



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA

Eficiência do crescimento da microalga *Thalassiosira fluviatilis*
em dois diferentes meios de cultivo com variação na
concentração de sílica.

RENATO TEIXEIRA MOREIRA

TRABALHO SUPERVISIONADO (MONOGRAFIA)
APRESENTADO AO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE
PESCA DO CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, COMO PARTE DAS
EXIGÊNCIAS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
ENGENHEIRO DE PESCA.

FORTALEZA - CEARÁ - BRASIL
JULHO/2007

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Wladimir Ronald Lobo Farias, D.Sc
Orientador/Presidente

Prof. Alexandre Holanda Sampaio, Ph.D.
Membro

Eng. de Pesca Glacio de Souza Castro, M.Sc
Membro

VISTO:

Prof. Moisés Almeida de Oliveira, D.Sc
Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca

Prof. Raimundo Nonato de Lima Conceição, D.Sc
Coordenador do Curso de Engenharia de Pesca

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M839e Moreira, Renato Teixeira.

Eficiência do crescimento da microalga *Thalassiosira fluviatilis* em dois diferentes meios de cultivo com variação na concentração de sílica / Renato Teixeira Moreira. – 2007.
28 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2007.

Orientação: Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias.

1. Microalgas - Brasil, Nordeste. 2. Microalgas - Crescimento. 3. Microalgas - Cultivo. 4. Engenharia de Pesca. I. Título.

CDD 639.2

AGRADECIMENTOS

Agradeço am primeiro lugar a Deus, pela forma como me deu força e determinação.

À minha esposa e filha pelo amor, compreensão, dedicação e força que me deram durante todo este período de muita abdicção e luta, mas nos dá a certeza de um futuro melhor. A elas quem dedico toda a minha vida e meu amor.

Aos meus pais e sogros pela atenção, compreensão e paciência que tiveram. Irmãos e cunhado pelo apoio. Muito obrigado.

Ao professor, Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias pela orientação, paciência e disposição em todo momento.

Ao amigo Francisco Farley Vasconcelos de Sousa pela amizade. O meu muito obrigado.

A todos os professores que contribuíram na minha formação e conclusão de curso, em especial as professoras Silvana e Artamizia e ao professor Calíope.

A todos os colegas que conviveram comigo no curso e demais funcionários do departamento de Engenharia de Pesca da UFC.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMO	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	7
2.1. Obtenção da microalga <i>Thalassiosira fluviatilis</i>	7
2.2. Preparo da água do mar artificial	7
2.3. Preparo dos meios de cultivo	7
2.4. Esterilização do material utilizado	10
2.5. Montagem do experimento	10
2.6. Início dos cultivos	11
2.7. Condições físico-químicas	12
2.8. Acompanhamento do cultivo	12
2.9. Correlação entre a absorbância à 700nm e o nº de cel (s).mL ⁻¹	12
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
3.1. Correlação entre os valores de Absorbância a 700nm e nº de células.mL ⁻¹	13
3.2. Curvas de crescimento da microalga <i>T. fluviatilis</i> cultivadas em meio Conway e Guilard F/2.	14
3.3. Curvas de crescimento da microalga <i>T. fluviatilis</i> cultivadas em meio Conway e Guilard F/2, expressas em valores de absorbância a 700 nm.	18
4. CONCLUSÕES	20
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Fluxograma mostrando as várias etapas da transferência das culturas no cultivo do tipo "batch".	11
Figura 2: Correlação linear entre a absorbância a 700 nm e o n° de cel(s).mL ⁻¹ de <i>T. fluviatilis</i> , cultivadas em meio Conway com 0,051 (A) e 0,025 g.L ⁻¹ de silicato de sódio (B).	13
Figura 3: Correlação linear entre a absorbância a 700 nm e o n° de cel(s).mL ⁻¹ de <i>T. fluviatilis</i> , cultivadas em meio Guilard com 0,051 (A) e 0,025 g.L ⁻¹ de silicato de sódio (B).	14
Figura 4: Curvas de crescimento de <i>T. fluviatilis</i> , cultivadas em meio Conway com 0,051 (A) e 0,025 g.L ⁻¹ de silicato de sódio (B).	16
Figura 5: Curvas de crescimento de <i>T. fluviatilis</i> , cultivadas em meio Guilard F/2 com 0,051 (A) e 0,025 g.L ⁻¹ de silicato de sódio (B).	16
Figura 6: Curvas de crescimento da microalga <i>T. fluviatilis</i> em meios de cultivo Conway e Guilard com 0,025g.L ⁻¹ de silicato de sódio, expressa em valores de absorbância a 700 nm.	18

RESUMO

As microalgas são importantes para o ambiente por se constituírem como importante elo na cadeia trófica dos animais aquáticos, podendo ser ainda utilizadas como bioindicadores e regular os teores de nutrientes na coluna d'água. O presente trabalho teve por objetivo avaliar o desenvolvimento da microalga diatomácea *Thalassiosira fluviatilis* nos meios de cultivo Conway e Guilard f/2, com diferentes concentrações de silicato de sódio. Os cultivos foram monitorados através da contagem direta das células em câmara de Neubauer e da absorbância da cultura a 700 nm, utilizando um espectrofotômetro. O melhor resultado foi obtido com o meio Conway, utilizando uma baixa concentração de silicato de sódio, seguido do meio Guilard na mesma concentração de silicato. Quando os cultivos foram realizados com o dobro da concentração de silicato de sódio, apresentaram um desenvolvimento letárgico e bastante curto, resultando na formação de muito material precipitado, células despigmentadas, levando à morte das culturas. Desta forma, as elevadas concentrações de silicato de sódio inibem o crescimento algal em culturas de *T. fluviatilis*.

EFICIÊNCIA DO CRESCIMENTO DA MICROALGA *Thalassiosira fluviatilis* EM DOIS DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO COM VARIAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE SÍLICA.

RENATO TEIXEIRA MOREIRA

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento do plâncton de uma dada região é de grande importância quando se visa seu aproveitamento através da pesca ou aquicultura, pois ele representa a base de todos os alimentos produzidos na água, constituindo um importante elo na cadeia trófica dos animais aquáticos (FONSECA; KLEIN, 1976).

