sem autoclavar.....22
- Figura 2.** Análise da regressão linear (r^2) e teste Spearman de correlação (R) entre a densidade de *P. subcapitata* e o potencial hidrogeniônico nos tratamentos T1 (a), T2 (b) e T3 (c).....23
- Figura 3.** Análise da regressão (r^2) e crescimento exponencial (k) de *P. subcapitata* nos tratamentos T1 (a), T2 (b) e T3 (c).....24
- Figura 4.** Taxa de crescimento diário (média \pm erro padrão) da microalga *P. subcapitata* com os tratamentos T1 (a), T2 (b) e T3 (c). As letras acima das colunas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey.....24

Capítulo II. Efeito da contaminação do meio de cultivo por metais pesados na produção da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) em escala de bancada

- Figura 1.** Densidade algácea de *P. subcapitata* (média \pm erro padrão) e potencial hidrogeniônico (média) mensurados nos tratamentos a) T1: controle - sem contaminantes; b) T2: tratamento contaminado com AlCl_3 ; c) T3: tratamento contaminado com FeSO_4 ; d) T4: tratamento contaminado com ZnSO_4 ; e) T5: tratamento contaminado com $\text{AlCl}_3 + \text{FeSO}_4 + \text{ZnSO}_4$37
- Figura 2.** Taxa de crescimento diário (média \pm erro padrão) da microalga *P. subcapitata* nos tratamentos a) T1: controle - sem contaminantes; b) T2: tratamento contaminado com AlCl_3 ; c) T3: tratamento contaminado com FeSO_4 ; d) T4: tratamento contaminado com ZnSO_4 ; e) T5: tratamento contaminado com $\text{AlCl}_3 + \text{FeSO}_4 + \text{ZnSO}_4$38
- Figura 3.** Análise da regressão (r^2) e crescimento exponencial (k) de *P. subcapitata* nos tratamentos a) T1: controle sem contaminantes; b) T2: tratamento contaminado com AlCl_3 ; c) T3: tratamento contaminado com FeSO_4 ; d) T4: tratamento contaminado com ZnSO_4 ; e) T5: tratamento contaminado com $\text{AlCl}_3 + \text{FeSO}_4 + \text{ZnSO}_4$39

LISTA DE TABELAS

Capítulo I - Cinética de crescimento da microalga *Pseudokirchneriella subcaptata* (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) em água natural enriquecida com o fertilizante NPK.

Tabela 1. Descrição dos componentes e características intrínsecas de cada tratamento.....19

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AlCl_3 : Cloreto de Alumínio.

ANCOVA: Análise de Covariância.

ANOVA: Análise de Variância.

BOD: Biochemical Oxygen Demand.

CHU_{12} : Meio Sintético Comercial Padrão.

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente.

FeSO_4 : Sulfato Ferroso.

LUX: Unidade de Iluminamento.

NPK: Fertilizante Químico (Nitrogênio, Fósforo e Potássio).

NTU: Unidades Nefelométricas de Turbidez.

pH: Potencial Hidrogeniônico.

P. subcapitata: *Pseudokirchneriella subcapitata*.

ZnSO_4 : Sulfato de Zinco.

INTRODUÇÃO GERAL

O grande potencial biotecnológico que as microalgas vêm apresentando tem aumentado a busca por estudos relacionados à mesma, devido a sua grande diversidade e produtos sintetizados. Também podemos citar sua importância nas diversas cadeias tróficas, além da sua aplicação nas indústrias alimentícias, farmacêuticas, de cosméticos e em tratamentos de efluentes (DERNER *et al*, 2006).

As microalgas são organismos unicelulares, com pouca diferenciação celular, microscópicas geralmente, fotossintetizantes, devido a presença de um pigmento (clorofila) e possuem uma ampla diversidade (OHSE *et al*, 2008). São mais eficientes na conversão de energia solar que as plantas superiores por possuir uma maior simplicidade celular. Entre suas aplicações ambientais, podemos citar fixação de dióxido de carbono, biofixação de metais pesados e remoção de matéria orgânica de efluentes, além da produção, a partir de sua biomassa, de biocombustíveis, e de moléculas surfactantes (SCHMITZ *et al*, 2012).

Quanto a sua aplicação na produção de biocombustíveis, elas vem se mostrando muito eficientes, já que duplicam sua biomassa diversas vezes ao decorrer do dia e também chegam a produzir 15 vezes mais por hectare do que outras culturas. As microalgas vem sendo aplicadas principalmente para a produção de biodiesel, através da extração do óleo vegetal, mas também podem ser utilizadas na produção de outros biocombustíveis, como por exemplo, o bioetanol, através da conversão do amido e da celulose; hidrogênio, sendo produzido em reatores simples, sendo esta sua maior vantagem; e produção de metano através da digestão anaeróbica (ANTUNES; SILVA, 2010).

Quanto ao seu uso farmacêutico, podemos destacar a microalga do gênero *Dunaliella* que é rica em β -caroteno. Os carotenoides têm uma elevada importância no combate de algumas doenças, onde os radicais livres tem suma importância, como podemos citar a esclerose múltipla, arteriosclerose, catarata, entre outras. (VALDUGA *et al*, 2009). Segundo Valduga *et al* (2009), os carotenóides produzidos pelas microalgas, como o licopeno, é amplamente utilizado como corante na indústria alimentícia, já que durante o processamento de muitos alimentos, estes perdem sua coloração, e assim há a adição de corantes naturais, dispensando a utilização de corantes sintéticos, enriquecendo assim os alimentos, além de beneficiar a saúde, fortalecendo o sistema imunológico e prevenindo de doenças degenerativas.

Derner *et al.* (2006) cita também a utilização de microalgas para consumo humano, como por exemplo, produtos feitos com a biomassa da microalga *Spirulina* spp. que servem de alimento para povos nativos, o Chade, África, até os dias atuais, por conter altas quantidades de nutrientes. Tanto a *Spirulina* spp. como a *Chlorella* spp. são comercializadas em drogarias e lojas de produtos naturais para suplementação humana.

Como as microalgas são organismos fundamentais nos ecossistemas, elas são excelentes bioindicadoras, até mesmo por sua grande abundância nos ambientes aquáticos. Mororó e Freitas (2009) utilizaram microalgas da classe Ulvophyceae como bioindicadoras da poluição ambiental nas águas do litoral Pernambucano. Assim poderia citar várias microalgas e suas aplicações, porém torna-se relevante chamar a atenção para a *Pseudokirchneriella subcapitata*, que vem sendo amplamente utilizada, por vários motivos. Entre eles destaca-se o fator de ser uma microalga de água doce, com grande tolerância às condições de salinidade; possui uma rápida produção de biomassa e não se agrupa, o que facilita na hora da contagem na câmara de Neubauer (ARANTES, 2010); possui reprodução assexuada, e seus fatores limitantes são, entre outros, luminosidade e aeração.

Estas microalgas apresentam alta produção de biomassa em apenas poucos dias, em meios de cultivo eficientes e de baixo custo, necessitando de poucos nutrientes para o seu desenvolvimento. Mesmo com essas características, elas apresentam um grupo ainda pouco estudado, apresentando assim muitas oportunidades de descobertas (BERTOLDI *et al.*, 2008). A *P. subcapitata* vem sendo muito utilizada em teste ecotoxicológicos, por apresentar alta sensibilidade a contaminantes. Rodrigues (2002) buscou realizar ensaios ecotoxicológicos para determinar a sensibilidade da microalga *P. subcapitata* por sulfato de cobre e sulfato de zinco, avaliando assim a sua sensibilidade frente impactos ambientais em ecossistemas aquáticos. Já Ivanova e Groudeva (2006) realizaram ensaios para determinar a toxicidade de metais pesados em suspensão na microalga. Em ambos os trabalhos a microalga se mostrou eficiente, e pode ser considerada mais sensível para a realização deste testes do que outros organismos aquáticos.

A microalga *P. subcapitata* também é amplamente utilizada como base da alimentação de microcrustáceos da Família Daphniidae, pois é um alimento base e padronizado, que juntamente com outro complemento alimentar determinará a qualidade de testes ecotoxicológicos realizados pelos microcrustáceos (BURATINI; ARAGÃO, 2012).

Como as microalgas podem ser produzidas em meio de cultivo eficientes e de baixo custo, podemos associar este fator no tratamento de efluentes contaminados, na qual elas se mostram eficazes para remediar os contaminantes ali presentes (MOREIRA-SANTOS *et al.*, 2004) e posteriormente utilizar a sua biomassa para a produção de vários produtos, como os biocombustíveis.

O meio de cultivo utilizado para o crescimento da microalga é de suma importância, pois os nutrientes presentes ali que irão garantir o desenvolvimento algal. Quando se trata de meio de cultivo, geralmente utiliza-se o CHU₁₂, que é um meio sintético comercial, porém de elevado custo. Uma nova fonte de nutrientes vem sendo utilizada, o adubo químico N:P:K, que pode ser adquirido facilmente, além de seu custo ser reduzido. Estudos comparativos realizados com esses dois meios demonstraram que o meio NPK associado com extrato de macrófitas teve resultados de desenvolvimento algal semelhantes aos observados com uso de CHU₁₂ (SIPAUBA-TAVARES *et al.*, 2009; 2011).

