

REVISTA AIDIS

de Ingeniería y Ciencias Ambientales:
Investigación, desarrollo y práctica.

EFEITOS DA VARIAÇÃO DE SÍLICA NO DESENVOLVIMENTO DA MICROALGA DIATOMÁCEA *Thalassiosira fluviatilis*

*Renato Teixeira Moreira¹
Francisco Farley Vasconcelos de Sousa¹
José Reges da Silva Lobão¹
Leonardo Galvão de Freitas Albuquerque¹
Wladimir Ronald Lobo Farias¹

*EFFECT OF SILICA CHANGES IN THE DEVELOPMENT OF
DIATOMACEOUS MICROALGAE Thalassiosira fluviatilis*

Recibido el 8 de septiembre de 2013; Aceptado el 30 de marzo de 2014

Abstract

Microalgae are important to the environment because they constitute an important link in the aquatic food chain and can still be used as bioindicators of water quality and regulators of nutrients level in the water column. This study aimed to evaluate the development of diatom microalgae *Thalassiosira fluviatilis* in culture media Conway and Guillard f / 2, with different concentrations of sodium silicate and its influence on cultures of diatoms. The cultures were monitored by direct cell counts in a Neubauer chamber and the culture absorbance at 700 nm using a spectrophotometer. The best result was obtained with the Conway medium, using a low concentration of sodium silicate, followed by the Guillard medium, with the same silicate concentration. The cultures performed with twice the concentration of sodium silicate, showed a very short and lethargic development, resulting in excessive formation of precipitated material and depigmented cells, leading to the death of cultures. Thus, high concentrations of sodium silicate inhibit algal growth in cultures of *T. fluviatilis*.

Keywords: diatoms, sodium silicate, *Thalassiosira fluviatilis*.

¹ Universidade Federal do Ceará, Brasil

*Autor correspondente: Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Bloco 827, Avenida Humberto Monte S/N, Campus do Pici. Fortaleza-Ce. CEP – 60451970, Brasil. Email: renatoteixeiram@yahoo.com.br

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 reguladores dos 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 Guillard f/2, com diferentes concentrações de silicato de sódio e observar a influência da sílica sobre culturas de diatomáceas. 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 a concentração de 0.025 g.L⁻¹ de silicato de sódio, seguido do meio Guillard na mesma concentração de silicato. Quando os cultivos foram realizados com o dobro da concentração (0.051 g.L⁻¹) 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*.

Palavras-chave: diatomácea, silicato de sódio, *Thalassiosira fluviatilis*.

Introdução

As microalgas não são somente importantes na aquicultura como fonte de alimento, mas também podem auxiliar na manutenção da qualidade de água, pois tem um papel funcional no balanço do oxigênio, do dióxido de carbono e dos compostos nitrogenados, sobretudo a amônia (Derner, 1996). Além disso, podem também ser utilizadas como bioindicadores, ajudando a dar informações sobre o nível de eutrofização de corpos d'água. 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. A luz e a concentração de nutrientes são fatores que influenciam no crescimento das algas. A intensidade luminosa 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 e Rocha, 2001) e influencia diretamente no cultivo de microalgas. Ilyashi e 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. Uma escassez de nutrientes no meio de cultivo também pode causar danos ao crescimento das microalgas.

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, estatósoros 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).

As microalgas da espécie *Thalassiosira fluviatilis* são eucarióticas, pertencem à divisão Bacillariophyta (diatomáceas) e apresentam, como pigmentos principais, as clorofilas a, c_1 e c_2 , 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 padrão para microlagas, Conway e Guillard f/2, utilizando duas diferentes concentrações de silicato de sódio e determinar a influência da sílica sobre o desenvolvimento das culturas de microalgas diatomáceas.

Material e métodos

Obtenção da microalga *Thalassiosira fluviatilis* e meios de cultivo

As cepas da microalga *Thalassiosira fluviatilis*, utilizadas neste estudo, foram obtidas no cepário do laboratório de Planctologia do Departamento de Engenharia de Pesca da UFC. Neste trabalho foram utilizados dois meios de cultivo padrões para o cultivo de microalgas, o Guillard f/2 (Guillard, 1975) e o Conway (Walne, 1966), com variações nas concentrações de silicato de sódio de 0.051 g.L^{-1} e 0.025 g.L^{-1} , para determinar a influência desta sobre culturas de diatomáceas.

Início dos cultivos

O tipo de cultivo utilizado neste experimento foi o tipo estacionário, que consiste na transferência das culturas para volumes crescentes de meio. Para isso, a cepa inicial 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 o crescimento, as culturas foram transferidas para erlenmeyers de 250 mL, os quais passaram pelo mesmo procedimento de acréscimo de meio de cultivo até atingirem um volume de 200 mL. Finalmente, as culturas nos erlenmeyers foram repicadas para potes de vidro com volume útil de 3L.

Condições abióticas

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 $24 \pm 2^\circ\text{C}$.