As microalgas não são somente importantes na aquicultura como fonte de alimento, mas também podem auxiliar na manutenção da qualidade de água, pois têm um papel funcional no balanço do oxigênio, do dióxido de carbono e dos compostos nitrogenados, sobretudo amônia (DERNER, 1996).

As microalgas também são utilizadas como bioindicadores, ajudando a dar informações sobre o nível de eutrofização de corpos d'água, e estudos mostram que variáveis ambientais, tais como, a proporção entre nitrogênio e fósforo, salinidade e o movimento da água influenciam no desenvolvimento desses microorganismos (TROBAJO et al., 2004).

Outra característica importante que deve ser atribuída às microalgas é o seu fácil desenvolvimento a partir de várias fontes de nutrientes presentes na coluna da água. Um experimento realizado por KHOI et al. (2006) mostrou que a microalga *Chaetoceros calcitrans* foi capaz de se desenvolver, de maneira satisfatória, quando inoculada em meios que continham, como fertilizantes, sedimentos de *Artemia franciscana*, sendo apenas necessário um ligeiro controle na proporção de nitrogênio e fósforo presente no sedimento.

A luz e a concentração de nutrientes são fatores que limitam o crescimento das algas. A intensidade de luz e a duração do fotoperíodo regulam o suprimento de energia para a fotossíntese e a concentração de nutrientes influi diretamente na constituição estrutural das células (SIPAÚBA-TAVARES; ROCHA, 2001).

Em cultivos experimentais, à distância da fonte luminosa também é bastante importante para o desenvolvimento das microalgas. GOKSAN et al. (2003) cultivaram a diatomácea *C.muelleri* em bioreatores, utilizando distâncias de 1 e 3 cm de uma fonte luminosa com a mesma intensidade de luz. Os autores observaram que a distância de 3 cm resultou em um bom desenvolvimento das microalgas, tanto para baixas como altas densidades iniciais do inóculo, enquanto que na distância de 1 cm o crescimento foi reduzido, provavelmente devido à uma fotoinibição.

A intensidade da irradiação também influencia diretamente no cultivo de microalgas. ILYASHI; ZAPARA (2006) mostraram que, para algumas diatomáceas, ocorre um melhor desenvolvimento em baixa irradiação e, para outras, o crescimento é otimizado com uma alta irradiação, sendo também importante a fonte de nitrogênio. De acordo com os resultados, o crescimento da microalga *Thalassiosira weissflogii* cessou antes do crescimento da microalga *Pseudonitzschia delicatissima*, quando as mesmas foram cultivadas juntas e sob alta irradiação. Por outro lado, sob baixa irradiação, o crescimento de *P. delicatissima* parou antes do de *T. weissflogii*, quando a fonte de nitrogênio foi a uréia, mas o crescimento de *T. weissflogii* foi o primeiro a cessar no meio de cultivo rico em nitrato.

Algumas microalgas também podem ser cultivadas na ausência de luz, através de um crescimento mixotrófico, utilizando diversos substratos. A capacidade de diferentes nutrientes em promover o crescimento mixotrófico varia não somente pela natureza dos mesmos, mas também de acordo com a concentração utilizada. GARCIA et al. (2005) cultivaram a microalga *Phaedactylum tricornutum* utilizando o glicerol como substrato suplementado com uréia ou com nitrato de sódio. Os melhores resultados foram obtidos na

suplementação com uréia, resultando em uma maior biomassa, bem como no teor de ácidos graxos, o qual foi maior do obtido em um cultivo fotoautotrófico.

Uma escassez de nutrientes no meio de cultivo também pode causar danos ao crescimento das microalgas. A concentração de um desses compostos, o nitrato, foi avaliada por LI et al. (2005), durante treze dias de cultivo da microalga *Pavlova viridis*. De acordo com os resultados, esta microalga marinha apresentou um baixo desenvolvimento quando cultivada em baixas concentrações de nitrato (0-0,12 mM). Os autores observaram ainda uma influência no teor de ácidos graxos das células, de forma que a taxa de lipídeos aumentou em 7,2% do peso seco quando a concentração de nitrato caiu de 6,2 para 0 mM. Por outro lado, o nível máximo de proteína foi encontrado no 7º dia de cultivo, quando foi utilizada uma concentração de 6,2 mM de nitrato.

NISHIKAWA; HORI (2004) avaliaram os efeitos do nitrogênio, fósforo e sílica no crescimento da diatomácea *Eucampia zodiacus*, uma microalga responsável pelo branqueamento dos talos da macroalga *Porphyra* sp., cultivada no Japão. Os autores mostraram que a microalga foi capaz de crescer bem utilizando nitrato, nitrito, amônia e glutamina como fontes de nitrogênio, no entanto ácido úrico, uréia e aminoácidos não foram bem utilizados pela diatomácea. Além disso, a microalga foi capaz de utilizar uma grande variedade de compostos orgânicos e inorgânicos de fósforo.

A temperatura é também um fator de bastante importância no desenvolvimento das microalgas. BUTTERWICK et al. (2005) avaliaram a influência da temperatura em 21 espécies de microalgas planctônicas e determinaram que até a temperatura de 25°C todas as microalgas mantiveram os seus desenvolvimentos normais, enquanto que a 30°C a maioria das diatomáceas, algumas cianofíceas e todas as flageladas não continuaram a se desenvolver. A 35°C, somente a cianofícea *Aphanizomenon flos-aquae* continuou a crescer moderadamente. Assim, a distribuição natural dessas espécies está relacionada com suas diferenças interespecíficas, bem como pelas estações do ano, altitude e latitude.

A fim de suportar condições ambientais adversas e severas, tais como *variações bruscas de temperatura associadas à falta ou excesso de nutrientes*, principalmente fósforo e nitrogênio, alguns microorganismos aquáticos são capazes de se encistar, desenvolvendo células de resistência especializadas, tais como acinetos, estatósporos entre outras. No caso do dinoflagelado *Peridinium cinctum* os teores de nitrogênio e as variações de temperatura são os fatores de maior importância para provocar o encistamento das células. Já a influência das concentrações de fósforo só foi observada em temperaturas mais elevadas. (GRIGORSZKY et al., 2006).

TAKABAYASHI et al. (2006) analisaram o efeito da temperatura associada à concentração de nutrientes na extensão da cadeia da microalga *Skeletonema costatum*, comparando organismos cultivados em laboratório e na natureza. De acordo com os autores, um aumento na temperatura (6 - 17°C) e na concentração de nutrientes resultaram em elevadas taxas de crescimento e na abundância das cadeias longas. No entanto, os maiores comprimentos das cadeias de *S. costatum* foram observados no ambiente natural, sendo menores nas culturas do tipo estacionário.