Os estudos da cinética de crescimento da microalga *P. subcapitata* se faz necessário para o estudo de sua biologia, o que auxiliará sua posterior aplicação em processos em escala industrial. Como a luminosidade e a aeração são fatores limitantes, sendo que o primeiro fator irá atuar no metabolismo algal, então se faz de suma importância o controle destes durante toda a experimentação, para que não haja um declínio de produção e na eficiência da microalga (SIPAUBA-TAVARES *et al.*, 2009).

Por fim, objetivou-se neste trabalho avaliar a cinética de crescimento da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* em meios de cultivo alternativo com base no fertilizante químico NPK, bem como avaliar sua produção em meios contaminados por metais pesados. Assim, para atingir os objetivos propostos a pesquisa foi dividida em dois ensaios que serão apresentados na forma de dois artigos: 1) Cinética de crescimento da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) em água natural enriquecida com o fertilizante NPK; 2) Efeito da contaminação do meio de cultivo por metais pesados na produção da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) em escala de bancada.

REFERÊNCIAS

ANTUNES, R.; SILVA, I.C. Utilização de algas para a produção de biocombustíveis. **Instituto nacional da propriedade industrial**, 2010. Disponível em:

<http://www.marcaspatentes.pt/files/collections/pt_PT/1/300/302/Utiliza%C3%A7%C3%A3o%20de%20algas%20para%20a%20produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20biocombust%C3%ADveis.pdf>. Acesso em: 16 jan. 2013.

ARANTES, P. B. **Influência do herbicida glifosato (n-(fosfometil)glicina) na formação de biomassa da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (chlorophyceae)**. 2010. 92 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ecologia)- Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2010.

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Revisão: biotecnologia de microalgas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 26, n. 1, p. 9-20, jan./jun. 2008.

BURATINI, S.V.; ARAGÃO, M.A. Alimento complementar adicionado às culturas de *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*: efeitos da levedura e da digestão da ração. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, Itajaí, v.7, n. 1, p. 21-26, mai. 2012.

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M. de; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.6, p.1959-1967, nov-dez. 2006.

IVANOVA, I.; GROUDEVA, V. Use of *Selenastrum capricornutum* growth inhibition test for testing toxicity of metal ions in soil and water. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, Bulgaria, v. 20, n. 1, p. 1-5, jan. 2006.

MOREIRA-SANTOS, M.; SOARES, A. M. V. M.; RIBEIRO, R. An in situ bioassay for freshwater environments with the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 59, p. 164-173, 2004.

MORORÓ, C. A. de L.; FREITAS, R. A. de. **As algas como bioindicadoras de poluição ambiental nas águas do litoral pernambucano.** In: IV Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica: Belém, 2009.

OHSE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. Á.; BRAGA; M. V. da C.; CUNHA, P.; LAMARCA, C. P.; SANTOS, M. E. Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. **Revista Biotemas**, Ponta Grossa, v. 21 n. 2, jun. 2008.

RODRIGUES, L. H. R. **Avaliação da sensibilidade de *Raphidocelis subcapitata* (Chlorococcales, Chlorophyta) ao sulfato de cobre e sulfato de zinco através de testes de toxicidade crônica e determinação da densidade algal por espectrofotometria.** 2002. 96f. Dissertação (Mestrado em ecologia)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

SCHMITZ, R.; MAGRO, C. D.; COLLA, L. M. Aplicações ambientais de microalgas. **Revista de Ciências Exatas Aplicadas e Tecnológicas da Universidade de Passo Fundo**, Passo Fundo, v.4, n. 1, p. 48-60, 2012.

SIPAUBA-TAVARES, L. H.; IBARRA, L. C. C.; FIORESI, T. B. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) em laboratório utilizando meio Chu₁₂ e de macrófita com NPK. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 1, p. 111-118, 2009.

SIPAUBA-TAVARES, L. H.; MILLAN, R. N.; BERCHIELLI, F. A.; Braga, F. M. S. B. Use of alternative media and different types of recipients in a laboratory culture of *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korshikov (Chlorophyceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 33, n. 3, p. 247-253, 2011.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; LUCCIO, M. Di. Produção de carotenóides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Revista Química Nova**, São Paulo, vol. 32, n. 9, p. 2429-2436, out. 2009.

CAPÍTULO I

**Cinética de crescimento da microalga *Pseudokirchneriella subcaptata*
(Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) em água natural enriquecida com o
fertilizante NPK¹**

¹ Trabalho publicado na Biochemistry and Biotechnology Reports (ISSN: 2316-5200)

**Cinética de crescimento da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov)
Hindak (Chlorophyceae) em água natural enriquecida com o fertilizante NPK**

RESUMO

As microalgas podem apresentar múltiplas funcionalidades em estudos biotecnológicos, porém torna-se necessário o incentivo a pesquisas no sentido de bioprospectar e conhecer as características intrínsecas destes micro-organismos. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a cinética de crescimento de *Pseudokirchneriella subcapitata* em meio de cultivo alternativo preparado com água natural enriquecida com adubo químico NPK (20-5-20). Para preparação dos ensaios foram delineados três tratamentos: (T1) adicionado 200 mL de água destilada autoclavada; (T2) adicionado 200 mL de água natural autoclavada; (T3) adicionado 200 mL de água natural sem autoclavar. Todos os tratamentos foram realizados em triplicatas e adicionados 200 mL da solução NPK e 100 mL da cultura de *P. subcapitata*. Com isso, esperava-se observar diferença no crescimento populacional da microalga em função da competição com as espécies autóctones presentes no tratamento T3. Porém, este fator não foi observado e os tratamentos não apresentaram diferença significativa na densidade algal (ANCOVA $F_{2,50} = 1,43$; $p = 0,25$), apresentando elevada produtividade, tolerância às oscilações de pH do meio e crescimento em meio alternativo de baixo custo (NPK). Assim foi possível inferir que a microalga apresenta grande potencial para ensaios biotecnológicos, tanto em escala de bancada como em escala industrial.

Palavras-chave: bioensaios, densidade algal, processos biotecnológicos, taxa de crescimento exponencial.

**Growth kinetics of the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov)
Hindak (Chlorophyceae) in natural water enriched with NPK fertilizer**

ABSTRACT

Microalgae can have multiple functions in biotechnological studies, but it is necessary to encourage research to bioprospect and know the intrinsic characteristics of these microorganisms. Thus, the aim of this study was to evaluate the growth kinetics of *Pseudokirchneriella subcapitata* in an alternative culture medium prepared with natural water that was enriched with the chemical fertilizer NPK (20-5-20). Three treatments were designed to evaluate growth kinetics: (T1) 200 mL of autoclaved distilled water, (T2) 200 mL of autoclaved natural water, and (T3) 200 mL of natural water that was not autoclaved. All of the treatments were performed in triplicate and 200 mL of NPK and 100 mL of *P. subcapitata* culture were added. With this design, we expected to observe differences in the population growth of the microalga that were a function of the competition with the native species present in the test treatments. However, this was not observed, and the treatments did not result in significant differences in algal density (analysis of covariance [ANCOVA] $F_{2,50} = 1.43$, $p = 0.25$). Instead, all cultures displayed high productivity, tolerance to fluctuations in the pH of the medium, and growth in an alternative low-cost medium (NPK). Thus, it was possible to conclude that microalgae have great potential for biotechnological studies, both in bench and industrial scales.

Keywords: bioassays, algal density, biotechnological processes, exponential growth rate

INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos unicelulares capazes de realizar fotossíntese, de forma mais rápida e eficiente que as plantas terrestres. Neste sentido, o estudo do cultivo de microalgas é importante para incrementar o conhecimento da biologia das diferentes espécies, favorecendo posterior produção em ambientes controlados, onde os meios de cultura oferecem nutrientes necessários para o crescimento ótimo de cada espécie (SIPAUBA-TAVARES *et al.*, 2009).

Entre as diferentes aplicações e incentivo à produção de microalgas no Brasil, a alimentação de organismos planctônicos e larvas de peixes são as mais conhecidas (HARDY; CASTRO, 2000; SIPAUBA-TAVARES *et al.*, 2009). Estes micro-organismos também podem apresentar múltiplas funcionalidades em estudos biotecnológicos, como biorremediação de metais e outros poluentes, ensaios toxicológicos (MOREIRA-SANTOS *et al.*, 2004), bioconservação da energia solar (estocagem da energia), ingrediente para ração, fermentação (produção de metano), extração de diversos produtos, como alginas e pigmentos (SIPAUBA-TAVARES; ROCHA, 2003) produção de biodiesel, suplementação alimentar, entre outros.

No entanto, torna-se necessário o incentivo a pesquisas no sentido de bioprospectar e conhecer as características intrínsecas e funcionais destas espécies. Dentre as microalgas de água doce cultivadas, as unicelulares da classe Chlorophyceae têm sido amplamente utilizada (SIPAUBA-TAVARES *et al.*, 2009). Das diversas espécies unicelulares de algas existentes, a clorofícea *Pseudokirchneriella subcapitata* tem sido amplamente empregada, tanto para alimentação de microcrustáceos como para execução de testes de toxicidade (DOMINGUES; BERTOLETTI, 2008). Esta microalga é capaz de tolerar condições extremas de salinidade e meios pobres em nutrientes; é uma espécie facilmente encontrada (a partir de coleções de culturas) e mantida em laboratório sob condições de cultura reprodutíveis (MOREIRA-SANTOS *et al.*, 2004).

