



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - BACHAREL

**Bioprospecção de microalgas dulcícolas para ensaios  
ecotoxicológicos**

Autor (a): Igor Gabriel Silva Oliveira  
Orientador: Prof. Dr. Emerson Machado de Carvalho

Dourados - MS  
2018



IGOR GABRIEL SILVA OLIVEIRA

**Bioprospecção de microalgas dulcícolas para ensaios ecotoxicológicos**

“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, sob orientação do Prof. Dr. Emerson Machado de Carvalho.”

Dourados - MS  
2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

O48b Oliveira, Igor Gabriel Silva  
Bioprospecção de microalgas dulcícolas para ensaios ecotoxicológicos / Igor Gabriel Silva Oliveira -- Dourados: UFGD, 2018.  
61f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Emerson Machado de Carvalho  
Co-orientadora: Nathaskia Silva Pereira

TCC (Graduação em Biotecnologia)-Universidade Federal da Grande Dourados  
Inclui bibliografia

1. Biotecnologia ambiental. 2. Isolamento. 3. Quantificação. 4. Ecotoxicologia. 5. Chlorophyceae. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.**

Igor Gabriel Silva Oliveira

## **Bioprospecção de microalgas dulcícolas para ensaios ecotoxicológicos**

Trabalho de conclusão de curso apresentado a Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais  
para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovado em: 23/11/2018

### **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Emerson Machado de Carvalho  
Universidade Federal da Grande Dourados

---

Me. Nathaskia Silva Pereira  
Universidade Federal da Grande Dourados

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana Lara Menegazo  
Universidade Federal da Grande Dourados

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maricy Raquel Lindenbah Bonfá  
Universidade Federal da Grande Dourados

Dourados, Dezembro de 2018



## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente ao meu orientador Emerson que não só me aceitou em seu grupo como também teve paciência comigo desde o primeiro ano da graduação me ensinando e me guiando nesse caminho, juntamente com minhas coorientadoras Nathaskia e Mônica que foram extremamente pacientes e presentes em cada etapa deste trabalho, de meus veteranos Carol e 'Cláudio', e da Larissa que foi minha parceira de crime desde o princípio.

Agradeço ao Murilo, à Nathaly, Letícia, Sany e Zahler pela amizade cultivada durante o curso e por todos os momentos que passamos, que nem sempre foram fáceis, por todas as horas de descontração, conversas fiadas e aos estresses que passamos, enfim não precisaremos fazer mais trabalhos em grupo. Vocês deixarão saudades e boas lembranças.

Agradeço também à minha amiga Carol, começamos nossa jornada a partir de pontos distantes, porém estivemos juntos por estes quatro anos, nos vendo todos os dias, sofrendo com provas, marcando roles que nem sempre aconteciam, curtindo cada momento, juntos; vimos o crescer um do outro, passo a passo. Aprendemos, compartilhamos, crescemos e vivenciamos muito juntos, esse laço que a biotecnologia criou será levado para toda a vida, pois você é a irmã que a UFGD me proporcionou.

Agradeço todas as pequenas e grandes participações que me ensinaram e me ajudaram a chegar até aqui, que me ajudaram a me tornar o que sou hoje.

Agradeço ainda, ao meu companheiro de todas as horas, Vanildo, que teve paciência comigo e me ouviu reclamar constantemente, que me acalmou e em momentos de estresse, ansiedade e preocupação, que me apoiou e me ajudou em diversas situações e decisões, nos momentos bons e ruins, com quem aprendi muito e com quem vivi momentos inesquecíveis, você tornou essa época da minha vida muito mais especial pela sua simples presença. Você é um dos grandes presentes que a UFGD me proporcionou e por isso serei sempre grato.

Gostaria de agradecer por último aos meus pais, que foram os primeiros professores, meus primeiros exemplos e os primeiros pilares para o futuro.

Me deram confiança no primeiro dia de aula, e não digo só da graduação, mas desde a época em que elogiavam meus rabiscos sem sentido na infância e continuaram me dando confiança em seguir em busca dos meus sonhos em um novo estado e cidade. Muitas vezes, adiaram ou até desistiram de seus próprios sonhos, para que os meus pudessem se tornar realidade. Entregaram-se de corpo e alma, sem esperar nada em troca.

É por isso que hoje agradeço de todo o coração e dedico a vocês, meu amado pai Vandevaldo, e minha amada mãe Elizabeth a conclusão dessa fase de minha vida. Sou eu que apresento este trabalho, contudo, a felicidade de hoje também é de vocês, porque foram o amor, o carinho e o estímulo de vocês, as ferramentas dessa vitória tão importante para mim. Encerro mais uma vez então com as palavras de Rui Barbosa:

*”Se um dia, já homem feito e realizado, sentires que a terra cede a teus pés, que tuas obras desmoronam, que não há ninguém à tua volta para te estender a mão, esquece tua maturidade, passa pela tua mocidade, volta à tua infância e balbucia, entre lágrimas e esperanças, as últimas palavras que sempre te restarão na alma: minha mãe, meu pai”.*

*Desistir...*

*eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério;  
é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas,  
mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros,  
mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.*

*Cora Coralina*



## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	11
<b>Biologia das Microalgas.....</b>	<b>11</b>
<b>Isolamento de Microalgas.....</b>	<b>12</b>
<b>Sistemas de Produção de Biomassa Algal.....</b>	<b>12</b>
<b>Interesses e aplicações.....</b>	<b>13</b>
Capítulo I - Isolamento e cultivo de microalgas selvagens de tanques de piscicultura.....	19
<b>Resumo.....</b>	<b>19</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>2. METODOLOGIA.....</b>	<b>22</b>
2.1 Isolamento das microalgas.....	22
2.2 Identificação das microalgas.....	23
2.3 Manutenção das microalgas.....	23
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>23</b>
3.1 Micromanipulação.....	23
3.2 Diluição Seriada.....	25
3.3 Inoculação em placa de ágar.....	27
3.4 Envelhecimento.....	28
3.5 Microalgas Isoladas e Potencial Biotecnológico.....	30
3.5.1 <i>Chlorella</i> sp.....	30
3.5.2 <i>Closterium acerosum</i> .....	30
3.5.3 <i>Drepanochloris uherkovichii</i> .....	31
3.5.4 <i>Microcystis wesenbergii</i> .....	31
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>31</b>
Capítulo II - Análise da relação funcional entre as variáveis de quantificação celular da microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> (Chlorophyceae).....	35
<b>Resumo.....</b>	<b>35</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>36</b>
<b>2. METODOLOGIA.....</b>	<b>37</b>
2.1 Quantificação em câmara de Neubauer.....	38
2.2 Quantificação em espectrofotometria.....	38
2.3 Quantificação da biomassa.....	38
2.4 Análise dos dados.....	38
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>44</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>
Capítulo III - Efeito tóxico da salinidade no cultivo da microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> (Chlorophyceae).....	47
<b>Resumo.....</b>	<b>47</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>2. METODOLOGIA.....</b>	<b>49</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>52</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>53</b>
Capítulo IV - Sensibilidade da microalga <i>Chlorella sorokiniana</i> ao inseticida fipronil.....	54

<b>Resumo.....</b>	<b>54</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>2. METODOLOGIA.....</b>	<b>56</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>58</b>
<b>5. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I - Isolamento e cultivo de microalgas selvagens de tanques de piscicultura

**Figura 1** - Preparo do microcapilar a partir da pipeta de Pasteur. a) A extremidade da pipeta é aquecida até que adquira certa maleabilidade. b) A pipeta é retirada da chama e afilada com uma pinça até que se tenha uma extremidade suficientemente fina. c) A extremidade da pipeta de Pasteur é cuidadosamente retirada para que se tenha uma ponta fina e regular..... 24

**Figura 2** - Esquema de diluição seriada, no qual inicia-se com uma amostra concentrada que é submetida à diluições em série que aumentam rapidamente o fator de diluição..... 26

**Figura 3** - Detalhe das microalgas, da cianofíceas a) e b) *Microcystis wesenbergii* e da microalga c) e d) *Chlorella* sp.; e das microalgas e) *Drepanochloris uherkovichii*; f) *Closterium acerosum*..... 26

**Figura 4** - Esquema de inoculação em placa de ágar, em que uma pequena fração da amostra é inoculada na placa pela técnica de *spread plate*, distribuindo-se a alíquota sobre toda a placa, a placa é então acondicionada em uma incubadora e após o crescimento das coloniais, é feito o repique, coletando-se parte das colonias monoalgais e inoculando em uma nova placa de ágar..... 28

**Figura 5** - Esquema de envelhecimento, onde ocorre a substituição da biodiversidade por densidade microalgal ao decorrer do tempo ..... 29

**Figura 6** - Detalhe da formação de biofilme na parede do frasco de cultivo durante a técnica de envelhecimento ..... 30

### Capítulo II - Análise da relação funcional entre as variáveis de quantificação da microalga *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae)

**Figura 1** - Padrão de absorção de luz para as diluições com *Chlorella sorokiniana* rastreada entre 200 e 800 nm ..... 40

**Figura 2** - Correlação entre as variáveis: A) densidade óptica (absorbância 670nm) x densidade celular ( $n^{\circ}$  células x  $10^5$  m L<sup>-1</sup>); B) densidade celular x densidade óptica; C) biomassa seca (g. L<sup>-1</sup>) x densidade celular; D) densidade celular x biomassa seca; E) densidade óptica x biomassa seca; F) biomassa seca x densidade óptica..... 41

### Capítulo IV - Sensibilidade da microalga *Chlorella sorokiniana* ao inseticida Fipronil

**Figura 1** - Médias ( $\pm$  erro padrão) da densidade, crescimento específico máximo e percentual de inibição de duplicação celular da microalga *C. sorokiniana* cultivadas em diferentes concentrações de fipronil..... 58

## LISTA DE TABELAS

Revisão Bibliográfica

**Tabela 1** - Plantas oleaginosas utilizadas na produção de biodiesel ..... **14**

Capítulo III - Efeito tóxico da salinidade no cultivo da microalga *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae)

**Tabela 1** - Médias ( $\pm$  desvio padrão) da densidade celular (número de células  $\times 10^5$ . mL<sup>-1</sup>), taxa de duplicação celular (%.dia<sup>-1</sup>) e percentual de inibição de duplicação (%) da microalga *C. sorokiniana* para cada concentração de salinidade e controle (Ct) ..... **51**

# INTRODUÇÃO GERAL

## Biologia das Microalgas

Na ficologia, microalga é um termo vasto, sem valor taxonômico, que abrange todos os organismos unicelulares fotossintetizantes, cujo pigmento fotossintético principal é a clorofila *a* (AISHVARYA, 2015; RICHMOND, 2008). Estes organismos podem apresentar estrutura celular procarionte ou eucarionte.