NISHIKAWA et al. (2000) estudaram a influência de variações de salinidade e temperatura no crescimento de 4 linhagens da diatomácea gigante *Coscinodiscus wailesii*. Foram testadas 36 diferentes combinações de temperatura (5 - 30°C) e salinidade (10 - 35‰) em uma mesma intensidade luminosa com um fotoperíodo de 16 h de luz e 8 h de escuro. Os melhores resultados foram obtidos na faixa de temperatura de 20 a 25°C e na faixa de salinidade de 20 a 30‰. Quando a microalga foi cultivada de 5 a 10°C, a taxa de crescimento decresceu mais do que a metade do crescimento ótimo observado. Desta forma, a baixa temperatura da água é o principal fator limitante para o florescimento desta espécie no ambiente natural.

COLES; JONES (2000) avaliaram a influência da temperatura na capacidade fotossintética e na taxa de crescimento de quatro espécies fitoplanctônicas isoladas de água doce. O crescimento das microalgas, avaliado pelo teor de clorofila, foi fortemente influenciado pela temperatura para todas as

espécies. A cianobactéria *Oscillatoria* sp apresentou uma elevada taxa de crescimento em todas as temperaturas testadas (15, 20, 25 e 30°C), enquanto que *Microcystis aeruginosa*, outra cianofícea, cresceu melhor nas temperaturas mais elevadas. Já a diatomácea *Aulacoseira granulata* apresentou um melhor desenvolvimento em temperaturas mais baixas.

A influência da agitação mecânica da água foi avaliada por SOBCZUK et al. (2006) em cultivos das microalgas *Phaeodactylum tricornutum* e *Porphyridium cruentum*. Os danos nas células foram quantificados através do decréscimo da biomassa celular, no estágio estacionário dos cultivos, em fotobioreatores. Os resultados mostraram que a agitação máxima tolerável depende da espécie. Além disso, um incremento na agitação resulta em um declínio da biomassa no estágio estacionário. A agitação mecânica não foi à causa direta dos danos nas células, e sim a ruptura de pequenas bolhas na superfície das culturas. No entanto, a formação das bolhas foi ocasionada pelo incremento da agitação.

EKER-DEVELLI et al. (2006) avaliaram os efeitos do nitrato, amônio e fosfato em vários parâmetros das microalgas *Skeletonema costatum* (diatomácea), *Prorocentrum micans* (dinoflagelado) e *Emiliana huxleyi* (cocolitoforídeo) cultivadas em laboratório. A relação carbono: clorofila a, um parâmetro bastante utilizado para estimar a produtividade primária, foi substancialmente diferente entre as três espécies, bem como em diferentes concentrações de nutrientes no final da fase exponencial de crescimento. Já o teor de clorofila a foi maior nas fases iniciais de crescimento também para as três espécies. Por outro lado, o teor de clorofila a em *S. costatum* foi quase duas vezes maior do que o das outras duas espécies no final da fase exponencial de crescimento.

A sílica é um nutriente essencial para o desenvolvimento de diatomáceas, as quais o incorporam em suas paredes celulares para formação de suas valvas. PENNA et al. (2004) utilizaram duas diferentes fontes de sílica para o desenvolvimento de diatomáceas, sendo uma biogênica (espículas de esponjas) e uma outra de origem mineral (areia de quartzo). Os autores demonstraram que a sílica de origem mineral foi mais assimilada pelas diatomáceas *Cylindrotheca fusiformis*, *Navicula* sp. e *S. costatum*, quando comparada com a de origem

animal. Desta forma, no ambiente natural, as fontes minerais também devem ser as mais utilizadas.

As microalgas da espécie *Thalassiosira fluviatilis* são eucarióticas, pertencem à divisão Bacillariophyta (diatomáceas) e apresentam, como pigmentos principais, as clorofilas a, c₁ e c₂, xantofilas (fucoxantina) e carotenos, os quais conferem às mesmas uma coloração geralmente marrom-amarelada. Possuem uma parede celular composta principalmente por sílica e utilizam a crisolaminarina e lipídios como substâncias de reserva energética. São bastante encontradas em ambientes marinhos, onde se reproduzem através de divisão celular simples ou bipartição. Suas células apresentam forma cilíndrica com 12 a 14 µm de comprimento e se reúnem em cadeias curtas unidas por um filamento gelatinoso que parte do centro das valvas, porém em cultivo, geralmente, as células encontram-se isoladas. Apresentam elevadas concentrações de carboidratos, lipídeos e proteínas em sua composição bioquímica e são de alto valor nutricional para larvas de camarões como o *Penaeus schimitti* e *P. paulensis* (ROCHA et al., 2001).

O objetivo deste estudo foi avaliar o desenvolvimento da microalga *T. fluviatilis* nos meios de cultivo Conway e Guillard f/2, utilizando duas diferentes concentrações de silicato de sódio.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção da microalga *Thalassiosira fluviatilis*

As cepas da microalga *T. fluviatilis*, utilizadas neste estudo, foram obtidas no cepário do laboratório de Planctologia do Departamento de Engenharia de Pesca da UFC, onde as mesmas são mantidas em tubos de ensaio.

2.2. Preparo da água do mar artificial

Neste trabalho, os meios de cultivo foram preparados utilizando água do mar artificial. Esta água foi preparada adicionando-se os seguintes sais a 1 L de água destilada:

Cloreto de sódio	27,6 g
Sulfato de magnésio	6,9 g
Cloreto de magnésio	5,4 g
Cloreto de cálcio	1,4 g
Cloreto de potássio	0,6 g
Bicarbonato de sódio	0,2 g
Brometo de potássio	0,027 g

2.3. Preparo dos meios de cultivo

Neste trabalho foram utilizados dois meios de cultivo, o Guillard f/2 e o Conway "modificado". Inicialmente, foram preparadas as soluções estoque e, em seguida, o meio de cultivo propriamente dito.