Estudos sugerindo a temperatura, nutrientes, avaliação da iluminação e controle da cultura são fatores determinantes para a produtividade da microalga (SIPAUBA-TAVARES; PEREIRA, 2008). Desta forma, o uso de medidas alternativas, tal como NPK para o desenvolvimento e aumento da biomassa algal vem sendo aplicado para uma importante adesão para a produção de microalgas em larga escala (HARDY; CASTRO, 2000; SIPAUBA-TAVARES; PEREIRA, 2008; SIPAUBA-TAVARES *et al.*, 2009, 2011). De acordo com Sipaúba-Tavares e Rocha (2003) o

fertilizante NPK é um método alternativo de menor custo e mais eficiente do que o meio sintético padrão CHU₁₂.

No entanto, muitos aspectos em relação à cinética de crescimento desta microalga precisam ser estudados, tanto para produção em larga escala, como para estudos de bancada. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a cinética de crescimento de *P. subcapitata* em meio de cultivo alternativo preparado com água natural enriquecida com adubo químico NPK (20-5-20).

MATERIAL E MÉTODOS

Uma cepa de *P. subcapitata* foi cedida do Laboratório de Limnologia do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (UFSCar). A microalga foi posteriormente cultivada em meio sintético CHU₁₂ no laboratório do Centro de Pesquisa em Biodiversidade (CPBio), Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS). Esta foi submetida ao cultivo em meio sintético CHU₁₂, em sistema de cultivo estático não axênico, com aeração constante, temperatura ambiente e fotoperíodo (12 h luz / 12 h escuro).

Para a preparação dos ensaios foi utilizado um meio sintético estoque preparado com a adição de 0.70 g de adubo químico N:P:K (20-5-20 g/L) em 1.000 mL de água destilada, onde a solução foi autoclavada a 121°C durante 20 minutos (SIPAUBA-TAVARES; ROCHA, 2003). Todos os tratamentos foram realizados em triplicatas e mantidos em Erlenmeyer de 500 mL e todas as características intrínsecas de cada tratamento estão descritas na tabela 1. Os ensaios foram mantidos em incubadora BOD com controle de fotoperíodo de 2.500 lux provido por lâmpadas fluorescentes brancas (12 h luz / 12 h escuro), temperatura ($22 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) e aeração constante.

Tabela 1. Descrição dos componentes e características intrínsecas de cada tratamento

Tratamentos	Meio NPK (200 mL)	Cultura de <i>P.</i> <i>subcapitata</i> (100 mL)	Meios adicionais (200 mL)
T1	Presente	Presente	Água autoclavada destilada
T2	Presente	Presente	Água do Rio Dourado autoclavada (água natural estéril)
T3	Presente	Presente	Água do Rio Dourado sem autoclavar (água natural)

A água do rio Dourado foi coletada no dia anterior ao início dos ensaios com garrafas do tipo Van Dorn, na ponte que dá acesso a cidade de Fátima do Sul (MS), e apresentou os seguintes

parâmetros físico-químicos: pH 7.32; turbidez: 19.3 NTU; condutividade 39.51 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$; sólidos totais 0.24 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; alcalinidade 23.66 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; matéria orgânica 18.83 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$; sólidos totais dissolvidos 20.97 ppm. As amostras de água foram transportadas diretamente ao laboratório e mantidas sob refrigeração.

A cada três dias foi mensurada a densidade algal com o auxílio de um hemocitômetro (câmara de Neubauer) e medido o pH do meio com pHmetro de bancada durante 15 dias. Cada tratamento foi realizado em triplicatas e de cada uma desta foram retiradas a média de cinco amostras. No hemocitômetro também foram retiradas as médias de cinco quadrantes por amostra. Para avaliar a diferença nas curvas de crescimento algal foi utilizada uma análise de covariância (ANCOVA) (ZAR, 1999) e aplicado uma análise de regressão (r^2) para obtenção da taxa de crescimento exponencial (k). Para verificar a correlação entre a densidade algal e o pH do meio foi utilizada uma análise de regressão linear (r^2) e o teste de correlação de Spearman. As taxas de crescimento diário foram obtidas pela diferença entre os valores da densidade algal do último e do primeiro dia de ensaio, dividido pelo tempo decorrido em dias (15 dias). Os valores da taxa de crescimento diário foram transformados em Arcsen (Zar, 1999) apenas para testar possível diferença entre os dias de amostragem pela análise e variância simples (One-Way ANOVA). O programa utilizado para análise dos dados foi o Statistica 7.0 (Statsoft Inc, Tulsa, OK, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A microalga *P. subcapitata* apresentou um crescimento de aproximadamente 7 vezes da sua densidade inicial em apenas 15 dias de experimento. Este percentual representa uma densidade inicial de $18,1 \pm 0,9$ e final de $119,4 \pm 22,2 \times 10^5$ células. mL⁻¹ (média \pm desvio padrão). Porém, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos pela análise de covariância (ANCOVA $F_{2,50} = 1,43$; $p = 0,25$). Isso indica que, apesar da utilização de águas nos meios de cultivo com características intrínsecas, estas não foram suficientes para interferir no crescimento populacional da microalga por tratamento. Assim, é importante observar que nos tratamentos T2 e T3 pretendeu investigar se a água natural poderia interferir no crescimento da alga quando comparado ao T1 que utilizou água destilada.

A água natural é mais comum em produções de grande escala, enquanto que a água destilada é mais empregada em ensaios toxicológicos (SIPAUBA-TAVARES; ROCHA, 2003, DOMINGUES; BERTOLETTI, 2008). Da mesma forma, o fertilizante NPK, que foi utilizado em todos os tratamentos, tem sido empregado como meio alternativo para produção de microalgas em função do seu baixo custo (DOMINGUES; BERTOLETTI, 2008, HARDY; CASTRO, 2008, SIPAUBA-TAVARES; ROCHA, 2003, SIPAUBA-TAVARES; PEREIRA, 2008, SIPAUBA-TAVARES *et al.*, 2009; 2011). No entanto, a densidade média algal do presente ensaio esteve abaixo dos valores de 333×10^5 células. mL⁻¹ (SIPAUBA-TAVARES *et al.*, 2009) e acima dos valores de 144×10^4 e $74,16 \times 10^5$ células. mL⁻¹ (SIPAUBA-TAVARES; PEREIRA, 2008, SIPAUBA-TAVARES *et al.*, 2011, respectivamente) observados para a clorofícea *Ankistrodesmus gracilis* cultivas em meio NPK. No entanto, estes experimentos supracitados contaram também com um preparado adicional de macrófita para complementar o fertilizante NPK, o qual não ocorreu no presente experimento.

Apesar dos tratamentos T2 e T3 apresentarem água natural, somente o segundo não foi esterilizado, o que possivelmente sugere uma competição dos micro-organismos autóctones pelos recursos. Dentre os possíveis micro-organismos presentes na água natural, somente as cianofíceas *Microcystis* e *Anabaena* puderam ser visualizadas pelo microscópio e em quantidade pouco representativa. No entanto, nenhuma destas hipóteses foi confirmada, uma vez que os tratamentos não apresentaram diferença significativa no crescimento de *P. subcapitata*. Apesar disso, os

dados que serão discutidos adiante sugerem um melhor desenvolvimento das microalgas no tratamento com água natural não estéril (T3).

Numa análise temporal mais detalhada da densidade algal foi verificado um crescimento constante (fase exponencial) do 1º ao 6º dia e do 9º ao 15º dias de experimentação; somente entre os 6º e 9º dias foi observada uma fase de indução (fase *lag*), onde registrou um pequeno decréscimo na densidade algal para os tratamentos com água destilada (T1) e água natural (T2) esterilizadas (Figura 1). Neste mesmo período também foi observada uma estabilização do pH em $5,71 \pm 0,33$ (média \pm desvio padrão), sendo que o mesmo iniciou em $7,23 \pm 0,48$ e apresentou no ultimo dia valores de $5,63 \pm 0,44$ (Figura 1).

A análise de regressão linear também demonstrou existir uma significativa correlação negativa entre os valores do pH do meio e da densidade algal (Figura 2), ou seja, um aumento na densidade algal associado à queda do pH do meio. Contrariamente, Sipaubá-Tavares *et al.* (2011) observaram um decréscimo no crescimento da clorófitica *A. gracilis* em pH ácido, o qual associaram à capacidade das microalgas em metabolizar o carbono inorgânico. Apesar de certas clorófiticas não conseguirem crescer em pH ácido (SIPAUBA-TAVARES *et al.*, 2011), *P. subcapitata* apresentou elevado crescimento, desempenhando até mesmo a ação tampão no controle da variação do pH.

Figura 1. Densidade (média \pm erro padrão) da microalga *P. subcapitata* e potencial hidrogeniônico (pH) do meio dos tratamentos T1- com água destilada autoclavada, T2 - com água natural autoclavada e T3 - com água natural sem autoclavar.