As microalgas são microrganismos com baixa ou nenhuma diferenciação celular, mas com elevada capacidade fotossintética e necessidades físico-químicas simples. Elas apresentam alta taxa de crescimento celular, sendo um dos poucos organismos conhecidos que realizam fotossíntese e produção de hidrogênio (MUTANDA, 2011; PARMAR, 2011).

Estes organismos possuem estruturas basicamente citológicas, convertendo energia sem qualquer desenvolvimento estrutural além das células (ausência de folhas, raízes ou hastes). São seres de vida livre, contudo podem ser encontradas em forma simbiótica com diferentes tipos de organismos, como é o caso dos líquens, em que vive em simbiose com fungos (BRENNAN; OWENDE, 2010; FALKOWSKI, 2013; HIGGINS, 2016; HÄUBNER, 2006).

As microalgas podem crescer em regiões de baixa produtividade, como solos salinizados, áreas com deficiência de água doce e condições climáticas extremas, já que possuem características adaptativas a ambientes salobros (MATOSI, 2015) ou marinhos, o que não acontece com as plantas convencionalmente cultivadas.

Apesar de sua simplicidade, são os organismos fotossintetizantes com maior velocidade em crescimento celular, superando o crescimento de plantas superiores, podendo produzir uma tonelada de biomassa para duas toneladas de dióxido de carbono consumido (MALLICK et al., 2012).

As plantas terrestres possuem uma baixa eficiência na captura de energia solar, sendo que a *Panicum virgatum*, a cultura terrestre com maior taxa de crescimento, pode converter energia solar em energia de biomassa a uma razão inferior a 0,5 % (LEWIS, 2006; LI, 2008). Já as microalgas podem converter energia solar em biomassa a uma razão que varia de 10-20 % ou superior. Tamiya (1957), por exemplo, obteve uma média de conversão de 20 % para *Chlorella*, enquanto que Pirt et al. (1980) obteve 47 % para o mesmo gênero.

### **Isolamento de Microalgas**

O cultivo de microalgas, quando não se inicia com uma cepa pura, tem como fase inicial e crucial, o isolamento, que é o processo de obtenção de um cultivo puro, somente com a espécie de microalga de interesse, sem a contaminação de outras espécies.

Para um isolamento bem sucedido, é importante, ter bem definido as características ideais da espécie que se visa isolar, tais como temperatura, exigência nutricional, pH, salinidade, demanda de oxigênio, ou peculiaridades tais como, espécies de ambientes polares são sensíveis a aumento da temperatura, espécies costeiras são mais sensíveis à salinidade e temperatura, enquanto que espécies oceânicas exigem maior preocupação quanto a qualidade da água e presença de metais. O conhecimento das exigências de cada espécie é muito relevante, já que o cultivo *in vitro*, nada mais é do que uma mimetização das condições ambientais do meio em que o organismo se origina (THOMPSON, 2006; ERIKSEN, 2008).

Quando se inicia o cultivo com amostras selvagens, é comum a presença de zooplanktons que podem preda as microalgas, assim, é necessário a filtragem da amostra em redes ou filtros que possibilitem a separação de células microalgais de outros microrganismos, ou o uso de antimicrobianos que eliminem tais contaminações (GREYER-BECK, 2008).

Nem sempre é necessário um cultivo axênico, ou seja, um cultivo com uma única espécie, e variedade de organismo, livre de contaminantes. Em alguns casos são utilizados cultivos unialgais, onde só há uma espécie de microalga, mas que possa conter fungos, bactérias ou protozoários, desde que não afete o cultivo (ANDERSEN; KAWACHI, 2005).

Diversas técnicas são utilizadas no isolamento microalgal, a mais utilizada é a micromanipulação por capilar, onde se tenta manipula-lo de forma a se capturar uma célula de interesse e transpo-la para a incubação, outras metodologias como diluição seriada, cultivo em ágar, atomização de células em spray, centrifugação e fototaxia também são utilizadas de acordo com o tipo de microalga a se isolar (ANDERSEN; KAWACHI, 2005).

### **Sistemas de Produção de Biomassa Algal**

Os sistemas de produção de biomassa algal são variados em tamanho, desde poucos mililitros em escala laboratorial até tanques com milhares de litros. Os sistemas são facilmente adaptáveis para diversos níveis operacionais, desde unidades de produção intensiva à sistemas totalmente automatizados, de pequeno ou grande porte, sistemas abertos, como em tanques e lagoas, como já são realizados por décadas com *Chlorella*, *Dunaliella* e *Spirulina*, semi-abertos e fechados, tais como fotobiorreatores tubulares (CARLOZZI, 2000; MOLINA

et al., 2001), fotobiorreatores de placa (DEGEN et al., 2006), fotobiorreatores de coluna (HULATT; THOMAS, 2010), tanques agitados (ERIKSEN et al., 2007) (LOERA-QUEZADA; OLGUÍN, 2010; RICHMOND, 1990; MOLINA *et al.*, 2001) e sistemas de lagoas abertas rasas (BELAY, 1997),

### **Interesses e aplicações**

Estudos e aplicações das microalgas vem sendo realizados nos mais diversos campos, como alimentício, industrial, ambiental, entre outros (DERNER et al. 2006). Porém, apesar dessa gama de aplicações, as microalgas ainda representam um grupo de microrganismos pouco estudado, sob o ponto de vista biotecnológico.

Tradicionalmente a produção de microalgas se limitava a alimentação humana e animal direta ou indiretamente (CHISTI, 2006). Com o aumento do interesse nesses organismos e a caracterização de seus componentes, a gama de utilização das microalgas se tornou muito mais ampla, incluindo produção de cosméticos, pigmentos, antioxidantes, xantofilas, luteína, enzimas de interesse (luciferase, luciferina, superóxido dismutase, fosfoglicerato quinase), polímeros (polissacarídeos, amido), além de esteróis, peptídeos, aminoácidos (BARBOSA, 2003; SKULBERG, 2000) e combustíveis, como biodiesel, bio-hidrogênio, bio-óleo, gás de síntese (LI, 2008), metano (YANG, 2011).

As microalgas despertam grande interesse na biorremediação de águas residuais domésticas e industriais. Por serem capazes de remover e degradar nutrientes que podem causar eutrofização quando descartados diretamente nos rios, contaminantes, metais pesados e possíveis patógenos do meio podem ser incorporadas tanto em grandes sistemas de tratamentos de efluentes (LIM et al., 2010; MUNOZ, 2006) quanto em pequenos sistemas domésticos.

Na indústria alimentícia, as microalgas são de interesse na produção de alimentos funcionais, incorporadas em massas, pães, iogurtes e bebidas, e até mesmo sendo consumidas diretamente como fonte proteica (PULZ; GROSS, 2004). O uso das microalgas pelo ser humano remonta a 2000 anos atrás, quando chineses utilizavam o gênero *Nostoc* e outras cianobactérias como fonte alternativa de alimentação. O consumo de alimentos a base de *Spirulina* spp. entre povos nativos do Chade, na África, e do lago Texcoco, no México são relatados por Richmond (1988). Mas o uso comercial só veio a ganhar destaque nos últimos 50 anos. Não se limitando à alimentação humana, tem sido comumente utilizada na alimentação de peixes, moluscos e outros organismos de interesse econômico.

Frente à situação ambiental que o planeta apresenta, o uso e produção de combustíveis fósseis deveria ser aos poucos substituída pelos combustíveis renováveis, visto que a poluição gerada pelos combustíveis convencionais é extremamente prejudicial. A busca por novas matrizes energéticas alternativas se intensificou a nível mundial.

As microalgas ganharam destaque pela vasta disponibilidade nos mais diversos ambientes, não se limitando a áreas férteis e produtivas, ao contrário de oleaginosas tradicionais (VALDERRAMA et al., 2002; DE-BASHAN et al., 2004). As microalgas possuem alta taxa de duplicação celular e um acúmulo significativo de lipídios, variando de 20-60 % de seu peso seco, podendo ainda alcançar 85 % em condições apropriadas, ultrapassando a capacidade de acúmulo de plantas oleaginosas, como demonstra a tabela 1 (BECKER, 2004; CHISTI, 2007; MUTANDA et al., 2011).

Assim, é uma alternativa para produção de biodiesel, tal como outras formas de biocombustíveis. Possuem elevadas concentrações de proteína e de carboidratos, em forma de amido, glicose, açúcares e outros polissacarídeos e alta digestibilidade, o que as tornam altamente visadas na indústria alimentar tanto humana quanto animal (SPOLAORE et al., 2006).

**Tabela 1.** Plantas oleaginosas utilizadas na produção de biodiesel

Cultura	Rendimento de óleo (L.ha <sup>-1</sup> )	Área necessária (Mha) <sup>c</sup>
Milho	172	1540
Soja	446	592
Canola	1190	223
Coco	2689	99
Óleo de Palma	5959	45
Microalga <sup>a</sup>	136900	2
Microalga <sup>b</sup>	58700	4,5

<sup>a</sup> 70 % óleo (por massa) em biomassa; <sup>b</sup> 30 % óleo (por massa) em biomassa; <sup>c</sup> Para atender 50 % de todos os combustíveis necessários aos transportes no EUA. Fonte: Alterado de CHISTI, (2007)

As microalgas possuem também potencial na área agrícola por sintetizarem diversos reguladores de crescimento vegetal e por sua riqueza nutricional; seus componentes bioativos



tais como: antibióticos, antioxidantes, vitaminas (A, B1, B2, B6, B12, C, E, biotina, ácido fólico e ácido pantotênico) (BECKER, 2004), precursores de vitaminas, proteínas imunologicamente efetivas e compostos virostáticos as colocam também como organismos de extremo interesse para a indústria farmacêutica (BOROWITZKA, 1995; METTING; PYNE, 1986; HOPPE, 1979). Diversas espécies produzem ácidos graxos poliinsaturados, incluindo quantidades significativas de Ômega-3 e Ômega-6, se tornando uma alternativa à extração destes ácidos graxos de pescados marinhos que muitas vezes possuem seus produtos com odor desagradável, contaminação com metais pesados, baixa estabilidade, presença de colesterol e produção variável, o que não acomete as microalgas (ZITTELLI et al., 1999; WEN; CHEN, 2003).

Microalgas são também grandes produtoras de pigmentos naturais (carotenóides, clorofilas e ficobiliproteínas), que são visados industrialmente por serem mais estáveis e resistentes que pigmentos sintéticos quando frente a fatores como calor, congelamento e não perderem eficiência quando em quantidades mínimas (SKULBERG, 2004). A clorofila é um pigmento fotossintético e possui grande importância pois age como agente quelante, além de apresentar função no reparo celular e aumento na concentração de hemoglobina no sangue (BRENNAN; OWENDE, 2010). Os carotenóides são pigmentos fotossintéticos secundários, carotenóides, pigmentos fotossintéticos secundários com ação fotoprotetora, como o betacaroteno, cantaxantina e astaxantina, são utilizados como corantes naturais e antioxidantes (PULZ; GROSS, 2004).