2.3.1. Meio Guillard "f/2".

2.3.1.1. Preparo das soluções estoque.

- Solução 1: Nitrato de Sódio
 - $\text{NaNO}_3 \rightarrow 75,0 \text{ g.L}^{-1}$ de água destilada;

- Solução 2: Fosfato Monobásico de Sódio
 - $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} \rightarrow 5,0 \text{ g.L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$

- Solução 3: Silicato de Sódio
 - NaSiO_3 anidro $\rightarrow 51,0 \text{ g.L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$

- Solução 4: Vitaminas
 - Citoneurim 5000 (MERCK) $\rightarrow 1$ ampola. $50 \text{ mL}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$.

- Solução 5: Metais traço. A 950 mL de dH_2O foram adicionados:
 - $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow 3,15 \text{ g}$
 - EDTA $\rightarrow 4,36 \text{ g}$
 - 1 mL de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} \rightarrow 9,8 \text{ g.L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$
 - 1 mL de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \rightarrow 22,0 \text{ g.L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$
 - 1 mL de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow 10,0 \text{ g.L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$
 - 1 mL de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 6,3 \text{ g.L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$
 - 1 mL de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 180,0 \text{ g.L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$

Em seguida, o volume foi elevado para 1,0 L com dH_2O . Após o preparo, as soluções foram autoclavadas e estocadas a 4°C .

2.3.1.2. Elaboração do meio de cultivo.

A 950 mL de água do mar artificial foram adicionados 1,0 mL das soluções 1, 2 e 5; 1,5 ou 0,75 mL da solução 3 (dependendo do tratamento) e 0,5 mL da solução 4. Em seguida, o volume foi elevado para 1 L com água do mar artificial e autoclavado.

2.3.2. Meio Conway modificado por Wayne (1974).

2.3.2.1. Preparo das soluções estoque.

- Solução de metais traços. A 10,0 mL de dH₂O foram adicionados:

- $\text{ZnCl}_2 \rightarrow 0,21 \text{ g}$
- $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow 0,2 \text{ g}$
- $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 0,09 \text{ g}$
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} \rightarrow 0,2 \text{ g}$

- Solução Principal. A 1950 mL de dH₂O foram adicionados:

- $\text{Na}_2\text{EDTA} \rightarrow 90,0 \text{ g}$
- $\text{H}_3\text{BO}_3 \rightarrow 67,2 \text{ g}$
- $\text{NaNO}_3 \rightarrow 200,0 \text{ g}$
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} \rightarrow 40,0 \text{ g}$
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 0,72 \text{ g}$
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2,6 \text{ g}$
- Solução de Metais Traço $\rightarrow 2,0 \text{ mL}$

- Solução de Silicato de Sódio:

- Na_2SiO_3 anidro $\rightarrow 51,0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$

- Solução de Vitaminas:

- Citoneurim 5000 (MERCK) → 1 ampola. $50 \text{ mL}^{-1} \text{ dH}_2\text{O}$.

Após o preparo, as soluções foram autoclavadas e estocadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.3.2.2. Elaboração do meio de cultivo: A 950 mL de água do mar artificial foram adicionados:

- Solução Principal → 2,0 mL
- Solução de silicatos → 1,5 ou 0,75 mL (dependendo do tratamento)
- Vitaminas → 0,1 mL

Em seguida, o volume foi elevado para 1 L com água do mar artificial e autoclavado.

2.4. Esterilização do material utilizado

Todo o material utilizado no experimento, incluindo os tubos de ensaio, erlenmeyers e os potes de vidro com capacidade para 3 L foram previamente lavados com água e detergente, enxaguados e, posteriormente esterilizados em autoclave a uma temperatura de 120°C por 15 minutos, para que fossem eliminados todos os microorganismos, presentes na superfície das vidrarias.

2.5. Montagem do experimento

Neste experimento, a microalga *T. fluviatilis* foi cultivada em meio Guillard f/2 e em meio Conway, variando-se a concentração de sílica e a densidade inicial do inóculo. Assim, em um primeiro momento, os cultivos foram realizados partindo de inóculos de baixa densidade algal, sendo utilizados 1,5 ou 0,75 mL da solução de silicato de sódio para o preparo dos meios de cultivo. Em um segundo momento, os meios de cultivo foram preparados da mesma maneira, no entanto, os inóculos apresentavam uma maior densidade de microalgas.

2.6. Início dos cultivos

O tipo de cultivo utilizado neste experimento foi o "batch" ou cultivo estacionário, que consiste na transferência das culturas para volumes crescentes de meio. Para isso, a cepa-mãe foi repicada em quatro tubos de ensaio de 40 mL contendo 1,0 mL de meio de cultivo, sendo dois tubos em meio Conway e dois em meio Guillard f/2, com os dois tubos de ensaio de cada meio contendo as diferentes concentrações de silicato de sódio.

Diariamente, os volumes de cada tubo de ensaio foram duplicados com meio de cultivo, até atingirem um volume de 32 mL, o que ocorreu após cinco dias da repicagem. Posteriormente, após a intensificação da coloração das culturas, os conteúdos dos tubos de ensaio foram transferidos para erlenmeyers de 250 mL, os quais passaram pelo mesmo procedimento de acréscimo de meio de cultivo até atingirem um volume de 200 mL e uma coloração marrom mais intensa, o que levou cerca de 6 dias. Finalmente, as culturas nos erlenmeyers foram transferidas para potes de vidro de 3L. Neste momento, o volume dos potes foi aumentado de 200 mL para 2 L, sendo iniciados os cultivos definitivos (Figura 1).

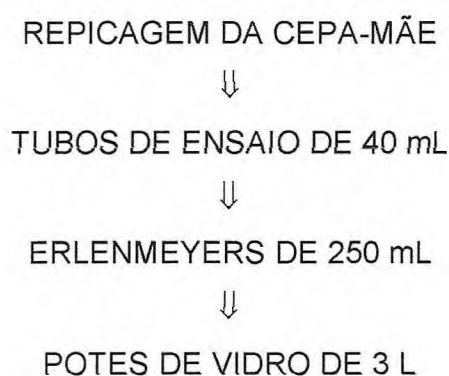


Figura 1: Fluxograma mostrando as várias etapas da transferência das culturas no cultivo do tipo "batch".