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 cultivos para leitura da absorbância a 700nm e, posteriormente, realizada a contagem do número de células. Antes do preenchimento da câmara de Neubauer, foram adicionadas duas gotas da solução de formol com bórax, para fixação das células. A contagem foi realizada em um microscópio (marca Olimpikus) com contraste de fase, sendo contadas todas as células dentro dos quatro quadrados maiores da câmara. O cálculo do n° de células. mL⁻¹ foi realizado através da equação 1.

$$N^\circ \text{ de células} = [n^\circ \text{ de células} / 4] \cdot 10^4$$

Equação (1)

Resultados e discussão

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

Segundo Rocha e Tavares (2001), a curva de crescimento de microalgas é expressa como o incremento da biomassa ou do número de organismos (densidade celular) em determinado tempo. Em um cultivo do tipo 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 à 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 e Guilard f/2, 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. É possível observar que 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 até o terceiro dia, caracterizada por uma redução do crescimento líquido da população (Figuras 1A e 2A), seguido de um ligeiro crescimento exponencial que até o oitavo dia de cultivo, no caso do meio Guilard e, no meio Conway, apenas até o quarto dia.

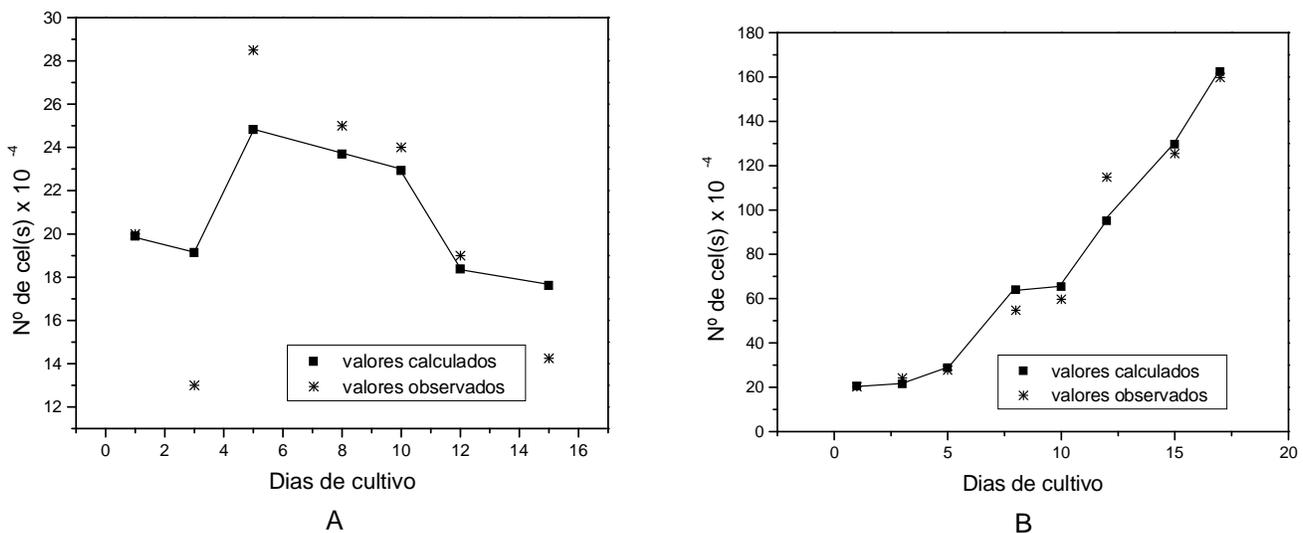


Figura 1. Curvas de crescimento de *T. fluviatilis*, cultivadas em meio Conway com 0.051 (A) e 0.025 g.L⁻¹ de silicato de sódio (B)

Já, quando a concentração de silicato de sódio foi reduzida para 0.025 g.L^{-1} , ou seja, pela metade (Figuras 1B e 2B), as microalgas apresentaram as melhores taxas de crescimento.