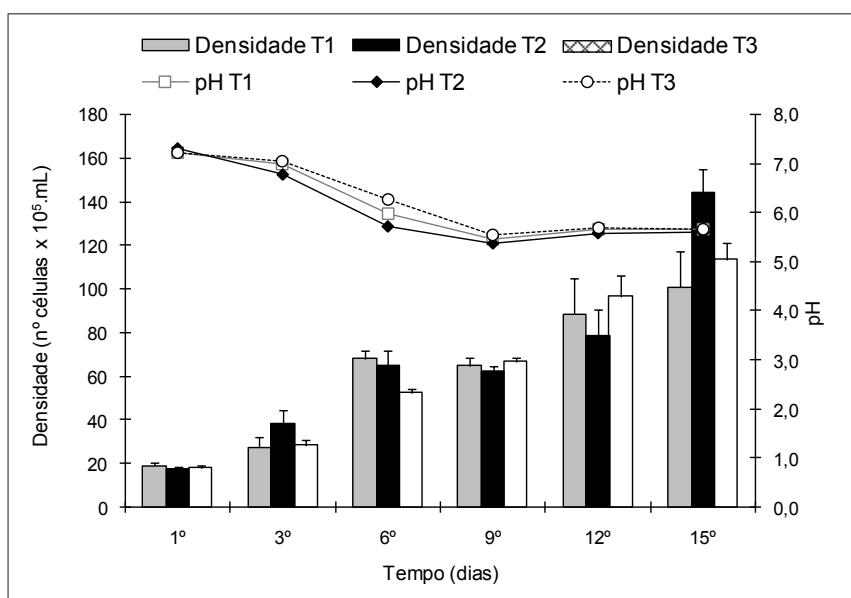
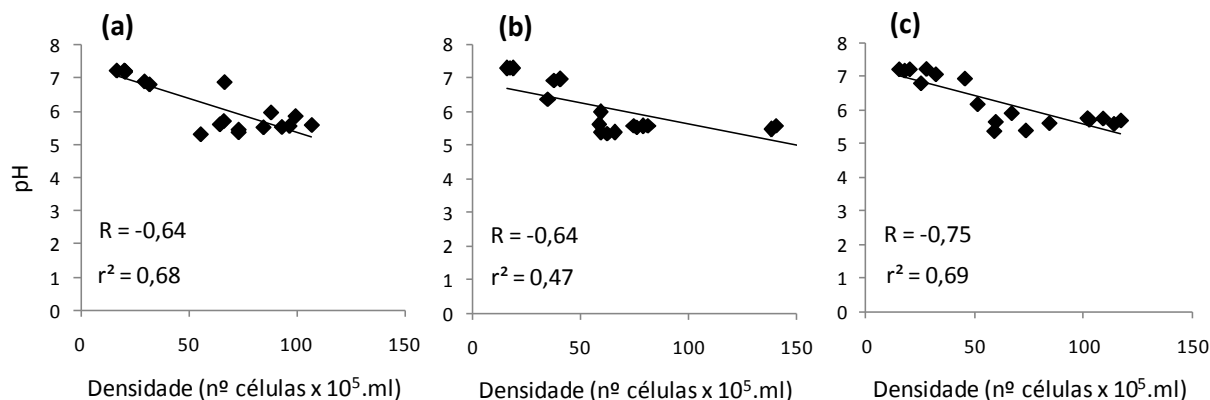


Figura 2. Análise da regressão linear (r^2) e teste Spearman de correlação (R) entre a densidade de *P. subcapitata* e o potencial hidrogeniônico nos tratamentos T1 (a), T2 (b) e T3 (c).



Corroborando o ocorrido para densidade algal, na análise de regressão foi verificado que o tratamento T3 apresentou o melhor crescimento exponencial ($k = 0,13$ e $r^2 = 0,93$), seguido do T2 ($k = 0,12$ e $r^2 = 0,86$) e T1 ($k = 0,12$ e $r^2 = 0,86$) (Figura 3), confirmando que os microorganismos presentes na água natural não inibiram o desenvolvimento algal, porém o fato do T2 ter tido sua água natural autoclavada, os nutrientes ali presentes podem ter sofrido modificações, reduzindo seu potencial nutritivo, desfavorecendo este tratamento. No entanto, as taxas de crescimento exponencial apresentadas estiveram próximas dos menores valores observados para a clorofíceia *Ankistrodesmus gracilis*, com taxas que variaram entre $k = 0,14$ e $0,56$, dependendo de meio e recipiente utilizado para o cultivo, sendo este o meio CHU_{12} e o meio NPK com extrato de macrofita, utilizando cuba de fibra de vidro translúcido, garrações e saco plástico, sendo que os três obtiveram resultados semelhantes em produtividade, porém os sacos plásticos são mais recomendados, por apresentarem menor custo e ocupam menos espaço no laboratório (SIPAUBA-TAVARES *et al.*, 2009; 2011). No entanto, nestes ensaios foi utilizado o fotoperíodo de 24 horas, enquanto que no presente trabalho utilizaram-se somente 12 horas. Segundo Sipauba-Tavarez *et al.* (2011), a fase de maior crescimento exponencial observada em seu ensaio esteve associada ao período de 24 horas de luz. Neste sentido, caso pretenda-se elevar as taxas de crescimento exponencial de *P. subcapitata* um dos possíveis fatores será aumentar o fotoperíodo.

Figura 3. Análise da regressão (r^2) e crescimento exponencial (k) de *P. subcapitata* nos tratamentos T1 (a), T2 (b) e T3 (c).

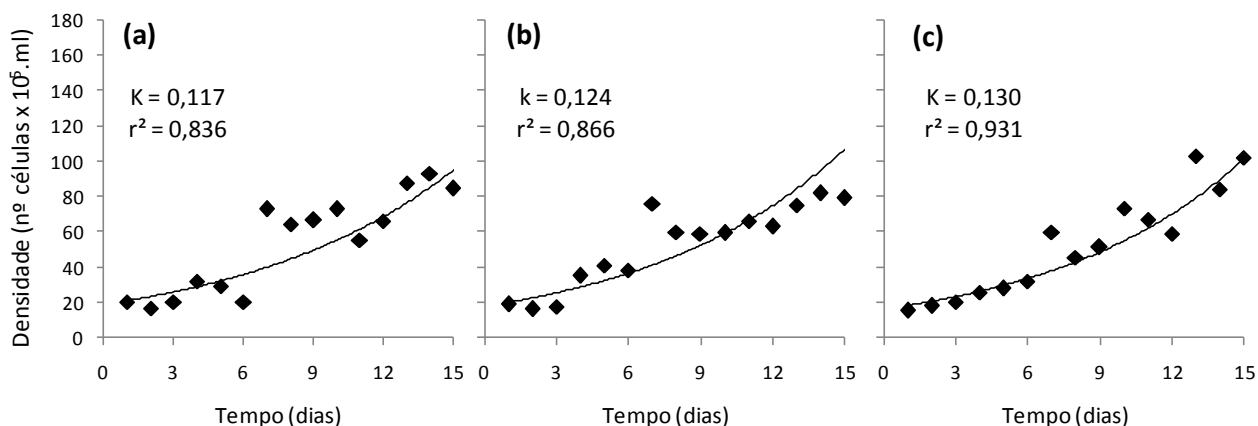
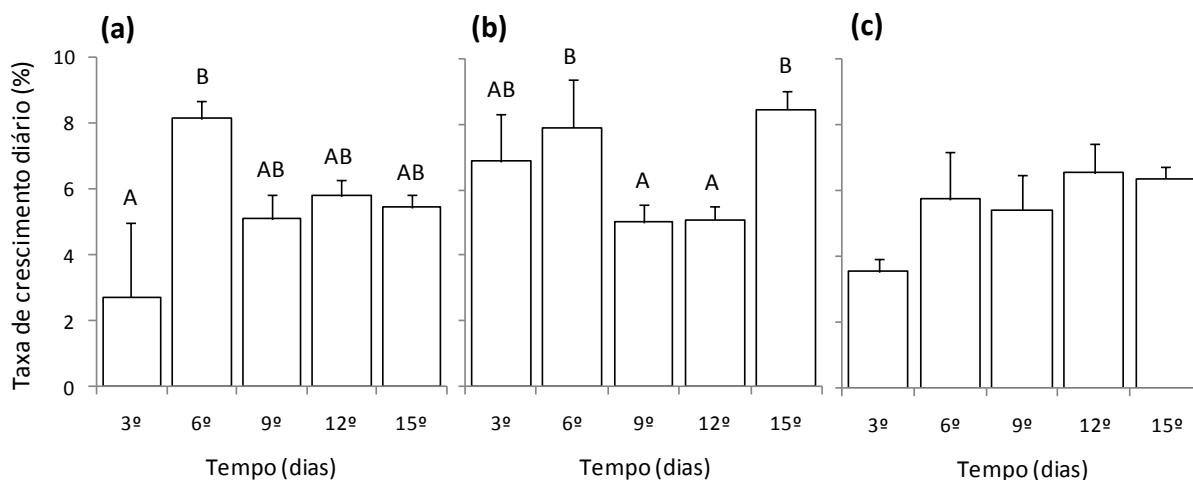


Figura 4. Taxa de crescimento diário (média \pm erro padrão) da microalga *P. subcapitata* com os tratamentos T1 (a), T2 (b) e T3 (c). As letras acima das colunas indicam diferença significativa pelo teste de Tukey.



Já foi anteriormente mencionado que o T3 foi o único a não apresentar uma fase de indução ou estacionário. Seu crescimento foi contínuo até o último dia de experimento. Até mesmo na taxa de crescimento diária o T3 apresentou um crescimento relativamente contínuo, não sendo atribuído nenhum pico ou decréscimo representativo (Figura 4). A análise de variância que comparou os dias de amostragem por tratamento corroborou tais resultados através da diferença significativa verificada somente para os T1 e T2 (ANOVA, $F_{4,10} = 4,00$ e $8,37$; $p =$

0,034 e 0,003, respectivamente). Os tratamentos T1 e T2 apresentaram, no entanto, pico de crescimento algal entre 3-6 dias, enquanto que este último também apresentou outro pico entre 12-15 dias (Figura 4). Hardy e Castro (2000) também observaram pico no crescimento da clorofíceia *Scenedesmus quadricauda* entre 5-7 dias, com tendência de melhor crescimento no meio NPK.