2.7. Condições físico-químicas

As culturas foram conduzidas em uma estante de ferro, com iluminação fornecida por lâmpadas fluorescentes de 20W para os tubos de ensaio e erlenmeyers e de 40W para os potes de vidro. O fotoperíodo foi controlado por um “timer”, programado em 16h de claro e 8h de escuro e a temperatura da sala de cultivo foi controlada por um condicionador de ar, ficando em torno de $24 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.8. Acompanhamento do cultivo

O acompanhamento do cultivo de *T. fluviatilis* foi realizado a partir da repicagem das culturas para os potes de vidro de 3L, sendo feito através de leitura da absorbância em espectrofotômetro e contagem de células em câmara de Neubauer. Para isso, a cada 48 horas, foi retirada uma alíquota de 1,0 mL dos diferentes cultivos, para leitura da absorbância a 700nm e, posteriormente, realizada a contagem do número de células. Antes do preenchimento da câmara de Neubauer, foram adicionados duas gotas da solução de formol com bórax, para fixação das células. A contagem foi realizada em um microscópio Olimpikus com contraste de fase, sendo contadas todas as células dentro dos quatro quadrados maiores da câmara. O cálculo do nº de células. mL⁻¹ foi realizado utilizando-se a fórmula:

$$\text{N}^\circ \text{ de células} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células contadas}}{4} \times 10^{-4}$$

2.9. Correlação entre a absorbância à 700nm e o número de células.mL⁻¹

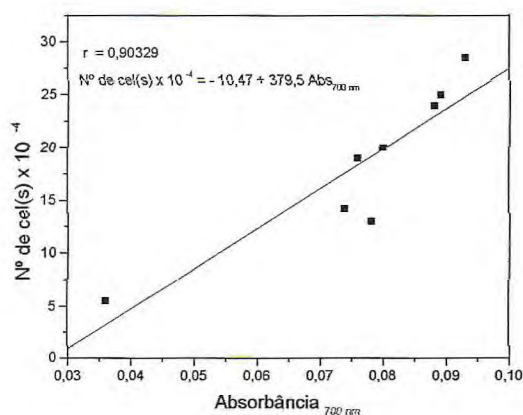
Os valores de absorbância a 700nm e os respectivos valores das contagens de células foram submetidos a uma análise de correlação linear e, posteriormente, utilizados para a obtenção da equação de regressão linear através da função estatística do Programa Excel.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

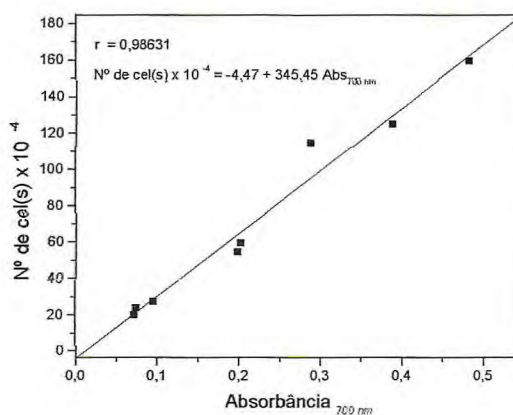
3.1. Correlação entre os valores de absorbância a 700nm e número de células.mL⁻¹

A intensidade da cor do cultivo, medida através de espectrofotometria aumenta proporcionalmente com a elevação do número de células das microalgas, como observado no cultivo, em laboratório, da cianofícea *Spirulina platensis* (Da SILVA, 2004), bem como das clorofíceas *Haematococcus pluvialis* (SOARES, 2005) e *Dunaliella* sp (OLIVEIRA, 2007).

A correlação linear entre os valores de absorbância a 700nm e os respectivos valores de nº de cel(s).mL⁻¹ de *T. fluviatilis* foi máxima ($r = 0,98631$), quando as células foram cultivadas em meio Conway com 0,025 g.L⁻¹ de silicato de sódio (Figura 2B). Nesta concentração, a cultura de *T. fluviatilis* alcançou a concentração de $159,75 \times 10^4$ cel(s).mL⁻¹ e uma coloração marrom, bastante acentuada. Por outro lado, quando a microalga foi cultivada na concentração de 0,051 g.L⁻¹ de silicato de sódio o coeficiente de correlação foi inferior ($r = 0,90329$), com a cultura atingindo apenas $28,5 \times 10^4$ cel(s).mL⁻¹ (Figura 2A).



A



B

Figura 2: Correlação linear entre a absorbância a 700 nm e o n° de cel(s).mL⁻¹ de *T. fluviatilis*, cultivadas em meio Conway com 0,051 (A) e 0,025 g.L⁻¹ de silicato de sódio (B).

A mudança do meio Conway para Guilard f/2 resultou em um pior desempenho das microalgas e o cultivo realizado na maior concentração de silicato de sódio (0,051 g.L⁻¹) foi o que apresentou o menor n° de células (20,3 x 10⁴ cél(s).mL⁻¹). A redução da concentração de silicato de sódio para 0,025 g.L⁻¹ melhorou o desempenho da cultura de microalgas, chegando a atingir 92,25 x 10⁴ cél(s).mL⁻¹. (Figura 3 A e B).

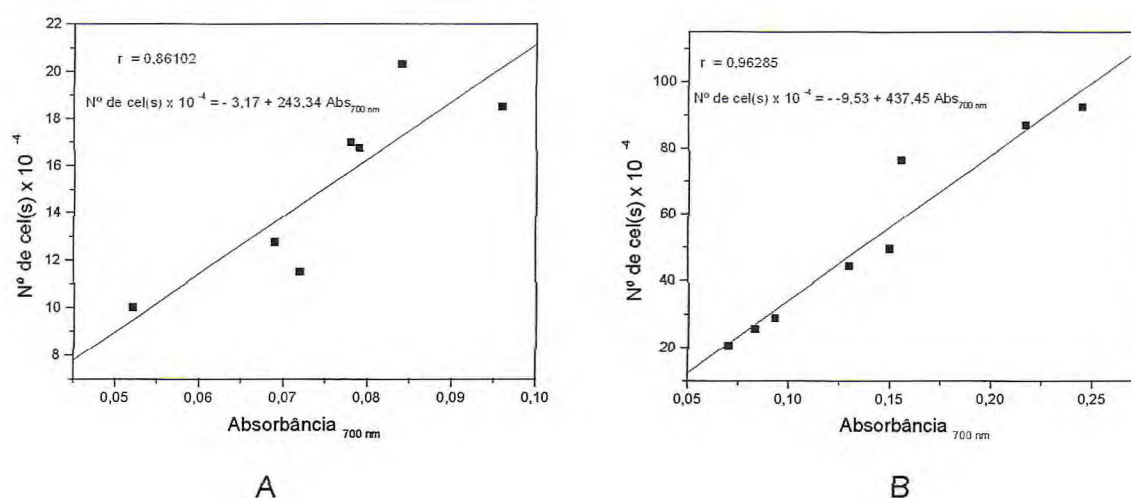


Figura 3: Correlação linear entre a absorbância a 700 nm e o número de cel(s).mL⁻¹ de *T. fluviatilis*, cultivadas em meio Guilard com 0,051 (A) e 0,025 g.L⁻¹ de silicato de sódio (B).