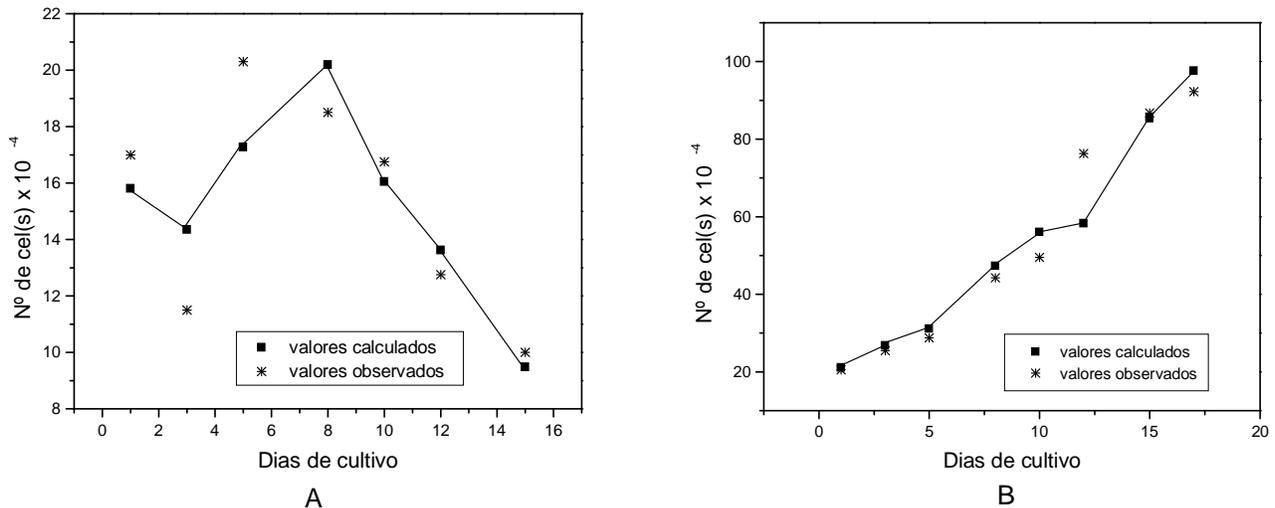


Figura 2. Curvas de crescimento de *T. fluviatilis*, cultivadas em meio Guilard F/2 com 0.051 (A) e 0.025 g.L^{-1} de silicato de sódio (B)

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 tiveram um ligeiro crescimento exponencial, o qual foi interrompido, provavelmente. 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 1B), 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 2B), 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 2B).

Em um cultivo do tipo “Batch” com a microalga cianofícea *Spirulina 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 *Haematococcus pluvialis* apresentou uma fase de indução até o 4º 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 3º dia de cultivo, seguido de um crescimento exponencial até o 5º dia. Neste caso, a cultura passou, ainda, por uma nítida fase de diminuição do crescimento relativo (até o 7º dia de cultivo) e, posteriormente, para a fase estacionária.

Nos cultivos Conway e Guillard com 0.051g silicato de sódio.L⁻¹ evidenciou-se que as microalgas depois de um certo período de cultivo apresentavam-se despigmentadas, mas três das culturas apresentaram uma característica que não se fez presente na cultura da microalga no meio Conway a 0.025 g silicato de sódio.L⁻¹, que foi a alta formação de precipitado no recipiente.

Conclusões

O meio Conway com teores de sílica de 0.025g.L⁻¹, apresentou-se mais propício ao desenvolvimento das culturas, uma vez que atingiu a maior densidade celular e melhor coloração;

Ao duplicar-se a concentração de silicato de sódio resultou em um desenvolvimento aquém do esperado, com o elevado teor de sílica inibindo o desenvolvimento das microalgas em ambos os meios de cultura.

Os resultados obtidos no presente trabalho contribuirão para o aprimoramento das etapas de cultivo de microalgas, principalmente as diatomáceas, assim como no desenvolvimento de novas pesquisas relacionadas à observação de indicadores de desenvolvimento biológico, e da influência direta da flutuação dos compostos dissolvidos na água, uma vez que as microalgas se apresentam extremamente dependente de suas concentrações no ambiente.

Bibliografia

- Da Silva, C. F. (2004) Cultivo e extração de polissacarídeos sulfatados da microalga *Spirulina platensis*, *Monografia de Graduação apresentada ao Departamento de Engenharia de Pesca da UFC*.
- Derner, R. B. (1996) Cultivo de microalgas. In: *Produção de camarão marinho*, Florianópolis, UFSC, 64-75.
- Guillard, R. R. L. (1975) Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In *Culture of marine invertebrate animal* (Smith, W. L.; Chanley, M. H. Ed.) Plenum Publishing, New York, 29-60.
- Grigorszky, I., Kiss, K.T., Beres, V., Bacsi, I., M-hamvas, M., Mathe, C., Vasas, G., Padisak, J., Borics, G., Gligora, M., Borbely, G. (2006) The effect of temperature, nitrogen, and phosphorus on the encystment of *Peridinium cinctum*, Stein (Dinophyta), *Hydrobiologia*, **563**, 527-535.
- Ilyashi, L.V.; Zapara, E.V. (2006) Competition of two marine diatom algae for urea and nitrate nitrogen under three levels of irradiance, *Zhurnal Obshchei Biologii (Journal of General Biology)*, **67**(6), 464-675.

- Oliveira, M. A. C. (2007) 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.*
- Rocha, O., Tavares, L. H. S. (2001) *Produção de plâncton (fitoplâncton de zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos.* Ed. Rima, São Paulo, 2001.
- Sipaúba-Tavares, L., Rocha, O. (2001) *Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquático,* 1º ed, Ed. Rima, São Carlos, **1**(4), 32-37.
- Soares, N. N. (2005) 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.*
- Trobajo, R., Cox, E.J and Quintana, X.D. (2004) The effects of environmental variables on the morphology of *Nitzschia frustulum* (Bacillariophyta) in relation its use as a bioindicator, *Nova Hedwigia*, **79**(3-4), 433-445.
- Walne, P. R. (1966) Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis.* *Fishery Investigations*, **2**(25), 1-53.