Neste trabalho foi realizado um compilado de experimentos que foram divididos em quatro capítulos. Partiu-se de uma pesquisa básica de isolamento microalgal, tendo como amostra inicial a água de tanques de criação de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), localizados no município de Glória de Dourados, no estado de Mato Grosso do Sul, objetivando-se isolar microalgas selvagens utilizando diferentes metodologias. Após o isolamento, foi possível culminar em estratégias aplicadas, de quantificação e aplicação. Partindo do pressuposto que espécies distintas apresentam características intrínsecas, tem-se a necessidade de estudos específicos para cada espécie. Desta forma, foi escolhida a espécie *Chlorella sorokiniana* com o objetivo de avaliar a relação funcional entre as técnicas de densidade celular, densidade óptica e biomassa seca. Partiu-se então a pesquisas de ecotoxicologia aplicada, nos quais foram testados a sensibilidade da microalga dulcícola *Chlorella sorokiniana* em diferentes concentrações de salinidade e do inseticida fipronil.

## REFERÊNCIAS

- AISHVARYA, V., JENA, J., PRADHAN, N., PANDA, P. K., & SUKLA, L. B.; Microalgae: Cultivation and Application. In: Environmental Microbial Biotechnology. Springer International Publishing, 2015.
- ANDERSEN, R. A.; KAWACHI, M.; Microalgae Isolation Techniques. Algal culturing techniques, p. 83-100, 2005.
- BARBOSA, M. J. Microalgal photobioreactors: scale-up and optimisation. 2003.
- BECKER, W. 18 Microalgae in Human and Animal Nutrition. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology, 2004.
- BELAY, A. M. H. A. Mass culture of *Spirulina* outdoors—the Earthrise Farms experience. *Spirulina platensis*, p. 131-158, 1997.
- BOROWITZKA, M. A. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology*, v. 7, 1995.
- BRENNAN, L.; OWENDE, P.; Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Irlanda. v.14, p. 557–577, 2010.
- CARLOZZI, P. Hydrodynamic aspects and *Arthrospira* growth in two outdoor tubular undulating row photobioreactors. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 54, n. 1, p. 14-22, 2000.
- CHISTI, Y. Microalgae as sustainable cell factories. *Environmental Engineering & Management Journal (EEMJ)*, v. 5, n. 3, pag. 261–274. 2006.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, v. 25, 2007.
- DAROCH, M.; GENG, S.; WANG, G. Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks. *Applied Energy*, v. 102, p. 1371-1381, 2013.
- DE-BASHAN, L. E., HERNANDEZ, J. P., MOREY, T., & BASHAN, Y.; Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. *Water Research*, v. 38, n. 2, p. 466-474, 2004.
- DEGEN, J., DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M. de; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, 2006.
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M. de; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, 2006.
- ERIKSEN, N. T. N. T., RIISGÅRD, F. K., GUNTHER, W. S., & IVERSEN, J. J. L.; On-line estimation of O<sub>2</sub> production, CO<sub>2</sub> uptake, and growth kinetics of microalgal cultures in a gas-tight photobioreactor. *Journal of applied phycology*, v. 19, n. 2, p. 161, 2007.
- ERIKSEN, N. T. The technology of microalgal culturing. *Biotechnology letters*, v. 30, n. 9, p. 1525-1536, 2008.
- FALKOWSKI, P. G.; RAVEN, J. A. Aquatic photosynthesis. Princeton University Press, 2013.

GRETHER-BECK, S., MÜHLBERG, K., BRENDEN, H., FELSNER, I., BRYNJÓLFSDÓTTIR, Á., EINARSSON, S., & KRUTMANN, J.; Bioactive molecules of the Blue Lagoon: in vitro and in vivo evaluation of silica mud extracts and microalgae for their effects on skin barrier function and prevention of aging skin. *Experimental Dermatology*, v. 17, n. 9, p. 771-779, 2008.

HÄUBNER, N.; SCHUMANN, R.; KARSTEN, U. Aeroterrestrial microalgae growing in biofilms on facades—response to temperature and water stress. *Microbial ecology*, v. 51, n. 3, p. 285-293, 2006.

HIGGINS, B. T., GENNITY, I., SAMRA, S., KIND, T., FIEHN, O., & VANDERGHEYNST, J. S.; Cofactor symbiosis for enhanced algal growth, biofuel production, and wastewater treatment. *Algal Research*, v. 17, 2016.

HOPPE, H. A., LEVRING, T., & TANAKA, Y.; (Ed.). *Marine algae in pharmaceutical science*. Berlin; New York: de Gruyter, 1979.

HULATT, C. J.; THOMAS, D. N. Dissolved organic matter (DOM) in microalgal photobioreactors: a potential loss in solar energy conversion?. *Bioresource technology*, v. 101, n. 22, p. 8690-8697, 2010.

LAKANIEMI, A. M., INTIHAR, V. M., TUOVINEN, O. H., & PUHAKKA, J. A.; Growth of *Chlorella vulgaris* and associated bacteria in photobioreactors. *Microbial biotechnology*, v. 5, n. 1, p. 69-78, 2012.

LEWIS, N. S.; NOCERA, D. G. Powering the planet: Chemical challenges in solar energy utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 43, p. 15729-15735, 2006.

LI, Y., HORSMAN, M., WU, N., LAN, C. Q., & DUBOIS-CALERO, N.; Biofuels from microalgae. *Biotechnology progress*, v. 24, n. 4, p. 815-820, 2008.

LIM, S.; CHU, W.; PHANG, S.. Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 19, 2010.

LOERA-QUEZADA, M. M.; OLGUÍN E.J.. Las microalgas oleaginosas como fuente de biodiesel: retos y oportunidades. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*. v. 1, n. 1, maio 2010.

MALLICK, N., MANDAL, S., SINGH, A. K., BISHAI, M., & DASH, A.; Green microalga *Chlorella vulgaris* as a potential feedstock for biodiesel. *J Chem Technol Biotechnol*, v. 87, p.137 – 145, 2012.

MATOSI, Â. P., MORIOKAI, L. R. I., SANT'ANNAL, E. S., & FRANÇAIL, K. B.; Teores de proteínas e lipídeos de *Chlorella* sp. cultivada em concentrado de dessalinização residual. *Ciência Rural*, v. 45, n. 2, p. 364-370, 2015.

METTING, B.; PYNE, J. W. Biologically active compounds from microalgae. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 8, 1986.

MOLINA, E., FERNÁNDEZ, J., ACIÉN, F. G., & CHISTI, Y.; Tubular photobioreactor design for algal cultures. *Journal of biotechnology*, v. 92, n. 2, p. 113-131, 2001.

MUNOZ, R.; GUIEYSSE, B. Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water research*, v. 40, n. 15, 2006.

MUTANDA, T., RAMESH, D., KARTHIKEYAN, S., KUMARI, S., ANANDRAJ, A., & BUX, F.; Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresource technology*, v. 102, n. 1, 2011.

PARMAR, A., SINGH, N. K., PANDEY, A., GNANSOUNOU, E., & MADAMWAR, D.; Cyanobacteria and microalgae: a positive prospect for biofuels. *Bioresource technology*, v. 102, n. 22, 2011.

PIRT, S. J., LEE, Y. K., RICHMOND, A., & PIRT, M. W.; The photosynthetic efficiency of *Chlorella* biomass growth with reference to solar energy utilisation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 30, n. 1, p. 25-34, 1980.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.65, p.635-648, 2004.

RICHMOND, A.; Outdoor mass cultures of microalgae: Biological principles, production systems. In: *CRC Handbook of microalgal mass culture*. 1990.

RICHMOND, A. *Spirulina*. In: BOROWITZKA, M.A.; BOROWITZKA, L.J. (Eds). *Micro-algal biotechnology*. Cambridge: Cambridge University, p.85-121, 1988.

RICHMOND, A. (Ed.). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. John Wiley & Sons, 2008.

SKULBERG, O. M. Microalgae as a source of bioactive molecules—experience from cyanophyte research. *Journal of Applied Phycology*, v. 12, n. 3-5, p. 341-348, 2000.

SKULBERG, O. M. 30 Bioactive Chemicals in Microalgae. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, p. 485, 2004.

SPOLAORE, P., JOANNIS-CASSAN, C., DURAN, E., & ISAMBERT, A.; Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

TAMIYA, H. Mass culture of algae. *Annual Review of Plant Physiology*, v.8, n. 1, p. 309-334, 1957.

THOMPSON, P. A.; *Algal cell culture*. 2006.

UEBELE, A., RETZE, A., SCHMID-STAIGER, U., & TRÖSCH, W.; A novel airlift photobioreactor with baffles for improved light utilization through the flashing light effect. *Journal of biotechnology*, v. 92, n. 2, p. 89-94, 2001.

VALDERRAMA, L. T., DEL CAMPO, C. M., RODRIGUEZ, C. M., DE-BASHAN, L. E., & BASHAN, Y.; Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. *Water Research*, v. 36, n. 17, p. 4185-4192, 2002.

WEN, Z.Y; CHEN, F. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances*, v.21, p.273-294, 2003.

YANG, Z., GUO, R., XU, X., FAN, X., & LUO, S.; Hydrogen and methane production from lipid-extracted microalgal biomass residues. *international journal of hydrogen energy*, v. 36, n. 5, p.3465-3470, 2011.

ZITTELLI, G. C., LAVISTA, F., BASTIANINI, A., RODOLFI, L., VINCENZINI, M., & TREDICI, M. R.; Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in tubular photobioreactors. *Journal of Biotechnology*, v.70, p.299-312, 1999.