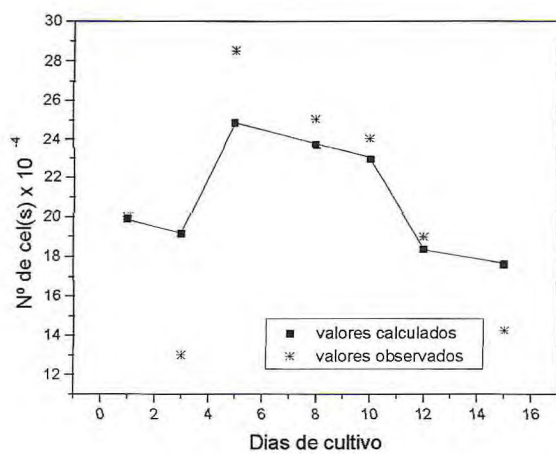
3.2. Curvas de crescimento da microalga *T. fluviatilis* cultivadas em meio Conway e Guilard f/2.

Segundo ROCHA (2001), a curva de crescimento de microalgas é expressa como o incremento da biomassa ou do número de organismos (densidade celular) no tempo. Em um cultivo do tipo “batch” ou estacionário, este crescimento pode

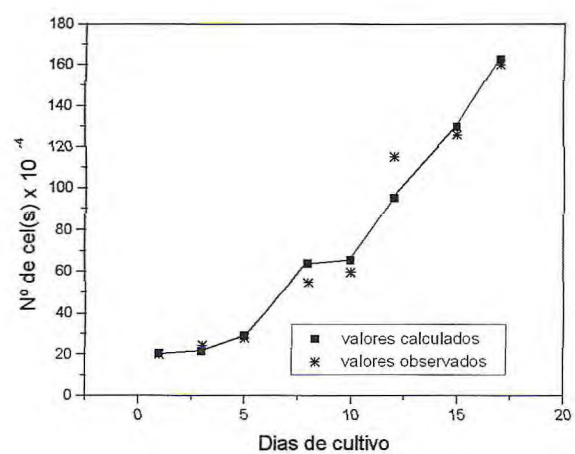
apresentar cinco fases ou etapas distintas. A 1ª fase, conhecida como fase de indução ou fase lag, ocorre logo após o início do cultivo (repicagem) e, praticamente, não existe um incremento líquido na população devido à adaptação das células algais às novas condições de cultivo. A 2ª fase é chamada de exponencial ou fase log, na qual a biomassa se duplica, sucessivamente, em intervalos regulares de tempo. Com a continuação do cultivo, o tempo requerido para a duplicação celular aumenta, reduzindo assim a taxa de crescimento, sendo esta fase denominada de diminuição do crescimento relativo. Isto é consequência da diminuição da concentração de nutrientes no meio, do aumento da concentração metabólitos e da redução da atividade fotossintética por incremento da densidade populacional, a qual diminui a disponibilidade de luz por unidade de célula (autosombreamento). Na 4ª fase de cultivo, não há incremento da população e a taxa de crescimento está compensada pela taxa de mortalidade celular (fase estacionária), devido a maior influência dos fatores acima mencionados. Finalmente, a cultura entra na fase de senescência ou morte, resultado da depleção de nutrientes a um nível que não suporta mais o crescimento e ocorrência de um nível tóxico de metabólitos. A taxa de mortalidade supera a de crescimento e a lise das células favorece a contaminação microbiana.

As curvas de crescimento da microalga *T. fluviatilis*, em meio Conway (Figura 2) e Guillard f/2 (Figura 3), foram obtidas a partir das equações de regressão linear entre os valores de absorbância a 700 nm e o número de cel(s).mL⁻¹.

Como podemos observar, os cultivos realizados em elevadas concentrações de silicato de sódio resultaram em um péssimo desempenho das microalgas. Ambos os cultivos apresentaram uma rápida fase de indução (1º ao 3º dia), caracterizada por uma redução do crescimento líquido da população (Figuras 4A e 5A), seguido de um ligeiro crescimento exponencial que durou, no máximo, até o 8º dia de cultivo, no caso do meio Guillard e, no meio Conway, apenas até o 4º dia.



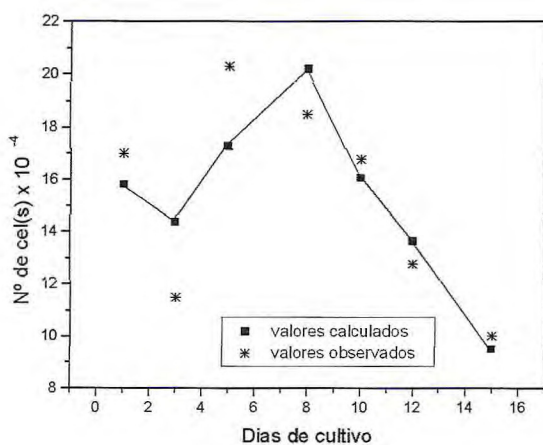
A



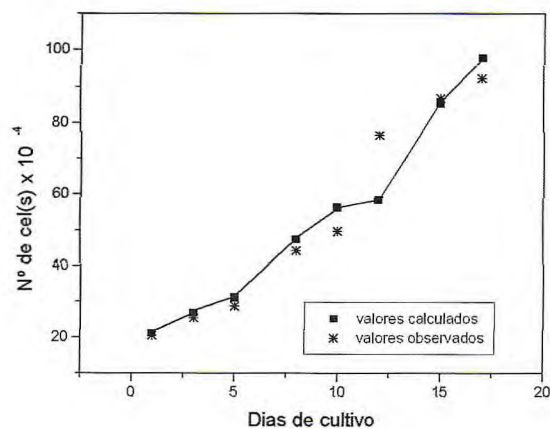
B

Figura 4: Curvas de crescimento de *T. fluviatilis*, cultivadas em meio Conway com 0,051 (A) e 0,025 g.L⁻¹ de silicato de sódio (B).