A microalga *P. subcapitata* apresentou elevada plasticidade aos tratamentos, apresentando uma produção representativa em águas naturais, onde pode ocorrer a competição com outros organismos. Esta plasticidade também foi verificada com relação à cinética do pH, onde foi possível observar um elevado crescimento algal em meio ácido. Além disso, os resultados indicam que o meio de cultivo com água natural enriquecida com fertilizante NPK pode ser usado diretamente como uma alternativa para substituição de outros meios de cultura com custos mais elevados. No entanto, novas pesquisas serão necessárias para estudar os aspectos fisiológicos envolvidos no crescimento da *P. subcapitata* e, conseqüentemente, sua composição bioquímica para entender suas múltiplas funcionalidades em estudos biotecnológicos.

CONCLUSÃO

Levando em consideração a utilização de meio de cultivo alternativo e de baixo custo, a microalga *P. subcapitata* apresentou crescimento satisfatório quando comparado a dados da literatura. Além disso, comparada a outras espécies da classe Chlorophyceae cultivadas em meios mais ricos em nutrientes e com fotoperíodo mais prolongado, a microalga *P. subcapitata* ainda apresentou taxas de crescimento dentro dos padrões observados. Com isso, conclui-se que *P. subcapitata* apresenta elevada produtividade, tolerância às oscilações de pH do meio e crescimento em meio alternativo de baixo custo (NPK). Assim, de acordo com os resultados de outros estudos (GUÉGUEN *et al.*, 2003; MOREIRA-SANTOS *et al.*, 2004), podemos inferir que *P. subcapitata* apresenta grande potencial para ensaios biotecnológicos, como biorremediação e estudos toxicológicos, tanto em escala de bancada como em escala industrial.

REFERÊNCIAS

DOMINGUES, F. D.; BERTOLETTI, E. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Ed.) **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**. São Carlos: Rima, 2008. Cap. 7, p. 153-184.

GUÉGUEN, C.; KOUKAL, B.; DOMINIK, J.; PARDOS, M. Competition between algae (*Pseudokirchneriella subcapitata*), humic substances and EDTA for Cd na Zn control in the algal assay procedure (AAP) médium. **Chemosphere**, v.53, n. 1, p. 927-934, 2003.

HARDY, E. R.; CASTRO, J. G. D. Qualidade nutricional de três espécies de clorófitas cultivadas em laboratório. **Acta Amazonica**, v. 30, n. 1, p. 39-47, 2000.

MOREIRA-SANTOS, M.; SOARES, A. M. V. M.; RIBEIRO, R. An in situ bioassay for freshwater environments with the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 59, p. 164-173, 2004.

SIPAUBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. 2^a. edição. São Carlos: Rima, 2003.

SIPAUBA-TAVARES, L. H.; PEREIRA, A. M. L. Large scale laboratory cultures of *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) and *Diaphanosoma biergei* Korinek, 1981 (Cladocera). **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 4, p. 875-883, 2008.

SIPAUBA-TAVARES, L. H.; IBARRA, L. C. C.; FIORESI, T. B. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) em laboratório utilizando meio Chu₁₂ e de macrófita com NPK. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 35, n. 1, p. 111-118, 2009.

SIPAUBA-TAVARES, L. H.; MILLAN, R. N.; BERCHIELLI, F. A.; Braga, F. M. S. B. Use of alternative media and diferente types of recipients in a laboratory culture of *Ankistrodesmus*

gracilis (Reinsch) Korshikov (Chlorophyceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 33, n. 3, p. 247-253, 2011.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 4^a. edição. Rio de Janeiro: Editora Prentice-Hall do Brasil, Ltda, 1999.

CAPÍTULO II

Efeito da contaminação do meio de cultivo por metais pesados na produção da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) em escala de bancada²

² O trabalho será submetido para publicação na Revista Engenharia Sanitária e Ambiental (ISSN 1413-4152)

Efeito da contaminação do meio de cultivo por metais pesados na produção da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) em escala de bancada

RESUMO

As microalgas vêm sendo muito utilizadas na realização de ensaios biológicos, por causa da sua fácil disponibilidade e baixo custo de obtenção e manutenção. O estudo de sua cinética se faz importante para o conhecimento da sua biologia. O objetivo do presente ensaio foi avaliar o crescimento da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* em meio de cultivo alternativo NPK (20:05:20) contaminado com metais pesados. Todos os tratamentos foram realizados em triplicatas e mantidos em Erlenmeyer de 500 mL contendo 400 ml de água destilada autoclavada, 50 mL da solução NPK e 50 ml de meio de cultura com *P. subcapitata* numa densidade média de $200 \pm 3,8$ células $\times 10^5$. O primeiro tratamento consiste do controle sem a adição de contaminante, enquanto que os demais foram contaminados com cloreto de alumínio (0,2 mg/L), com sulfato ferroso (0,32 mg/L), com sulfato de zinco (0,6 mg/L) e com os três metais. Na análise de covariância (ANCOVA) foi verificada diferença significativa ($F_{4,110} = 14,19$; $p < 0,001$) nas curvas de densidade de *P. subcapitata* entre os tratamentos. Quando analisada a densidade algal e a taxa de crescimento diário o controle foi o único que apresentou resultados positivos; o tratamento contendo todos os metais obteve maior densidade; o tratamento contaminado com zinco obteve o menor potencial de produção. O mesmo padrão ocorreu para os valores de crescimento exponencial, com $K = 0,078$ para o tratamento contaminado com todos metais e 0,016 para o tratamento contaminado com sulfato de zinco. Apesar da baixa tolerância de *P. subcapitata* ao zinco, todos os tratamentos apresentaram crescimento positivo no 21º dia de ensaio, sendo possível atribuir à microalga *P. subcapitata* um elevado potencial de produção em água contaminado pelos metais cloreto de alumínio, sulfato ferroso e sulfato de zinco.

Palavras-chaves: Água residual, Biorremediação, Chlorophyceae, Crescimento exponencial, Densidade algal.

Effect of contamination in the culture medium of heavy metals in the production of the microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) in bench scale

ABSTRACT

Microalgae have been widely used in biological testing because of its easy availability and low cost of production and maintenance. The study of kinetics is important for the understanding of their biology. The objective of this trial was to evaluate the growth of microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* amid growing alternative NPK (20:05:20) contaminated with heavy metals. All treatments were performed in triplicate and kept in a 500 ml Erlenmeyer flask containing 400 ml of autoclaved distilled water, 50 mL of NPK and 50 ml culture medium with *P. subcapitata* an average density of $200 \pm 3.8 \times 10^5$ cells. The first treatment consists of the control without addition of dopant, while the others were contaminated with aluminum chloride (0.2 mg / L), ferrous sulfate (0.32 mg / l), zinc sulfate (0.6 mg / L) and the three metals. In the analysis of covariance (ANCOVA) was significant difference ($F_{4, 110} = 14.19$, $p < 0.001$) in the density curves of *P. subcapitata* between treatments. When analyzed the algal density and rate of daily growth control was the only one that showed positive results; treatment containing all metals had a higher density; contaminated with zinc treatment had the lowest production potential. The same pattern was observed for the values of exponential growth, with $K = 0.078$ for treating contaminated with all metals and 0.016 for treating contaminated with zinc. Despite the low tolerance of *P. subcapitata* to zinc, all treatments showed positive growth in the 21 days of trial with the possibility to assign microalga *P. subcapitata* a high production potential in water contaminated by metals aluminum chloride, ferrous sulfate and zinc sulfate.

Keywords: Wastewater, Bioremediation, Chlorophyceae, Exponential growth, Algal density.

INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos unicelulares fotossintetizantes, com pouca ou nenhuma diferenciação celular. Elas podem ser predominantemente aquáticas, geralmente microscópicas, sendo assim considerado um grupo muito heterogêneo de organismos. São comercialmente utilizadas para produção de biocombustíveis, através da extração de seus óleos, nas indústrias farmacêuticas e alimentícias. As microalgas são muito eficientes também no armazenamento de energia solar, tendo um rápido crescimento e conseqüentemente um aumento de biomassa considerável (OHSE *et al*, 2008).

Muitas microalgas apresentam elevada eficiência em retirar nutrientes ou outros elementos químicos do meio aquoso, apresentando potencial para sua aplicação em ensaios de recuperação de ambientes aquáticos (MIASHIRO, 2008). Com essa propriedade, elas podem ser utilizadas na recuperação de águas residuais, e posteriormente a sua biomassa ser utilizada para outras aplicações industriais e agrícolas. Silva (2007) utilizou a microalga *Clorella vulgaris* imobilizada com alginato de sódio para a remoção de fosfatos de água residual de uma clínica hospitalar, onde foram observadas reduções significativas do contaminante da água.

Como a água é um bem essencial a vida, torna-se necessário dispor dela em condições potáveis e balneáveis. Ultimamente, devido ao grande crescimento populacional e o aumento das atividades industriais perto de rios e nascentes, a qualidade das águas vem sendo afetada (LIMA, 2010). Segundo Lima (2010), um grande problema na questão da água são os metais pesados que podem apresentar grandes problemas ambientais, pois além de ser altamente tóxicos, também são bioacumulativos, o que irá implicar, mesmo quando o mesmo se apresentar apenas em concentrações traços, grandes problemas a vida aquática.