## Capítulo I - Isolamento e cultivo de microalgas selvagens de tanques de piscicultura

**Resumo:** *Diante da relevância ecológica e da sua característica autotrófica, as microalgas vem sendo fonte de diversos estudos em aplicações ambientais. O objetivo do presente trabalho foi isolar e cultivar microalgas selvagens provenientes de tanques de lona na produção de peixes, para que possam ser usadas em processos biotecnológicos. As técnicas empregadas para isolamento foram: coleta por microcapilares, cultivo em ágar, diluição seriada e seleção por envelhecimento do meio de cultivo. Após o seu isolamento as microalgas foram cultivadas em meio sintético NPK no laboratório, em sistema estático não axênico, com aeração constante, temperatura de  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$  e fotoperíodo controlado (12 h luz / 12 h escuro). Obtiveram-se as seguintes microalgas isoladas: **Chlorella sp**, **Closterium acerosum**, **Drepanochloris uherkovichii** e **Microcystis wesenbergii**. Apenas dois dos métodos utilizados foram eficientes para o isolamento, a diluição seriada e inoculação em ágar.*

**Palavras-chave:** Bioprospecção, Biotecnologia Ambiental, Microrganismo;

## Isolation and cultive of wild microalgae from fish farming's tanks

*Abstract: Microalgae has been the source of several studies in environmental applications given the ecological relevance and its autotrophic characteristic. The goal of the present work was to isolate and cultivate wild microalgae from canvas tanks of fish production so that they can be used in biotechnological processes. The techniques used for isolation were: collection by microcapillary, culture on agar, selection by aging of the culture medium and serial dilution. After their isolation, the microalgae was cultivated in NPK synthetic medium in the laboratory, in a non- axenic static system, with constant aeration, temperature of  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$  and controlled photoperiod (12 h light / 12 h dark). The following microalgae were obtained: **Chlorella sp**, **Closterium acerosum**, **Drepanochloris uherkovichii** and **Microcystis wesenbergii** only two of the techniques used were efficient to isolation, the serial dilution and culture on agar.*

**Keywords:** Bioprospecting, Environmental biotechnology, Microorganism;

## 1. INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos unicelulares capazes de realizar fotossíntese, de forma mais rápida e eficiente que as plantas terrestres (CARVALHO et al., 2012). Elas formam um grupo muito diverso, incluindo tanto procariotos, como as cianobactérias, quanto organismos eucariotos como algas verdes, vermelhas, diatomáceas, dinoflagelados (PINOTTI; SEGATO, 1991).

O estudo do cultivo das microalgas é um importante elemento para aumentar o conhecimento da biologia das diferentes espécies existentes, favorecendo posterior produção em ambientes controlados (SIPAUBA-TAVARES et al., 2009). O número exato de espécies de microalgas ainda é desconhecido, mas muitas são produzidas em sistemas de cultivo *in vitro*. Contudo, Pulz e Gross (2004) enfatizam que devido à enorme biodiversidade e aos avanços da engenharia genética, este grupo de microrganismos representa uma das mais promissoras fontes de novos produtos e aplicações.

As condições ótimas de cultivo e suas peculiaridades variam entre as espécies. De acordo com Andersen e Kawachi (2005) algumas particularidades das microalgas podem ser apontadas em função do seu ambiente de origem. Por exemplo, microalgas de ambiente terrestre normalmente apresentam menor exigência quanto fatores ambientais. Espécies dulcícolas coletadas no inverno, costumam apresentar menor sensibilidade quanto a temperatura, mas maior sensibilidade quanto a pH e alcalinidade. Espécies marinhas costeiras tem a salinidade e temperatura como características principais para crescimento, enquanto que espécies oceânicas exigem maior atenção quanto a qualidade da água e presença de metais pesados. Já espécies extremófilas são altamente sensíveis à temperatura, além de serem mais difíceis de crescerem em meios de cultivo. Dessa forma, compreender e reproduzir as condições naturais de cada espécie em questão é um aspecto relevante para o sucesso do isolamento de cada espécie de microalga.

Diante da relevância ecológica e da sua característica autotrófica, as microalgas também vem sendo fonte de diversos estudos em aplicações ambientais. Como elas podem ser produzidas em meio de cultivo com elevadas cargas de micro e macronutrientes, é possível consorciar sua produção ao tratamento de efluentes domésticos, industriais e demais águas residuais (CARVALHO et al., 2012; MOREIRA-SANTOS et al., 2004). Em meios com condições ideais as microalgas apresentam elevada eficiência na produção de biomassa ao mesmo passo que faz a biossorção e/ou adsorção dos elementos contaminantes da água, como sais minerais, metais pesados e matéria orgânica (ANSILAGO et al., 2017).

A piscicultura é uma atividade de produção que se intensificou muito nas últimas décadas, e, conseqüentemente, aumentou os riscos de contaminação por micro e macronutrientes nos corpos hídricos. Este é o resultado da sobra de ração e excreção animal, podendo levar a uma eutrofização do ambiente e, dessa forma, oferecer risco de poluição dos mananciais receptores desses efluentes. Apesar das grandes contribuições para alimentação, os efluentes gerados pelos sistemas aquícolas contribuem significativamente para a geração de impactos negativos ao meio ambiente (BASTIAN, 1991). A maior parte das unidades de pisciculturas, no entanto, utiliza recursos hídricos de boa qualidade e descarta águas residuais com elevadas concentrações de contaminantes sem nenhum tipo de tratamento prévio (CASTRO et al., 2006), controle ou monitoramento.

O isolamento e cultivo de microalgas selvagens de sistemas de produção de pescado e outros produtos aquícolas pode ser um importante incremento na consolidação de uma produção mais sustentável. Seu isolamento nesse sistema justifica-se pelo fato de que já apresentam resistência a ambientes pequenos, com poucos ou muitos nutrientes, variações de temperatura e salinização. Sua ocorrência nesses sistemas também indicaria um potencial para biorremediação da água residual da piscicultura, tornando assim o sistema mais sustentável por permitir a reutilização da água na limpeza, agricultura ou mesmo na retroalimentação dos tanques.

O isolamento de espécies de microalgas é comumente realizado através de microcapilares adaptados, selecionando células microalgais individualmente com a ajuda da microscopia, a técnica possui como desvantagem uma manipulação excessiva que pode acarretar em contaminação, perda ou rompimento das células de interesse, o que pode ser uma desvantagem significativa para espécies frágeis, mas não tão relevante quando se trabalha no isolamento de células mais robustas (ANDERSEN; KAWACHI, 2005).

Outra metodologia normalmente utilizada é o isolamento em placas de ágar por *spread plate*, na qual o inóculo é dispersado sobre o meio com ágar, preferencialmente utilizada para espécies cocóides e para espécies de ambiente terrestre, não sendo tão indicado para espécies flageladas, por não apresentarem crescimento em meio de ágar, em alguns casos de espécies que não crescem sobre o ágar, pode ser utilizado a técnica de *pour plate*, na qual o inóculo é colocado junto ao meio ainda líquido de forma que as células microalgais se desenvolvam incorporadas ao meio sólido e não sobre o ágar (ANDERSEN; KAWACHI, 2005).

Outras técnicas de isolamento (THOMPSON, 2006) também são descritas na literatura, tais como envelhecimento e diluições do meio, fototaxia, utilizada para espécies

com boa motilidade, onde o organismo de interesse é colocado em um canal de meio de cultura com uma fonte de luz focalizada que estimula a célula a se mover em direção à luminosidade (fototaxia positiva) ou em direção oposta (fototaxia negativa), de forma que seja possível isolar espécies com alta motilidade de espécies estáticas (ANDERSEN; KAWACHI, 2005; GARCIA; RAFAÏ; PEYLA, 2013).

Centrifugação e deposição também podem ser utilizadas de forma eficaz para separar organismos com diferenças significativas de tamanho, a centrifugação suave pode separar espécies maiores, dinoflagelados e diatomáceas para o pellet, enquanto células menores são decantadas (ANDERSEN; KAWACHI, 2005).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo isolar microalgas selvagens utilizando diferentes métodos, a partir de tanques de piscicultura e cultivar *in vitro* tais microalgas isoladas em meio de cultivo NPK, para que possam ser usadas em processos biotecnológicos, como biorremediação de tanques de piscicultura.

## **2. METODOLOGIA**

### **2.1 Isolamento das microalgas**

A água para isolamento das microalgas foi coletada com garrafa do tipo Van Dorn (3 L) em tanques de piscicultura do tipo lonado, sistema semi-intensivo de criação de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), localizados no município de Glória de Dourados, MS.

Existem vários métodos para realizar o isolamento de microalgas e o seu emprego depende das condições do laboratório e do tipo de espécie que se quer isolar (flagelado, ciliado, diatomácea). Os métodos utilizados foram:

1. O método de micromanipulação, utilizado para o isolamento de células maiores, com o uso de microscópio invertido na tentativa de coletar uma única célula algal através de tubos microcapilares;
2. O método de diluição seriada, através de diluições sucessivas, com o objetivo de terminar com uma única célula ou pelo menos células da mesma espécie num tubo;
3. Inoculação em placa de ágar foi utilizada para células pequenas, menores de 10 µm;



4. O método de isolamento por envelhecimento, através da indução da seleção e/ou competitividade por meio do adensamento de microalgas por tempo prolongado (aproximadamente seis meses).

## **2.2 Identificação das microalgas**

Após o isolamento as microalgas foram identificadas de acordo com chaves taxonômicas disponíveis, como: Bicudo e Menezes (2005), Ramos et al. (2015), Souza e Melo (2011) e Sant'anna et al. (2006).

## **2.3 Manutenção das microalgas**

As microalgas isoladas foram cultivadas em meio líquido sintético NPK (CARVALHO et al. 2012) ou meio sólido ágar. Para a preparação do meio de cultivo líquido foi utilizado um meio sintético estoque preparado com a adição de 0,07 g de adubo químico N: P: K (20-5-20 g/L) em 2000 mL de água destilada, autoclavados a 121°C durante 20 minutos (SIPAUBA-TAVARES; ROCHA, 2003). Para a preparação do meio de cultivo sólido as culturas foram mantidas em incubadora BOD com sistema de cultivo estático não axênico, aeração constante, com temperatura e fotoperíodo controlados (25°C ± 1 e 12 h luz / 12 h escuro).

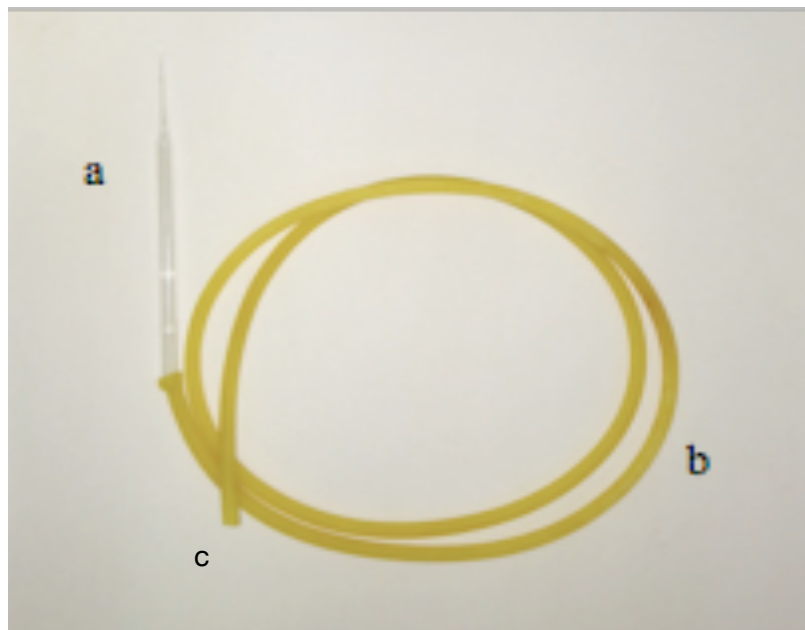
# **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Todas as técnicas descritas na sequência foram testadas e adaptadas para a infraestrutura e tecnologia do ambiente laboral. O escopo principal para tais técnicas apresentadas é oferecer ferramentas de isolamento de microalgas que sejam facilmente adaptáveis a diferentes ambientes laboratoriais e com pouco investimento tecnológico. Apesar da menção de outras técnicas de isolamento na literatura, estas comumente necessitam de equipamentos inacessíveis para muitos pesquisadores e treinamento especializado por parte de seus manipuladores.