Já, quando a concentração de silicato de sódio foi reduzida pela metade (Figuras 4B e 5B), as microalgas apresentaram as melhores taxas de crescimento.



A



B

Figura 5: Curvas de crescimento de *T. fluviatilis*, cultivadas em meio Guilard F/2 com 0,051 (A) e 0,025 g.L⁻¹ de silicato de sódio (B).

As curvas de crescimento apresentaram uma fase de indução um pouco mais longa (1° ao 5° dia), mas sem redução da densidade celular. Em seguida, ambos os cultivos experimentaram um ligeiro crescimento exponencial, o qual foi interrompido, provavelmente, devido às quedas de energia e/ou variações de temperatura, o que resultou em uma nova fase de indução, a partir do 8° dia de ambos os cultivos. No entanto, esta fase foi mais curta em meio Conway (até o 11° dia) do que no meio Guilard (até o 13° dia), mostrando, no primeiro, uma melhor capacidade de re-adaptação das células. Em seguida, ambos os cultivos voltaram a entrar em fase exponencial de crescimento, sendo mais curta (até o 15° dia) no meio Guilard e, no caso do meio Conway (Figura 4B), a fase de exponencial se prolongou até o final do experimento (17° dia), resultando na maior densidade celular obtida em todo o cultivo. Ao contrário, no caso do meio Guilard (Figura 5B), o cultivo entrou na fase de diminuição do crescimento relativo a partir do 15° dia e, no final do experimento, apresentou uma menor densidade celular (Figura 5B).

Em um cultivo do tipo "Batch" com a microalga cianofícea *S. platensis* realizado nas mesmas condições físico-químicas do presente trabalho, foi possível observar uma nítida fase de indução, com diminuição da densidade celular, que durou do início até o 3° dia do cultivo. A partir deste ponto, o cultivo entrou em crescimento exponencial, o qual se prolongou até o 15° dia (Da SILVA, 2004). SOARES (2005), também trabalhando nas mesmas condições, mostrou que o cultivo de *H. pluvialis* apresentou uma fase de indução até o 4° dia do início da cultura, sem mortalidade celular, seguidos de 10 dias de crescimento exponencial. OLIVEIRA (2007) cultivou a microalga *Dunaliella* sp., a qual apresentou fase de indução até o 3° dia de cultivo, seguido de um crescimento exponencial até o 5° dia. Neste caso, a cultura passou, ainda, por uma nítida fase de diminuição do crescimento relativo (até o 7° dia de cultivo) e, posteriormente, para a fase estacionária.

3.3. Curvas de crescimento da microalga *T. fluviatilis* cultivadas em meio Conway e Guilard f/2, expressas em valores de absorbância a 700 nm.

Os valores de absorbância também foram utilizados para a construção das curvas de crescimento de *T. fluviatilis* em ambos os meios que apresentaram os melhores resultados (Figuras 6 A e B).

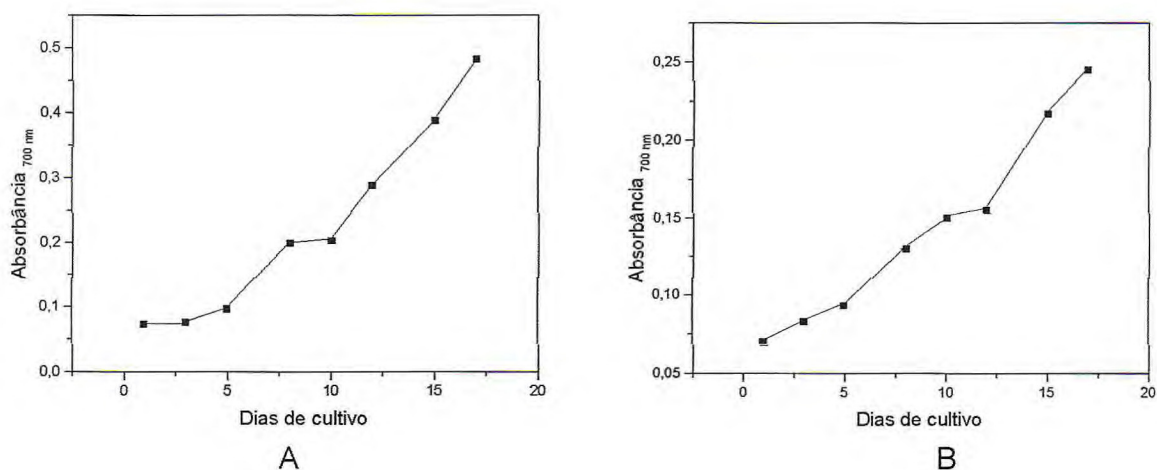


Figura 6: Curvas de crescimento da microalga *T. fluviatilis* em meios de cultivo Conway e Guilard com $0,025\text{g.L}^{-1}$ de silicato de sódio, expressa em valores de absorbância a 700nm.

Como podemos observar, é claramente possível identificar todas as fases discutidas anteriormente no item 3.2, devido aos elevados índices de correlação linear. Desta forma, o monitoramento de futuros cultivos, realizados nas mesmas condições físico-químicas, pode ser realizado de uma maneira simples e segura, através do acompanhamento dos valores de absorbância a 700 nm, facilitando a identificação do momento certo de adição de novo meio ou de finalização do cultivo para a obtenção da biomassa algal.

Nos cultivos Conway e Guillard com $0,051\text{g silicato de sódio.L}^{-1}$ evidenciou-se que as microalgas depois de um certo período de cultivo apresentavam-se despigmentadas, mas os três apresentaram uma característica que não se fez presente no Conway a $0,025\text{ g silicato de sódio.L}^{-1}$, que foi a alta formação de precipitado no recipiente.

Os resultados obtidos no presente trabalho contribuirão para o aprimoramento das etapas de cultivo de microalgas diatomáceas assim como no desenvolvimento de novas pesquisas relacionadas a larvicultura de camarão marinho, podendo influenciar nos custos de produção devido à redução nas *quantidades de silicato de sódio*.