As águas residuais, para serem lançadas nos corpos d'água precisam passar primeiramente por tratamento químico. Estes tratamentos podem trazer muitos prejuízos para a biota aquática, sendo necessária a construção de novas metodologias para a realização de tratamento destas águas (SILVA, 2007). As microalgas podem atuar sobre as águas residuais retirando os nutrientes, removendo metais pesados e ainda diminuindo a quantidade de patógenos pelo incremento de oxigênio ao meio, tornando-se assim uma medida sustentável, pois pode ser

considerada uma tecnologia limpa, pois é uma fonte de energia alternativa, além de fixar carbono, diminuindo assim a quantidade deste no meio ambiente.

Para que as microalgas alcancem seu potencial máximo de desenvolvimento é necessário compreender as condições de temperatura, nutrientes e pH como fatores determinantes para sua produtividade e, conseqüentemente, para atingir as concentrações ótimas na aplicação em ensaios para remoção de metais das águas. Também se faz necessário o controle de certas variáveis, como luminosidade e aeração, já que estes se mostram limitantes ao crescimento das mesmas (SIPAÚBA-TAVARES; ROCHA, 2003, SIPAÚBA-TAVARES *et al*, 2009). Segundo os autores, o meio de cultivo também é de suma importância, já que este é quem vai garantir o crescimento rápido e adequado das microalgas.

No presente ensaio foi utilizada a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Chlorophyceae), pois possui crescimento rápido, baixo custo de manutenção, fácil obtenção, alto poder fotossintético, contendo clorofila *a* e *b*, e possui um aumento de biomassa relativamente alto (SIPAÚBA-TAVARES; ROCHA, 2003, SIPAÚBA-TAVARES *et al*, 2009, ARANTES, 2010). Seus fatores limitantes são luminosidade e aeração e apesar de ser uma microalga de água doce possui elevada resistência a salinidade (ARANTES, 2010). Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção da microalga *P. subcapitata* em meio de cultivo alternativo NPK contaminado por metais pesados, como Alumínio, Ferro e Zinco.

MATERIAL E MÉTODOS

O inóculo inicial da microalga *P. subcapitata* foi obtido no Laboratório de Limnologia do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, da Universidade Federal de São Carlos, isolada da Represa do Broa (São Carlos, SP, Brasil). A microalga foi posteriormente cultivada em meio padrão CHU₁₂ no laboratório do Centro de Pesquisa em Biodiversidade (CPBio). O sistema de cultivo foi estático não axênico, com aeração constante, temperatura ambiente e fotoperíodo 12:12 horas.

Como meio de cultivo das microalgas nos ensaios optou-se por utilizar uma solução com N:P:K (20-5-20 g/L), por se tratar de um meio alternativo mais barato e tão eficiente quanto o CHU₁₂ (SIPAÚBA-TAVARES *et al*, 1999). A solução foi preparado com a adição de 1,0 mL de adubo químico (N:P:K) adicionado a um litro de água destilada e autoclava a 121°C por 20 minutos.

Os ensaios foram elaborados da seguinte forma: 1) o tratamento controle (T1) continha 400 mL de água destilada autoclavada e 50 mL de meio NPK e 50 mL de meio de cultura com *P. subcapitata*; 2) o segundo teste (T2) continha 400 mL de água destilada autoclavada contendo 0,2 mg/L de cloreto de alumínio (AlCl₃), 50 mL de meio NPK e 50 mL de meio de cultura com *P. subcapitata*; 3) o terceiro teste (T3) continha 50 mL de meio de cultura com *P. subcapitata*, e 400mL de água destilada com 0,32 mg/L de sulfato ferroso (FeSO₄) e 50mL de NPK; 4) o quarto tratamento (T4) continha 50 mL de meio de cultura com *P. subcapitata*, 400 mL de água destilada com 0,6 mg/L de sulfato de zinco (ZnSO₄) e 50 mL de NPK; 5) o quinto tratamento (T5) continha 50 mL de meio de cultura contendo *P. subcapitata*, 400 mL de água destilada com 0,2 mg/L de cloreto de alumínio, 0,32 mg/L de sulfato ferroso e 0,6 mg/L de sulfato de zinco e 50 mL de NPK.

O valor utilizado de cada contaminante foi estabelecido tendo como base o dobro do limite permitido pela Resolução 357/2005 do CONAMA (BRASIL, 2005), sendo este limite: 0,1 mg/L Al; 0,3 mg/L Fe; e 0,18 mg/L Zn.

Os ensaios foram desenvolvidos em triplicatas durante 21 dias e retiradas três amostras a cada três dias de intervalo. Nestes intervalos também foram mensurados os valores de pH do meio. Os ensaios foram realizados em Erlenmeyer de 500 ml e foram mantidos em incubadora BOD com controle de fotoperíodo de 2.500 lux provido por lâmpadas fluorescentes brancas (12 h

luz / 12 h escuro), temperatura ($22 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$) e aeração constante. As células das microalgas foram contadas sob microscópio óptico com o auxílio de hemocitômetro (câmara de Neubauer).

Para avaliar a diferença nas curvas de crescimento algal foi utilizada uma análise de covariância (ANCOVA) (ZAR, 1999) e aplicado uma análise de regressão (r^2) para obtenção da taxa de crescimento exponencial (k). Para verificar a correlação entre a densidade algal e o pH do meio foi utilizado o teste de correlação de Spearman. Para análise de variância e comparação múltipla entre médias de experimentos foi utilizado o teste de Tukey. As taxas de crescimento diário foram obtidas pela diferença entre os valores da densidade algal do último e do primeiro dia de ensaio, dividido pelo tempo decorrido em dias (15 dias). Os valores da taxa de crescimento diário foram transformados em Arcsen (Zar, 1999) apenas para testar possível diferença entre os dias de amostragem pela análise e variância simples (One-Way ANOVA). O programa utilizado para análise dos dados foi o Statistica 7.0 (Statsoft Inc, Tulsa, OK, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

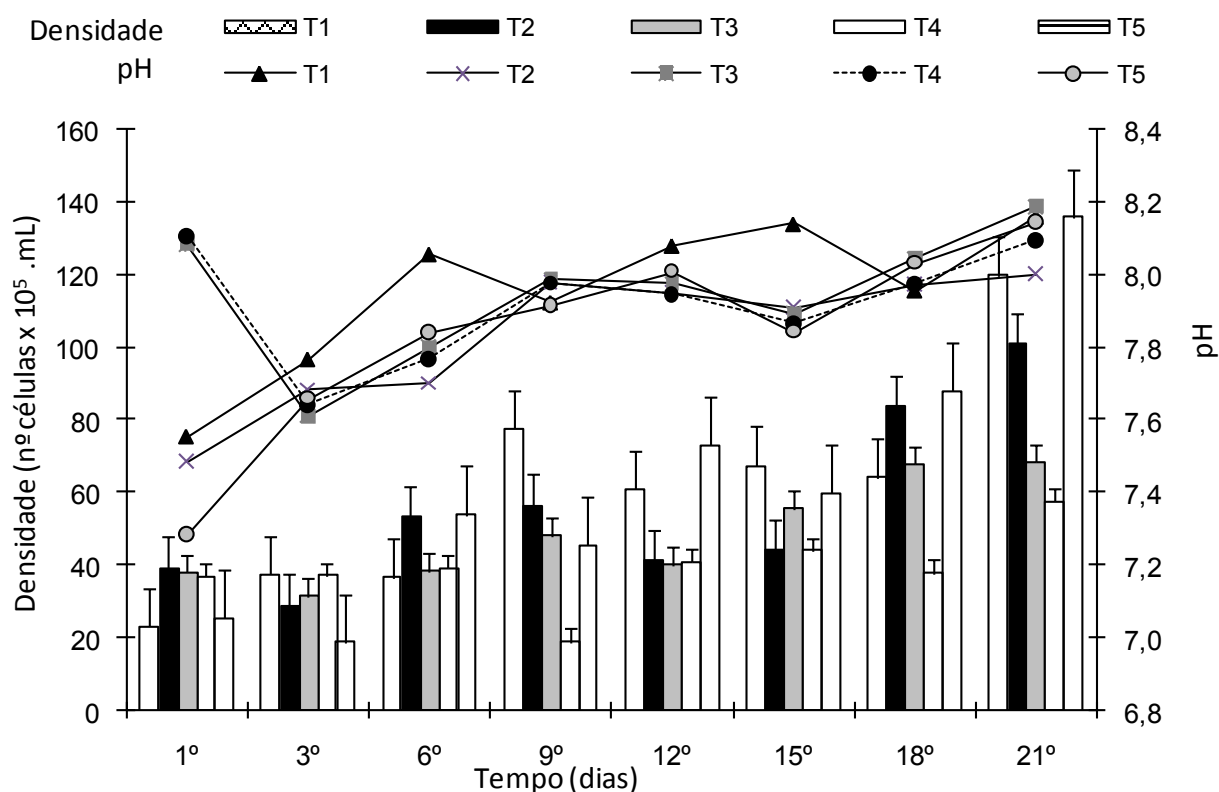
A microalga *P. subcapitata* apresentou um aumento na densidade algal relativamente alto até o 21º dia de ensaio, com períodos de oscilação, principalmente nos 3º e no 9º dias (Figura 1). Assim, foi possível inferir na existência de um período de ajustamento da microalga do meio original de cultivo CHU12 para o meio NPK e, provavelmente, para os contaminantes introduzidos no meio. O tratamento contaminado com $\text{AlCl}_3 + \text{FeSO}_4 + \text{ZnSO}_4$ apresentou maior densidade algácea, enquanto que os tratamentos contaminados isoladamente com sulfato de zinco e sulfato ferroso apresentaram menor densidade (Figura 1). Tais observações foram corroboradas pela análise de covariância (ANCOVA), que apresentou diferença significativa ($F_{4,110} = 14,19$; $p < 0,001$) nas curvas de densidade de *P. subcapitata* entre os tratamentos. As diferenças significativas foram resultantes dos elevados valores apresentados no tratamento contaminado com $\text{AlCl}_3 + \text{FeSO}_4 + \text{ZnSO}_4$ quando comparado com os demais tratamentos, exceto o controle; entre os baixos valores apresentados pelo tratamento contaminado por sulfato de zinco quando comparado com o tratamento contaminado com $\text{AlCl}_3 + \text{FeSO}_4 + \text{ZnSO}_4$ e o controle (teste de Tukey).