## **3.1 Micromanipulação**

A técnica por sucção é realizada aspirando-se a célula e depositando-a em outra superfície de ágar ou em um meio líquido através de um tubo microcapilar. Para tal é preciso ter um tubo microcapilar acoplado a uma mangueira flexível (geralmente de silicone ou latex). O tubo microcapilar poderá ser feito a partir de uma pipeta de Pasteur previamente

afilada por aquecimento em bico de bunsen. O microcapilar é então justaposto a uma mangueira de flexível de 40 a 60 cm de comprimento (Figura 1). O tubo microcapilar é manejado sobre uma lâmina de forma a permitir a visualização pelo microscópio; a ponta é direcionada para a célula ou aglomerado de interesse e feita a aspiração de forma lenta e cuidadosa para dentro do microcapilar. Após a sucção, o microcapilar é inserido em um tubo de 10 mL com meio sintético, para que as células anteriormente aspiradas sejam expelidas e mantidas para duplicação algal. O método trata-se de uma adaptação e não deve ser utilizado em amostras de água com elevado potencial patogênico.



**Figura 1.** Preparo do microcapilar a partir da pipeta de Pasteur. *a)* A extremidade da pipeta é aquecida até que adquira certa maleabilidade. *b)* A pipeta é retirada da chama e afilada com uma pinça até que se tenha uma extremidade suficientemente fina. *c)* A extremidade da pipeta de Pasteur é cuidadosamente retirada para que se tenha uma ponta fina e regular.

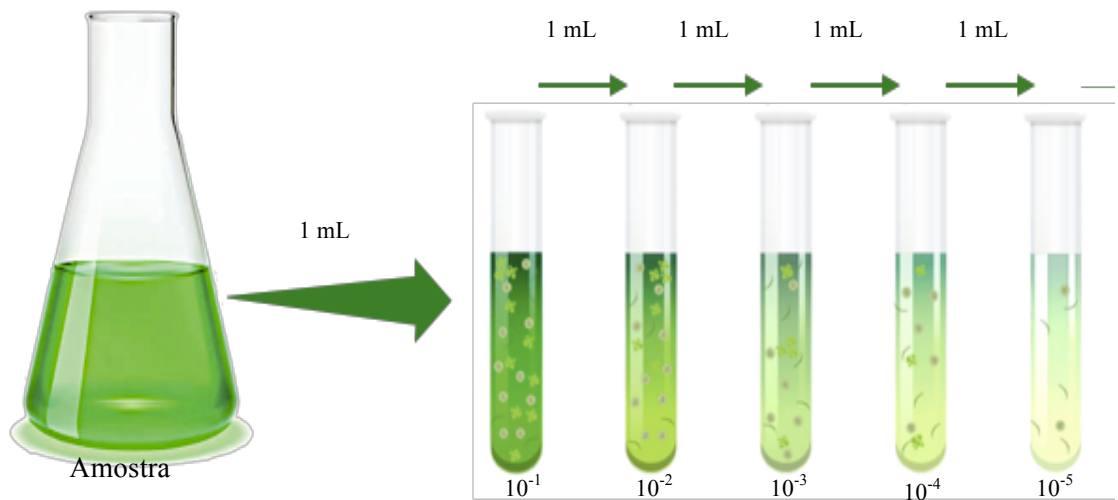
A micromanipulação por sucção facilita o isolamento de uma única célula algal, porém tem baixa eficácia para isolar espécies de amostras com grande concentração celular. A técnica exige destreza e treinamento em razão da pipeta de Pasteur adaptada ser extremamente frágil. O uso da boca para fazer a sucção se deve à facilidade de controlar a alíquota e a célula a ser isolada, bem como possibilita a utilização das duas mãos para manipulação do microscópio. No entanto, não é recomendável a utilização desta técnica com águas residuais com contaminações microbiológicas ou de elementos voláteis. A eficácia da técnica geralmente estará relacionada às habilidades motoras individuais do manipulador. No presente

trabalho, o isolamento de microalgas exclusivamente com esta técnica não se mostrou eficiente. Tal fato se deve à alta concentração e diversidade de microalgas na amostra. O método, no entanto, foi mais eficiente quando realizada em amostras diluídas, porém sem sucesso de duplicação celular das microalgas isoladas. Outros pesquisadores já demonstraram grande habilidade no isolamento e desenvolvimento de microalgas através da micromanipulação por sucção. Dessa forma, é importante que o emprego desta técnica em amostras com elevada concentração celular seja realizada apenas após a diluição.

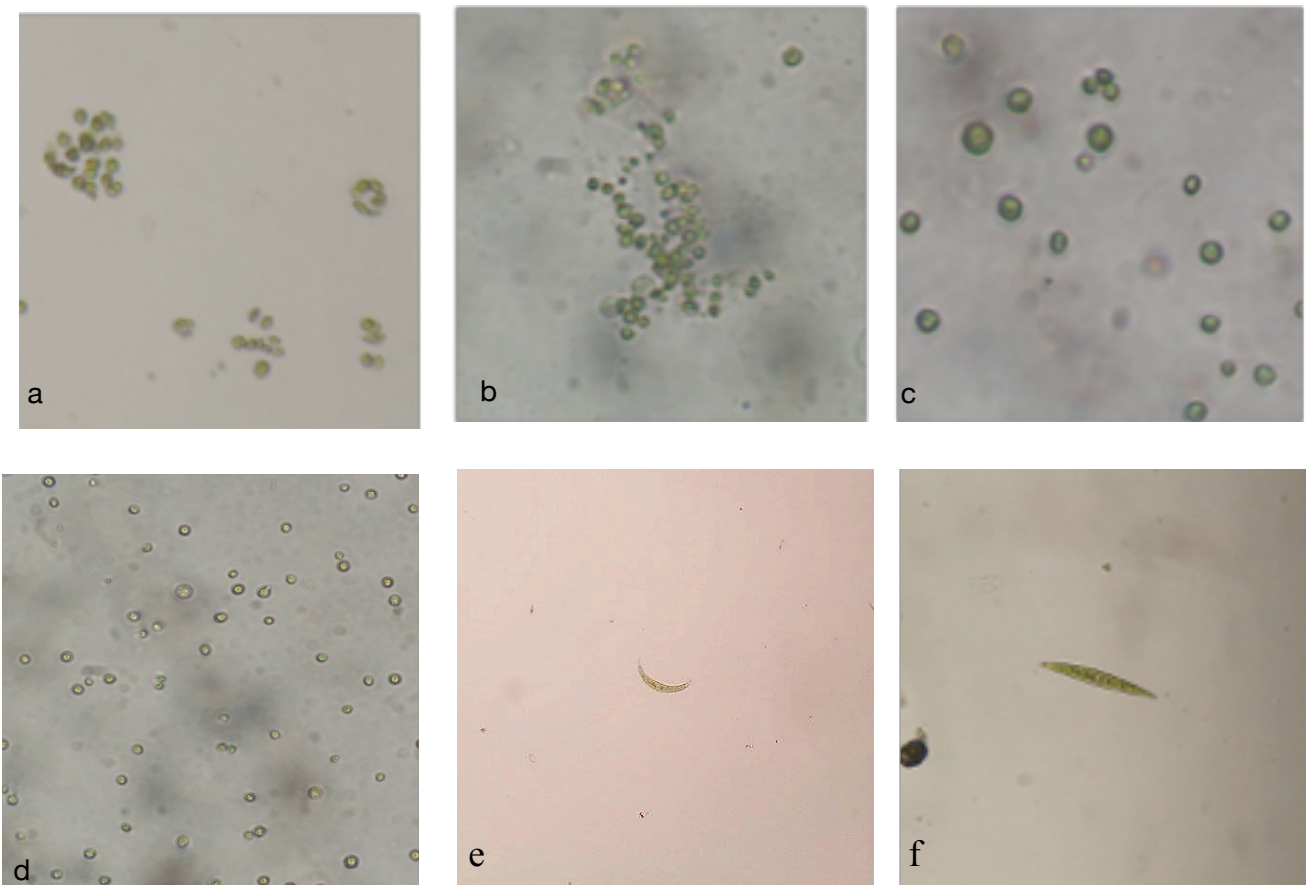
### 3.2 Diluição Seriada

Esta técnica possibilita reduzir a concentração inicial de microalgas, otimizando a visualização de células isoladas ou agrupadas. Com isso, torna-se mais fácil o isolamento de uma única espécie para cultivo e não exige habilidades motoras individuais por parte do manipulador. No entanto, é uma técnica que exige tempo em laboratório para execução, manutenção, isolamento e replicações periódicas, o qual aumenta a probabilidade de contaminação cruzada.

A técnica de diluição seriada se caracteriza por uma sequência de diluições com a finalidade de amplificar o fator de diluição, ou seja, a amostra original é diluída de acordo com o fator de diluição escolhido e então esta nova diluição que se obtém é utilizada para a diluição sucessiva, repetindo-se o processo até que se obtenha a quantidade de diluições desejada (Figura 2). Através desta técnica foi possível isolar *Microcystis wesenbergii*, *Chlorella* sp, *Drepanochloris uherkovichii* e *Closterium acerosum* (Figura 3). Cornélio (2012) também relata que a diluição seriada foi eficiente para seleção de *Chlorella* sp. Além disso, a diluição seriada permite estimar o número original de células isoladas através de controle da diluição a ser feita (HALLEGRAEFF, 1995), possibilitando uma fácil quantificação celular mesmo para amostras altamente concentradas.



**Figura 2.** Esquema de diluição seriada, no qual inicia-se com uma amostra concentrada que é submetida à diluições em série que aumentam rapidamente o fator de diluição.