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que a microalga *Thalassiosira fluviatilis* obteve melhores desenvolvimentos em meio Conway e Guilard, com teores de sílica de $0,025\text{g.L}^{-1}$, principalmente no primeiro caso, quando atingiu a maior densidade celular e melhor coloração. A duplicação na concentração de silicato de sódio resultou em um desenvolvimento bem aquém do esperado, com o elevado teor de sílica inibindo o desenvolvimento das microalgas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUTTERWICK, C.; HEANEY, S.I.; TALLING, J.F. Diversity in the influence of temperature on the growth rates of freshwater algae, and its ecological relevance. **Freshwater Biology**, Oxford, v.50, n.2, p.291-300, Feb 2005.

COLES, J.F.; JONES, R.C. Effect of temperature on photosynthesis-light response and growth of four phytoplankton species isolated from a tidal freshwater river. **Journal of Phycology**, Lawrence, v.36, n.1, p.7-16, Feb 2000.

DA SILVA, C. F. **Cultivo e extração de polissacarídeos sulfatados da microalga *Spirulina platensis***. Monografia de Graduação apresentada ao Departamento de Engenharia de Pesca da UFC, 2004.

DERNER, R. B. **Cultivo de microalgas. In: Produção de camarão marinho**. Florianópolis: UFSC, 1996. p.64-75.

EKER-DEVELI, E.; KIDEYS, A.E.; TUGRUL, S. Effect of nutrients on culture dynamics of marine phytoplankton. **Aquatic Sciences**, Basel, v.68, n.1, p.28-39, Jan 2006.

FONSECA, V. G.; KLEIN, V. L. M. **Estudo sobre a composição do plâncton no estuário do rio Jaguaribe (Ceará-Brasil)**. Arquivos de Ciências do Mar, Fortaleza, v.16, n1, p. 1-8, 1976.

GARCIA M.C.C.; MIRON, A.S.; SENILLA, J.M.F.; GRIMA, E.M.; CAMACHO, F.G. Mixotrophic growth of the microalga *Phaeodactylum tricornutum* – Influence of different nitrogen and organic carbon sources on productivity and biomass composition. **Process Biochemistry**, Oxford, v.40, n.1, p.297-305, Jan 2005.

GOKSAN, T.; DURMAZ, Y.; GOKPINAR, S. Effects of light path lengths and initial culture density on the cultivation of *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1988). **Aquaculture**, Amsterdam, v.217, n.1-4, p.431-436, Mar 2003.

GRIGORSZKY, I.; KISS, K.T.; BERES, V.; BACSI, I.; M-HAMVAS, M.; MATHE, C.; VASAS, G.; PADISAK, J.; BORICS, G.; GLIGORA, M.; BORBELY, G. The effect of temperature, nitrogen, and phosphorus on the encystment of *Peridinium cinctum*, Stein (Dinophyta). **Hydrobiologia**, Dordrecht, v.563, p.527-535, Jun 2006.

ILYASHI, L.V.; ZAPARA, E.V. Competition of two marine diatom algae for urea and nitrate nitrogen under three levels of irradiance. **Zhurnal Obshchei Biologii**, Moscow, v.67, n.6, p.464-675, Nov-Dec 2006.

LI, M.; GONG, R.M.; RAO, X.J.; LIU, Z.L.; WANG X.M. Effects of nitrate concentration on growth and fatty acid composition of the marine microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae). **Annals of Microbiology**, Milan, v.55, n.1, p.51-55, 2005.

KHOI, C.M.; GUONG, V.T.; MERCKX, R. Growth of the diatom *Chaetoceros calcitrans* in sediment extracts from *Artemia franciscana* ponds at different concentrations of nitrogen and phosphorus. **Aquaculture**, Amsterdam, v.259, n.1-4, p.354-364, Sep 2006.

NISHIKAWA, T.; HORI, Y. Effect of nitrogen, phosphorus and silicon on the growth of the diatom *Eucampia zodiacus* caused bleaching of seaweed *Phopyra isolated* from Harima-Nada, Seto Island, Japan. **Nippon Suisan Gakkaishi**, Tokyo, v.70, n.1, p.31-38, Jan 2004.

NISHIKAWA, T.; MIYAHARA, K.; NAGAI, S. Effects of temperature and salinity on the growth of the giant diatom *Coscinodiscus wailesii* isolated from Harima-Nada, Seto Island, Japan. **Nippon Suisan Gakkaishi**, Tokyo, v.66, n.6. p.993-998, Nov 2000.

OLIVEIRA, M. A. C. **Cultivo da microalga *Dunaliella sp.* em laboratório. Extração e purificação de polissacarídeos sulfatados.** Monografia de Graduação apresentada ao Departamento de Engenharia de Pesca da UFC, 2007.

PENNA, A.; MAGNANI, M.; FENOGLIO, I.; FUBINI, B.; CERRANO, C.; GIOVINE, M.; BAVESTRELLO, G. Marine diatom growth on different forms of particule sílica: evidence of cell/ particule interaction. **Aquatic Microbial Ecology**, Luhe, v.32, n.3, p.299-306, Jul 2004.

ROCHA, O.; TAVARES, L. H. S. **Produção de plâncton (fitoplâncton de zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos.** Ed. Rima, São Paulo, 2001.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos.** Ed. Rima, 1º edição, v.1, c.4, p.32-37, São Carlos 2001.

SOARES, N. N. **Cultivo e extração de pigmentos das microalgas *Spirulina platensis* e *Haematococcus pluvialis*.** Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, 2005.

SOBCZUK, T.M.; CAMACHO, F.G.; GRIMA, E.M.; CHISTI, I. Effect of agitation on the microalgae *Phaeodactylum tricorutum* and *Porphyridium cruentum*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, New York, v.28, n.4, p.243-250, Mar 2006.

TAKABAYASHI, M.; LEW, K.; JOHNSON, A.; MARCHI, A.; DUGDALE, R.; WILKERSON, F.P. The effect of nutrient availability and temperature on chain length of the diatom, *Skeletonema costatum*. **Journal of Plankton Research**, Oxford, v.28, n.9, p.831-840, Sep 2006.

TROBAJO, R.; COX, E.J.; QUINTANA, X.D. The effects of environmental variables on the morphology of *Nitzschia frustulum* (Bacillariophyta), in relation its use as a bioindicator. **Nova Hedwigia**, Stuttgart, v.79, n.3-4, p.433-445, Nov 2004.