Os valores do potencial hidrogeniônico do meio de cultivo apresentaram uma queda no terceiro dia de tratamento nas amostras contendo sulfato de zinco e sulfato ferroso, indicando para estes metais maior instabilidade ao meio de cultivo e reforçando a idéia anterior de ajustamento das microalgas ao meio e aos contaminantes. Apesar da oscilação do pH durante o período do ensaio, foi observado valores muito próximos - entre 8,0 e 8,2 - no último dia de ensaio para todos os tratamentos (Figura 1). No entanto, o teste de Spearman demonstrou existir uma forte correlação entre densidade algal e pH no tratamento contaminado por $\text{AlCl}_3 + \text{FeSO}_4 + \text{ZnSO}_4$ ($R = 0,89$), seguido por uma baixa correlação nos tratamentos contaminados por sulfato ferroso, por cloreto de alumínio e no controle ($R = 0,57$; $0,56$; $0,54$, respectivamente). O tratamento contaminado somente com sulfato de zinco não apresentou correlação significativa ($R = 0,13$).

Conforme ocorreu no presente ensaio, Berenguel *et al.* (2004) enfatizam que o efeito do pH no cultivo de microalgas é complexo, existindo dificuldade em dissociar os efeitos diretos do crescimento microbiano dos efeitos colaterais expressos em termos de modificações no sistema $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ (dióxido de carbono/bicarbonato/carbonato), bem como no equilíbrio

$\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ (amônia/íon amônio). Além disso, o pH pode ser elevado quando há o consumo de formas inorgânicas de carbono, pelo fato dos íons hidroxila serem transportadas para o exterior das células (LOPES, 2007).

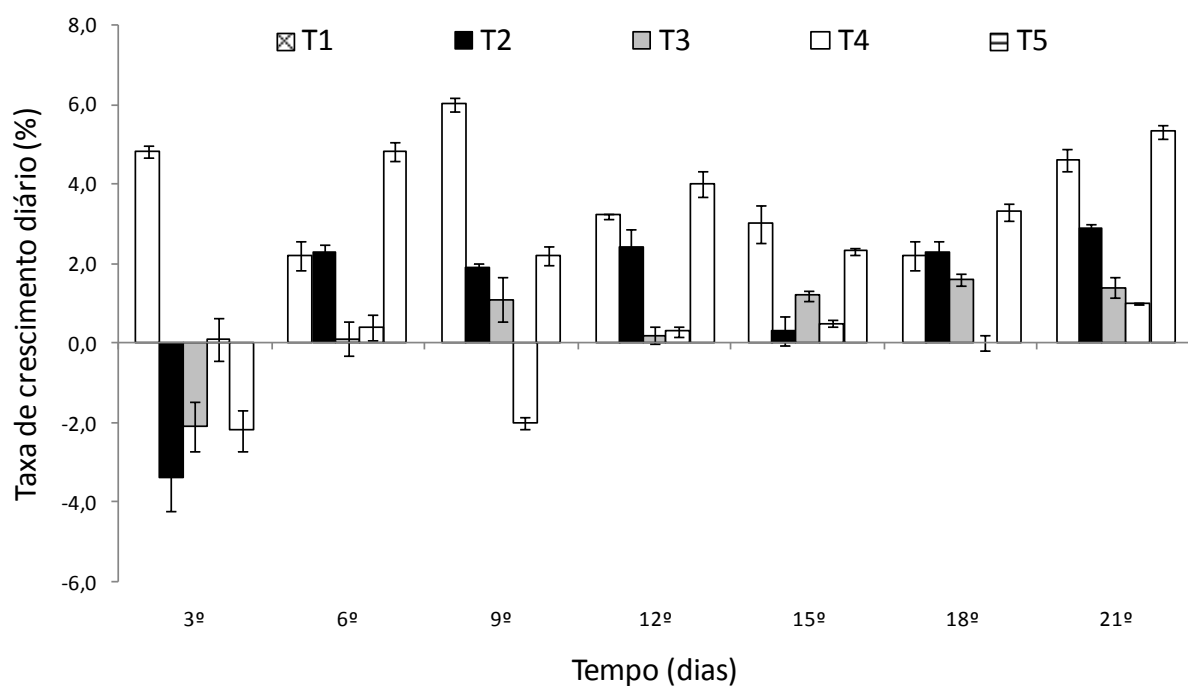
Figura 1. Densidade algácea de *P. subcapitata* (média \pm erro padrão) e potencial hidrogeniônico (média) mensurados nos tratamentos a) T1: controle - sem contaminantes; b) T2: tratamento contaminado com AlCl_3 ; c) T3: tratamento contaminado com FeSO_4 ; d) T4: tratamento contaminado com ZnSO_4 ; e) T5: tratamento contaminado com $\text{AlCl}_3 + \text{FeSO}_4 + \text{ZnSO}_4$



O ajustamento da microalga ao meio de cultivo e aos contaminantes também foi observado através da elevada mortalidade da mesma nos primeiros dias de ensaio. Assim, quando analisada a taxa de crescimento diário, foi observado que somente o controle (sem contaminantes) obteve crescimento positivo em todos os dias de experimento; já os tratamentos contaminados com cloreto de alumínio, sulfato de zinco e os três metais juntos apresentaram

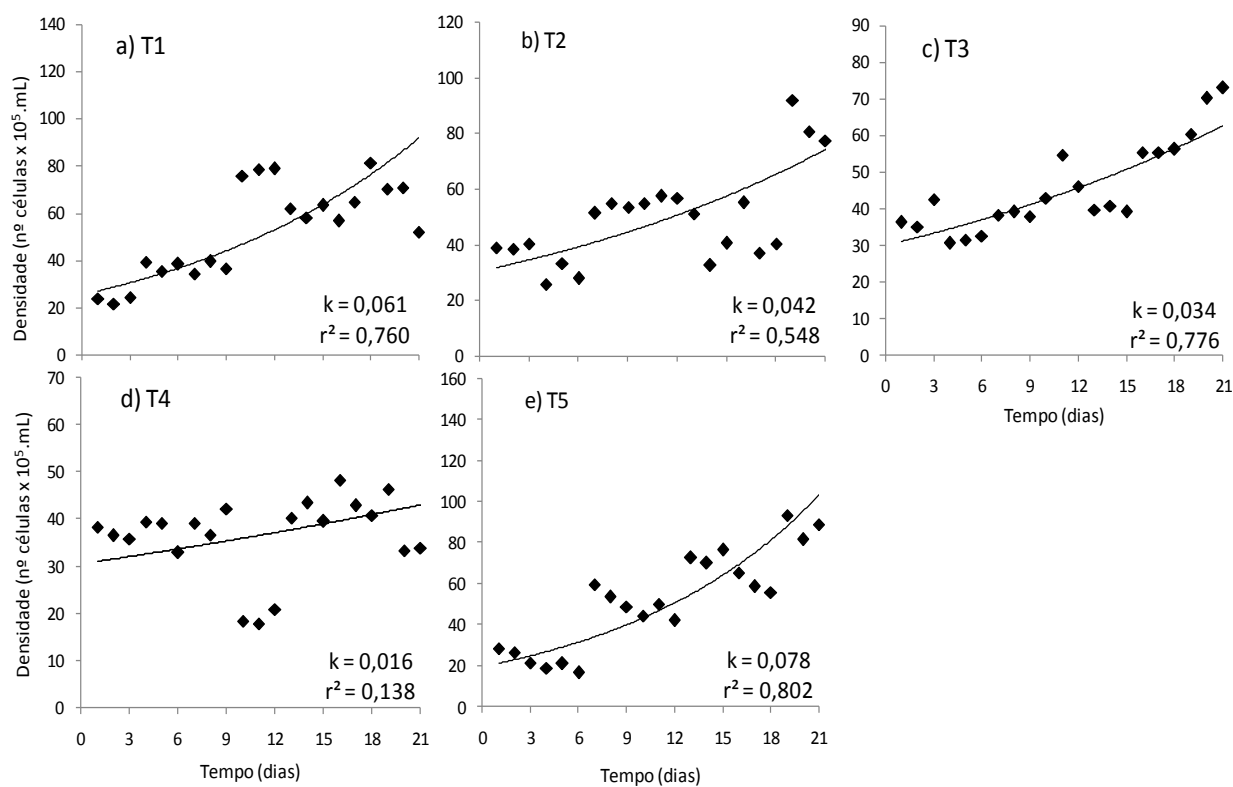
elevada mortalidade no 3º dia de ensaio; o tratamento contaminado com sulfato de zinco apresentou baixo crescimento até o 6º dia de ensaio, seguido de elevada mortalidade no 9º dia (Figura 2). Estes valores atribuem ao sulfato de zinco, quando presente isoladamente, um potencial efeito crônico de toxicidade; para o contaminante cloreto de alumínio e sulfato ferroso apresenta isoladamente um potencial de efeito agudo sobre as microalgas; a associação entre $\text{AlCl}_3 + \text{FeSO}_4 + \text{ZnSO}_4$ pode ter resultado num efeito antagônico, onde os contaminantes, aplicados juntos, interferem um no outro ou interfere com outro contaminante que co-existe no meio (MOZETO; ZAGATTO, 2008). Apesar dos valores de mortalidade apontados, todos os tratamentos apresentaram crescimento positivo no 21º dia de ensaio, sendo possível atribuir à microalga *P. subcapitata* um elevado potencial de produção em água contaminado pelos metais $\text{AlCl}_3 + \text{FeSO}_4 + \text{ZnSO}_4$.