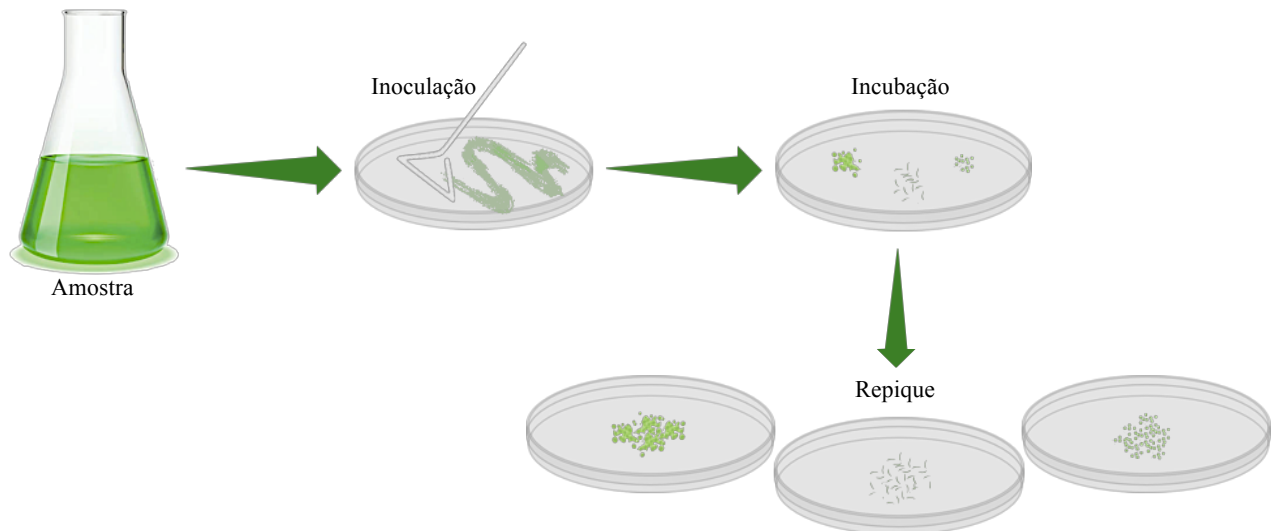
**Figura 3.** Detalhe das microalgas, da cianofíceia a) e b) *Microcystis wesenbergii* e da microalga c) e d) *Chlorella* sp.; e das microalgas e) *Drepanochloris uherkovichii*; f) *Closterium acerosum*.

### 3.3 Inoculação em placa de ágar

Esta técnica consiste em inocular, através da técnica de *spread plate*, uma alíquota de água com microalgas em placa de Petri contendo o meio de cultivo sintético de NPK com adição de 2 % ágar, o qual deverá ser acondicionado em incubadora, para controle de temperatura à  $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ .

Na inoculação em ágar há formação de colônias monoalgais que facilitam o isolamento (Figura 4). Quando associada à técnica de diluição seriada é possível aumentar a eficácia do isolamento por inoculação em placas com ágar. No entanto, a contaminação por fungos, além de atrapalhar o crescimento das microalgas, torna árduo a coleta da microalga nas colônias (CORNÉLIO, 2012). Além disso, esta técnica necessita de equipamentos e meios de cultivo com elevado custo, como incubadora do tipo B.O.D., meio ágar e em alguns casos antifúngicos. A B.O.D. é muito importante no processo, pois diminui o grau de contaminação da amostra e a mantém em temperatura controlada.

Através desta técnica, onde associou-se diluição seriada ao plaqueamento em meio sólido (ágar), obteve-se crescimento satisfatório de *Chlorella* sp. e *M. wesenbergii* na forma de colônias monoalgais. Estas demonstraram melhor crescimento que as demais espécies, o que possibilitou o isolamento da mesma. Contudo, a taxa de contaminação por fungos foi elevada, necessitando do descarte de algumas placas. É provável que os fungos estivessem em latência na água e se desenvolveram quando a alíquota contaminada foi inoculada em ágar. Uma das formas mais comuns para se livrar de contaminações fúngicas e também bacterianas é o uso de antimicrobianos, como o antifúngico anfotericina b e antibióticos como a estreptomicina (GRETHER-BECK, 2008), podem ser utilizados tanto meios que já possuem tais compostos, ou adicioná-los ao meio em concentrações que não sejam letais às células microalgais, porém, medidas profiláticas para controle de fungos e protozoários apresentam custos elevados que podem ser um empecilho. Apesar da contaminação fúngica nas placas foi possível realizar o isolamento de espécies microalgais.



**Figura 4.** Esquema de inoculação em placa de ágar, em que uma pequena fração da amostra é inoculada na placa pela técnica de *spread plate*, distribuindo-se a alíquota sobre toda a placa, a placa é então acondicionada em uma incubadora e após o crescimento das coloniais, é feito o repique, coletando-se parte das colônias monoalgais e inoculando em uma nova placa de ágar.

### 3.4 Envelhecimento

A técnica de envelhecimento tem como principal fator a indução da seleção e competitividade entre espécies de microalgas através do aumento da concentração algal no meio. Inicialmente observa-se um aumento na densidade algal, muitas vezes rica diversidade. Após um determinado período, que pode levar de um a seis meses, a diversidade biológica é substituída por aumento na densidade de determinados grupos ou espécies (Figura 5). Dependendo das especificidades da microalga que se pretende isolar é possível induzir a seleção por utilizar fatores limitantes de temperatura, nutrientes, contaminantes, pH, entre outros.

Esta técnica apresentou alto processo seletivo entre as espécies de microalgas. O gênero *Chlorella* sp. apresentou a maior densidade celular, demonstrando existir maior resistência à competitividade por espaço, luz e nutrientes, em comparação as demais espécies. Através da técnica foi possível selecionar o gênero de microalga com potencial para cultivo em sistemas sem controle de contaminação.

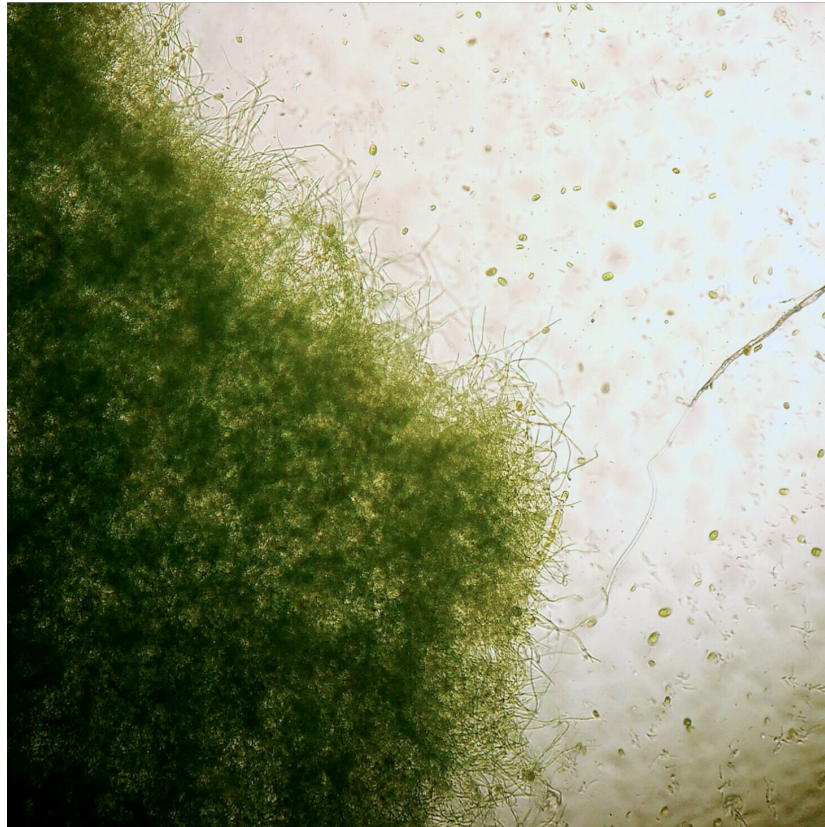
Apesar de selecionar espécies por competitividade, esta exige muito tempo para que resultados significativos sejam observados e possui taxa de contaminação superior aos demais métodos. No entanto, também é possível inferir sobre as possíveis espécies e gênero com maior resistência a estes contaminantes.

Em tal técnica foi possível observar uma alta taxa de crescimento e densidade microalgal durante todo o período de cultivo, porém o grau de contaminação por protozoários também foi elevado. No início do cultivo havia aproximadamente seis espécies de microalgas e após os seis meses de envelhecimento restaram apenas quatro. A microalga *Chlorella* sp. foi predominante durante todo o cultivo, apresentando uma alta densidade quando comparada visualmente com as demais espécies. Também foi observado um elevado desenvolvimento de biofilmes na parede do frasco Erlenmeyer, representando principalmente pelas algas filamentosas pertencentes ao gênero *Leptolyngbya* sp. (Figura 6).



**Figura 5.** Esquema de envelhecimento, onde ocorre a substituição da biodiversidade por densidade microalgal ao decorrer do tempo.

Estes dados, mesmo que não intencionais, foram muito importantes para a pesquisa, visto que a formação de biofilmes constitui em um produto biotecnológico ainda em franca expansão científica, além de ter função natural na estruturação bentônica, os biofilmes podem ser utilizados como indicadores biológicos de estresses ambientais em sistemas hídricos e por possuir estrutura de natureza dinâmica com uma vasta matriz polisacarídica, os biofilmes apresentam também atividade na bioadsorção e decomposição de poluentes orgânicos (SABATER, 2007; SCHORER, 1997).



**Figura 6.** Detalhe da formação de biofilme na parede do frasco de cultivo durante a técnica de envelhecimento.

### 3.5 Microalgas Isoladas e Potencial Biotecnológico

#### 3.5.1 *Chlorella* sp

Microalgas mais estudadas desde Warburg (1920): circulares (levemente elipsoides quando jovens) com parede lisa e isolada ou em pequenos aglomerados transitórios; organismos modelos pioneiros e estudos bioquímicos e fisiológicos (WARBURG, 1920; HUSS, 1999). São utilizadas como fonte alternativa de proteína na alimentação humana e animal (BECKER, 2007), e em estudos para maximizar produção de lipídios, proteínas, produção de biocombustíveis, e sobre produtividade de biomassa (LIANG, 2009; MIAO, 2004; RASOUL-AMINI, 2011; XU, 2006; WIDJAJA, 2009).

#### 3.5.2 *Closterium acerosum*

Microalga solitária, com forma alongada e quase sem curvatura, levemente mais delgada nas extremidades, divisão simétrica e vesículas em ambos os lados alinhadas singularmente (HOGETSU; SHIBAOKA, 1978; SILVA, 1952). Os estudos mais atuais com o gênero *Closterium* são referentes a identificação de novos taxons e composição celular (FELISBERTO e RODRIGUES, 2007), mas gênero *Closterium* foi alvo de diversos estudos



da década de 1960 até a década de 1980, quando foram estudados seus padrões de divisão celular, resistência deste gênero às situações de estresse como seca e baixa luminosidade, seus mecanismos de fototaxia positiva e produção de bainhas mucilaginosas, estudos sobre tais padrões de motilidade, crescimento, alongamento e efeitos ecotoxicológicos (YEH e GIBOR, 1970; EVANS, 1958; PICKETT-HEAPS, 1970)

### **3.5.3 *Drepanochloris uherkovichii***

Trata-se de uma célula solitária com parede celular lisa, bastante arqueada, com pólos delgados e gradativamente culminados, com incidência em Goiás e Bahia (RAMOS, 2015).

### **3.5.4 *Microcystis wesenbergii***

É um organismo esférico com parede lisa e que tem tendência em formar agregados ou colônias, margem visível e podendo formar mucilagem (HOLT, 1994; OUTSUKA, 2000). A espécie mais estudada do gênero das *Microcystis* é a *Microcystis aeruginosa*, tendo ênfase na produção de toxina que ocorre em algumas cepas desta espécie, mas também se encontram trabalhos referentes à produção de pigmentos e taxas de crescimento (HUGHES, 1958; UTKILEN, 1995; XING, 2007).

## **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Durante este trabalho foi possível realizar o isolamento de *Chlorella* sp e *C. acerosum*, *D. uherkovichii* e *M. wesenbergii*. Os métodos de maior eficácia no isolamento foram os de diluição seriada e por inoculação em placa de Petri, isoladamente ou em associação. A técnica de envelhecimento também foi importante, mas necessitou da diluição seriada para isolamento de células de *Chlorella* sp. livre de contaminação. A técnica de micromanipulação se mostrou pouco eficiente, uma vez que não permitiu o desenvolvimento das microalgas após o seu isolamento.

Assim, foi possível demonstrar que separadamente as técnicas de isolamento são pouco eficazes, porém quando foram utilizadas concomitantemente, estas se tornaram mais eficientes. A combinação de diferentes técnicas torna o isolamento mais prático, aproveitando os pontos fortes de cada método e as habilidades de cada manipulador.

## 5. REFERÊNCIAS

- ANDERSEN, R. A.; KAWACHI, M. Microalgae Isolation Techniques. Algal culturing techniques, p. 83, 2005.
- ANSILAGO, M.; Potencial de geração, valoração comercial e proposição de um modelo de gestão de materiais recicláveis na região Oeste do Paraná. 2017.
- BASTIAN, R. EPA prefers effluents to be recycled. Water Farming J., 1991.
- BAYLSON, F. A.; STEVENS, B. W.; DOMOZYCH, D. S. Composition and synthesis of the pectin and protein components of the cell wall of *Closterium acerosum* (Chlorophyta). Journal of Phycology, v. 37, n. 5, p. 796-809, 2001.
- BECKER, W. 18 Microalgae in Human and Animal Nutrition. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology, 2004.
- BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology advances**, v. 25, 2007.
- BICUDO, C. E. de M.; MENEZES, M.; Gêneros de algas de águas continentais do Brasil. Chave para identificação e descrições. São Carlos: Editora Rima, 2005.
- BOROWITZKA, M. A. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. Journal of Applied Phycology, v. 7, 1995.
- CARVALHO, E. M. de; OTTONELLI, F.; ANSILAGO, M.; GODOY, H. C.; NAKAGAKI, J. M.; RAMIRES, I. Growth kinetics of the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) in natural water enriched with NPK fertilizer. Biochemistry And Biotechnology Reports, v.01, n.02, 2012.
- CASTRO, P. M. G.; MARUYAMA, L. S.; MENEZES, L. C. B.; MERCANTE, C. T. J. Perspectivas da atividade de pescueiros no Alto Tietê: Contribuição à gestão de usos múltiplos da água. *B. Inst. Pesc.* São Paulo, 2006.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. Biotechnology advances, v. 25, 2007.
- CORNÉLIO, J. P. De S. Isolamento e produção de *Chlorella* sp(CHLOROPHYCEAE) e *Moina* sp(CLADOCERA) para utilização na larvicultura de Matrinxã (*Brycon amazonicus*). Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Aquicultura)–Universidade Nilton Lins, Manaus, 2012.
- DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M. de; FETT, R. Microalgas, produtos e aplicações. Ciência Rural, 2006.
- EVANS, J. H.; The survival of freshwater algae during dry periods: part I. An investigation of the algae of five small ponds. The Journal of Ecology, p. 149-167, 1958.
- FELISBERTO, S. A.; RODRIGUES, L.; Gênero *Closterium* (Closteriaceae) na comunidade perifítica do Reservatório de Salto do Vau, sul do Brasil. Iheringia. Série Botânica., v. 62, n. 1/2, p. 45-54, 2007.
- GARCIA, X.; RAFAÏ, S.; PEYLA, P. Light control of the flow of phototactic microswimmer suspensions. Physical review letters, v. 110, n. 13, p. 138106, 2013.
- GRETHER-BECK, S., MÜHLBERG, K., BRENDEN, H., FELSNER, I., BRYNJÓLFSDÓTTIR, Á., EINARSSON, S., & KRUTMANN, J.; Bioactive molecules of the Blue Lagoon: in vitro and in vivo

evaluation of silica mud extracts and microalgae for their effects on skin barrier function and prevention of aging skin. *Experimental Dermatology*, v. 17, n. 9, p. 771-779, 2008.

HOGETSU, T.; SHIBAOKA, H. The change of pattern in microfibril arrangement on the inner surface of the cell wall of *Closterium acerosum* cell growth. *Planta*, v. 140, n. 1, p. 7-14, 1978.

HOLT, J. G.; Group 5, Facultatively anaerobic gram-negative rods. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, p. 175-289, 1994.

HUSS, V. A., FRANK, C., HARTMANN, E. C., HIRMER, M., KLOBOUCEK, A., SEIDEL, B. M., KESSLER, E.; Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, v. 35, 1999.

HALLEGRAEFF, G. M.; ANDERSON, D. M.; CEMBELLA, Allan. *Manual on harmful marine microalgae*, IOC Manuals and Guides No. 33., 1995.

LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y.. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology letters*, v. 31, n. 7, p. 1043-1049, 2009.

MIAO, X.; WU, Q.; High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. *Journal of biotechnology*, v. 110, n. 1, p. 85-93, 2004.

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, n.01, 2004.

MUTANDA, T., RAMESH, D., KARTHIKEYAN, S., KUMARI, S., ANANDRAJ, A., & BUX, F.; Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 1, 2011.

OUTSUKA, S. et al. Morphological variability of colonies of *Microcystis morphospecies* in culture. *The Journal of General and Applied Microbiology*, v. 46, n. 1, p. 39-50, 2000.

PICKETT-HEAPS, J. D.; FOWKE, L. C. Mitosis, cytokinesis, and cell elongation in the desmid, *Closterium littorale* 1. *Journal of Phycology*, v. 6, n. 2, p. 189-215, 1970.

PINOTTI, M. H. P.; SEGATO, R. Cianobactérias: importância econômica. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 12, n. 4, p. 275-280, 1991.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology Biotechnology*. v.65, n.01, 2004.

RAMOS, G. J. P.; BICUDO, C. E. de M.; NASCIMENTO, C. W. do. *Novos registros de algas verdes cocoides (Chlorophyceae, Chlorophyta) para o estado da Bahia e para o Brasil*, 2015.

RASOUL-AMINI, S., MONTAZERI-NAJAFABADY, N., MOBASHER, M. A., HOSEINI-ALHASHEMI, S., & GHASEMI, Y. *Chlorella* sp.: A new strain with highly saturated fatty acids for biodiesel production in bubble-column photobioreactor. *Applied Energy*, v. 88, n. 10, p. 3354-3356, 2011.

SABATER, S., GUASCH, H., RICART, M., ROMANÍ, A., VIDAL, G., KLÜNDER, C., & SCHMITT-JANSEN, M.. Monitoring the effect of chemicals on biological communities. The biofilm as an interface. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 387, n. 4, p. 1425-1434, 2007.

- SANT'ANNA, C. L.; AZEVEDO, M. T. de P.; AGUJARO, L. F.; CARVALHO, M. do C.; CARVALHO, L. R. de.; SOUZA, R. C. R. Manual Ilustrado para Identificação e contagem de Cianobactérias Planctônicas de águas continentais brasileiras. Rio de Janeiro: Interciência, 2006.
- SCHORER, M.; EISELE, M.; Accumulation of inorganic and organic pollutants by biofilms in the aquatic environment. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 99, n. 1-4, p. 651-659, 1997.
- SILVA, P. C. A review of nomenclatural conservation in the algae from the point of view of the type method. University of California publications in botany. University of California Press. 1952.
- SIPAUBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos. 2 ed. São Carlos: RiMa. 2003.
- 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*. v.35, n.01, 2009.
- SOUZA, K. F.; MELO, S.; Levantamento taxonômico de desmídias (Chlorophyta) do lago Novo (Amapá, Brasil): Gêneros *Staurastrum*, *Staurodesmus* e *Xanthidium*. *Acta Amazonica*. v.41, n.03, 2011.
- SPOLAORE, P., JOANNIS-CASSAN, C., DURAN, E., & ISAMBERT, A.; Commercial applications of microalgae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2006.
- THOMPSON, Peter A. *Algal cell culture*. 2006.
- UTKILEN, H.; GJØLME, N. I. N. A. Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*. *Applied and Environmental microbiology*, v. 61, n. 2, p. 797-800, 1995.
- XING, W., HUANG, W. M., LI, D. H., & LIU, Y. D.; Effects of iron on growth, pigment content, photosystem II efficiency, and siderophores production of *Microcystis aeruginosa* and *Microcystis wesenbergii*. *Current microbiology*, v. 55, n. 2, p. 94-98, 2007.
- XU, H.; MIAO, X.; WU, Q.; High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of biotechnology*, v. 126, n. 4, p. 499-507, 2006.
- YEH, P.; GIBOR, A. Growth patterns and motility of *spirogyra* sp. and *Closterium acerosum* 1, 2. *Journal of Phycology*, v. 6, n. 1, p. 44-48, 1970.
- WARBURG, O. On the reduction of nitrite acid in green cells. *Natural Sciences*, v. 8, 1920.
- WIDJAJA, A.; CHIEN, C.; JU, Y.; Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 40, n. 1, p. 13-20, 2009.