Figura 2. Taxa de crescimento diário (média \pm erro padrão) da microalga *P. subcapitata* nos tratamentos a) T1: controle - sem contaminantes; b) T2: tratamento contaminado com AlCl_3 ; c) T3: tratamento contaminado com FeSO_4 ; d) T4: tratamento contaminado com ZnSO_4 ; e) T5: tratamento contaminado com $\text{AlCl}_3 + \text{FeSO}_4 + \text{ZnSO}_4$.



Os metais pesados são considerados tóxicos para grande parte dos seres vivos (OLIVEIRA, 2007), conforme foi observado para o zinco na produção de biomassa da microalga *P. subcapitata*. Porém, alguns metais pesados podem ser necessários para muitos microorganismos em determinadas concentrações ou associações, sendo assim chamados de elementos-traços, onde eles são essenciais para o desenvolvimento dos mesmos (GUILHERME *et al.*, 2005). Esta necessidade dos metais enquanto elementos-traço foi muito bem observada na associação dos metais $\text{AlCl}_3 + \text{FeSO}_4 + \text{ZnSO}_4$ no meio de cultivo. Além disso, o ferro também pode atuar como co-fator enzimático, aumentando o poder degradativo do meio (GAYLARDE *et al.*, 2005, MOZETO; ZAGATTO, 2008) e, conseqüentemente contribuindo com elevadas taxas de crescimento exponencial.

Figura 3. Análise da regressão (r^2) e crescimento exponencial (k) de *P. subcapitata* nos tratamentos a) T1: controle sem contaminantes; b) T2: tratamento contaminado com AlCl_3 ; c) T3: tratamento contaminado com FeSO_4 ; d) T4: tratamento contaminado com ZnSO_4 ; e) T5: tratamento contaminado com $\text{AlCl}_3 + \text{FeSO}_4 + \text{ZnSO}_4$.



A eficiência nas taxas de produção da microalga *P. subcapitata* também pode ser observada na Figura 3 através da análise de crescimento exponencial (k), onde o tratamento contendo todos metais obteve a maior taxa ($k= 0,078$), seguido pelo tratamento controle ($k = 0,061$), cloreto de alumínio ($k= 0,042$), sulfato ferroso ($k = 0,034$) e, novamente, com valor representativamente mais baixos para o sulfato de zinco ($k= 0,016$). Estudos verificados na literatura com outras espécies da classe Chlorophyceae apresentaram resultados semelhantes, mesmo na ausência de contaminantes como os utilizados no presente trabalho, destacando-se os valores de $k = 0,36$ a $0,56$ descritos por Sipaúba-Tavares *et al* (2009) e $k = 0.14$ a 1.46 por Moreira-Santos *et al* (2004). Contudo, se faz necessário ressaltar que o fotoperíodo utilizado por estes autores foi de 24 horas, enquanto no presente trabalho foi de 12 horas. Segundo Sipaúba-Tavares *et al* (2011), a fase de maior crescimento em seu estudo esteve associada ao período de 24 horas de luz, sugerindo que eficiência de produção do presentes ensaio pode ser mais eficiente se aumentado o fotoperíodo.

CONCLUSÕES

A microalga *P. subcapitata* apresentou elevada produção de biomassa, mesmo na presença de todos os metais juntos no meio de cultura. Tais resultados atribuem à *P. subcapitata* grande potencialidade para sua utilização em processos integrados de biorremediação de águas residuais e produção de biomassa algal. Entretanto, o efeito tóxico do sulfato de zinco sobre a produção algácea sugere a necessidade de incrementar novos estudos, uma vez que o metal não apresentou a mesma toxicidade quando associado ao sulfato ferroso e cloreto de alumínio. Assim, a principal iniciativa deste estudo foi desenvolver propostas, mesmo que em escala de bancado, para trabalhos integrados de aproveitamento de águas residuais de indústrias e outras atividades antrópicas na produção de biomassa algal para a nutrição animal e ou fertilização. Tais propostas atendem aos principais requisitos para o desenvolvimento sustentável, promovendo o equilíbrio entre desenvolvimento econômico e preservação ambiental.

REFERÊNCIAS

ARANTES, P. B. **Influência do herbicida glifosato (n-(fosfonometil)glicina) na formação de biomassa da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (chlorophyceae)**. 2010. 92 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ecologia)- Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2010.

BERENGUEL, M.; RODRIGUEZ, F.; ACIÉN, F.G.; GARCIA, J.L. Model predictive control of pH in tubular photobioreactors. **Journal of Process Control**. n.14. p.377-387, 2004.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 375, de 17 de março de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2005. Seção 1, p. 58-63.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. de L.; MANFIO, G. P. Biorremediação Aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 34, p. 36-43, jan/jun. 2005.

GUILHERME, L. R. G.; MARQUES, J. J.; PIERANGELI, M. A. P.; ZULIANI, D. Q.; CAMPOS, M. L.; MARCHI, G. Elementos-traço em solos e sistemas aquáticos. **Tópicos em ciências do solo**. Viçosa, v. 4, p. 345-390, 2005.

LIMA, P. C. G. de. **Estudos dos mecanismos de detoxificação e tolerância aos metais crômio e cobre em *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Pistia stratiotes* e o uso das macrófitas *Tpha* sp e *Phragmites* sp na remoção de nutrientes em *wetlands* construídos**. 2010. 283f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

LOPES, E. J. **Seqüestro de dióxido de carbono em fotobiorreatores**. 2007. 163 f. Tese (Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química-Mestrado e Doutorado) – Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

MIASHIRO, L. **Avaliação ambiental de um sistema de piscicultura, através do fitoplâncton e de ensaios ecotoxicológicos com a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (CHLOROPHYCEAE)**. 2008. 115 f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura e Pesca)- Instituto de Pesca, São Paulo, 2008.

MOREIRA-SANTOS, M.; SOARES, A. M. V. M.; RIBEIRO, R. An in situ bioassay for freshwater environments with the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 59, p. 164-173, 2004.

MOZETO, A. A.; ZAGATTO, P. A. Introdução de agentes químicos no ambiente. In: ZAGATTO, A. A.; BERTOLETTI, E. (Eds.) **Ecotoxicologia aquática** – princípios e aplicações. 2ª ed. São Carlos: RiMa, 2008.

OHSE, S.; DERNER, R. B.; OZÓRIO, R. Á.; BRAGA; M. V. da C.; CUNHA, P.; LAMARCA, C. P.; SANTOS, M. E. Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. **Revista Biotemas. Revista Biotemas**, Ponta Grossa, v. 21 n. 2, jun. 2008.

OLIVEIRA, Á. C. de. **Toxidade de elementos-traço para consumidores primários na presença de exopolissacarídeos produzidos por organismos fitoplanctônicos (Chlorophyceae e Cyanophyceae)**. 2007. 207 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental)- Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

SILVA, S. A. P. da. **BIORREMEDIAÇÃO EM ÁGUAS RESIDUAIS: remoção de fosfatos utilizando microalgas *Chlorella vulgaris* imobilizadas em meio de alginato de sódio**. 2007. 72 f. Dissertação (Mestrado em Hidrobiologia)- Universidade do Porto, Porto, 2007.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; IBARRA, L. C. C.; FIORESI, T. B. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (reisch) korsikov (chlorophyta) em laboratório utilizando meio chu12 e de macrófita com npk. **Boletim do Instituto de Pesca**. São Paulo, v. 35. n. 1. p. 111-118. 2009.

SIPAUBA-TAVARES, L. H.; MILLAN, R. N.; BERCHIELLI, F. A.; Braga, F. M. S. B. Use of alternative media and diferente types of recipients in a laboratory culture of *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korshikov (Chlorophyceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 33, n. 3, p. 247-253, 2011.

SIPAUBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. 2^a. edição. São Carlos: RiMa, 2003.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; PELICIONI, L. C.; OLIVERA, A. Use of inorganic (NPK) and the CHU12 medium for cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* in laboratory. **Brazilian Journal of Ecology**, v.1, p. 10-15, 1999

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 4^a. edição. Rio de Janeiro: Editora Prentice-Hall do Brasil, Ltda, 1999.