## **Capítulo II - Análise da relação funcional entre as variáveis de quantificação celular da microalga *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae)**

**Resumo:** *Diante da ampla gama de aplicações biotecnológicas, as pesquisas com microalgas vêm se intensificando. O cultivo destas em condições artificiais também aumenta, tornando importante a análise de métodos de quantificação e avaliação da cinética de crescimento. O objetivo deste trabalho foi verificar a existência de uma relação funcional entre as variáveis utilizadas para quantificação da microalga **Chlorella sorokiniana**. Para tal foi aplicada a análise de regressão linear nas variáveis de densidade celular, densidade óptica e biomassa seca, obtidas através do cultivo da microalga em diferentes concentrações. Utilizando as equações geradas a partir da análise de regressão para a microalga **Chlorella sorokiniana** é possível obter valores da densidade celular entre 3 a  $38 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  e valores de biomassa seca entre 0,1 e 4,3  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  a partir dos valores de densidade óptica com alta precisão e maior praticidade.*

**Palavras-chave:** Densidade celular, Densidade óptica, Peso seco;

### **Analysis of the functional relationship between the cell quantification variables of the microalgae *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae)**

*Abstract: Given the wide range of biotech applications, microalgae research has been intensifying. The cultivation of these in artificial conditions also increases, making important the analysis of methods of quantification and evaluation of the kinetics of growth. The objective of this work was to verify the existence of a functional relationship between the variables used to quantify the microalgae **Chlorella sorokiniana**. For this purpose, the linear regression analysis was applied to the variables of cell density, optical density and dry biomass obtained by microalgae cultivation at different concentrations. Using the equations generated from the regression analysis for the **Chlorella sorokiniana** microalgae it is possible to obtain values of the cellular density between 3 to  $38 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  and values of dry biomass between 0.1 and 4.3  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  from the values of optical density with high precision and greater practicality.*

**Keywords:** Cellular density, Dry weight, Optical density

## 1. INTRODUÇÃO

A quantificação da densidade microalgal em rotinas padrões é realizada por métodos que mensuram a densidade celular por microscopia (ARAGAW, 2017). Comumente utiliza-se uma câmara do tipo Neubauer, ou hemocitômetro, estimando o número de células algais por metros cúbicos (CARVALHO et al., 2012; ANSILAGO et al., 2017). Tal técnica permite também observação da taxa de crescimento celular, tal como de mutações citológicas, porém além da demanda de tempo para análise, há perda da precisão quando há diluições na amostra (CORCINI, 2011).

Outros métodos de quantificação envolvem o cálculo de massa ou volume, porém demandam longos períodos, apresentando, muitas vezes, procedimentos com várias etapas e de preparação e mesmo assim, possuem alta probabilidade de erros sistemáticos (RODRIGUES, 2011). Ainda assim, o cálculo de massa ou volume são os mais utilizados para análises quantitativas destes organismos, principalmente quando o interesse é produção e obtenção de biomassa.

Em contrapartida, existem métodos como a quantificação por espectrofotometria (densidade óptica), que oferecem maior economia de tempo, menor quantidade de amostra, simplificação do procedimento e baixa probabilidade de erro (SOBRINHO, 2008; MAYER, 2013). A espectrofotometria é uma técnica baseada no grau de absorvância de luz, que permite leitura rápida e de fácil manuseio, sendo muito utilizada como metodologia alternativa ao invés de metodologias complexas e dispendiosas. Paschoal et al., (2003) utilizaram a espectrofotometria como alternativa para a cromatografia líquida de alta eficiência. Brito et al., (2013) realizaram monitoramento da qualidade de água residual por espectrofotometria *in situ*. Em experimentos que tem por objetivo quantificar metabólitos celulares, como é o caso de Barbarino e Lourenço (2005), Marxen et al., (2007) e Leite et al., (2016), a técnica de espectrofotometria já é altamente difundida. Por outro lado, em trabalhos que visam analisar o crescimento algal ou velocidade de crescimento predomina-se a utilização da densidade celular.

A técnica de quantificação de biomassa seca, apesar de ser mais trabalhosa e demandar tempo para a secagem das amostras, ainda é muito utilizada, principalmente quando se tem o objetivo de produção ou caracterização de biomassa (HOSSEINIZAND et al., 2018). Comumente medidas de densidade celular ou de densidade óptica não são comuns em trabalhos que visam produção de microalgas.

Buscando obter os valores de densidade celular a partir da quantificação algal por densidade óptica, para as espécies *Chlamydomonas reinhardtii*, *Scenedesmus communis*, *Cryptomonas phaseolus* e *Selenastrum rinoi*, os autores Valer e Glock (1998) apresentaram equações que permitem estimar a concentração algal a partir de dados de absorvância para densidades celulares entre  $10^4$  e  $10^5$  células / mL. Já Rodrigues et al., (2011) propuseram uma curva de calibração para correlacionar os valores de absorvância (684 nm) e densidade celular de *Pseudokirchneriella subcapitata* de até 5.000.000 ( $5 \times 10^6$ ) células / mL.

Cada espécie de microalga apresenta características intrínsecas, tornando-se necessários estudos específicos, em altas e baixas densidades celulares. Dessa forma, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar a relação entre as técnicas adotadas para estimar densidade celular, densidade óptica e biomassa seca da microalga *Chlorella sorokiniana*. Com isso, foi possível selecionar entre as técnicas a que apresenta menor custo, simplificação do procedimento, adequação ao escopo do trabalho e às necessidades intrínsecas da unidade de quantificação.

## 2. METODOLOGIA

Foram utilizadas cepas da microalga *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae) adquirida da Fundação André Tosello (Ref. 211-32), cultivada *in vitro* no laboratório do Centro de Pesquisa em Biodiversidade (CPBio) na Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS).

A microalga foi cultivada no laboratório em frascos de 4.000 mL e volume total de cultivo de 2.000 mL, e suplementada com fertilizante químico NPK (SIPAUBA-TAVARES; ROCHA, 2003; CARVALHO et al., 2012) e vinhaça, mantida em sistema de cultivo estático não axênico, com aeração constante, temperatura ambiente e fotoperíodo controlado (12 h luz / 12 h escuro).

Na preparação da solução inicial utilizou-se uma proporção entre 80 % e 20 % (v/v) do meio de cultivo e o inóculo de microalga, respectivamente. Para suplementação foram adicionados 1 % de vinhaça de cana-de-açúcar concentrada e 1 % da solução estoque de N:P:K, ambas sobre a alíquota total de 2000 mL. A solução estoque N:P:K foi preparada com  $0,70 \text{ g.L}^{-1}$  de adubo químico N:P:K (20-5-20  $\text{g/L}^{-1}$ ) para cada 1000 mL (SIPAUBA-TAVARES; ROCHA, 2003).

A partir da solução inicial, foram então preparadas cinco diluições seriada, com três réplicas cada, sempre corrigindo as concentrações dos suplementos N:P:K e vinhaça. O

experimento teve duração de 35 dias, onde coletou-se a cada cinco dias amostras para realizar as respectivas quantificações descritas no item 2.1 ao 2.3.

### **2.1 Quantificação em câmara de Neubauer**

Uma alíquota foi retirada de cada tratamento e contada em câmara de Neubauer (homocitômetro) para obtenção da densidade algal. Levando-se em consideração a densidade algal calculou-se também a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{\max}$ ) e o tempo de duplicação (DT).

### **2.2 Quantificação em espectrofotometria**

Através do método de varredura, foram tomadas a distribuição espectral da absorbância nas cinco concentrações, num intervalo 600-750 nm, a fim de verificar os picos de absorção de luz. Posteriormente tomou-se as leituras de absorbância para cada amostra no comprimento de onda no qual ocorreram os picos de absorção. O equipamento foi calibrado com “branco”, representado pelo próprio meio de cultivo utilizado na produção algal.

### **2.3 Quantificação da biomassa**

Para se determinar o peso de biomassa seca, utilizou-se tubos de fundo cônico de volume 2 mL previamente secos e tarados. Dessa maneira, retirou-se uma alíquota de 2 mL dos respectivos cultivos em duplicata e os mesmos foram repassados para o tubo de fundo cônico. As amostras foram submetidas ao processo de centrifugação em microcentrifuga refrigerada a 5000 RPM (6879 g) durante 5 minutos a 5°C. Posteriormente, foi descartado o sobrenadante e os tubos de fundo cônico com a biomassa foram colocados na estufa de circulação overnight a 60°C até obtenção de peso constante (24-48 horas). Após a secagem os tubos foram pesados novamente e o peso seco foi obtido através da diferença entre peso final e peso inicial.

### **2.4 Análise dos dados**

Com o objetivo de verificar a existência de uma relação funcional entre as variáveis utilizadas para quantificação da microalga *C. sorokiniana* empregou-se a análise de regressão linear. A equação gerada pela análise tende a explicar a variação da variável dependente pela variação do(s) nível(eis) da(s) variável(eis) independente(s). Para verificar a correlação entre



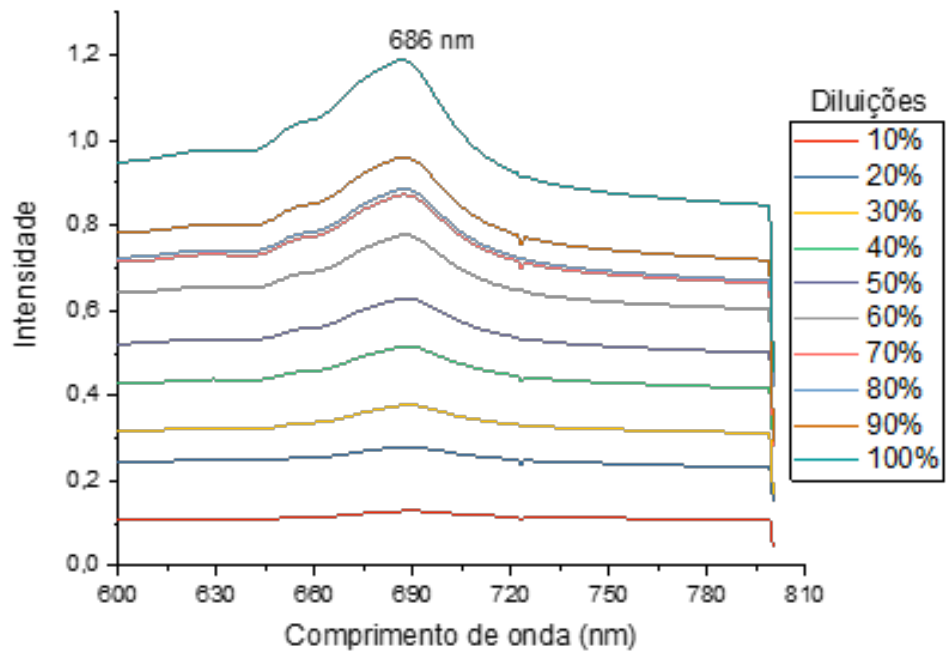
as variáveis analisadas utilizou-se o teste não-paramétrico de Spearman com probabilidade de 95 % de confiança ( $p < 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para se estimar a quantificação algal podem ser incluídas técnicas como contagens celulares diretas, quantificação de biomassa seca e a densidade óptica por absorvância em espectrofotometria. No entanto, algumas técnicas exigem mais tempo, esforço e apresentam maior probabilidade de erro. Entre as técnicas apresentadas, a densidade óptica permite analisar um número maior de amostra, demandando menos trabalho e menor probabilidade de erro. No entanto, as estimativas mais empregadas na literatura são biomassa seca e densidade celular. Para avaliar a relação funcional entre densidade óptica e biomassa seca e densidade celular da microalga *Chlorella sorokiniana* foi realizado um ensaio durante 35 dias com amostragem de microalgas a cada 5 dias.

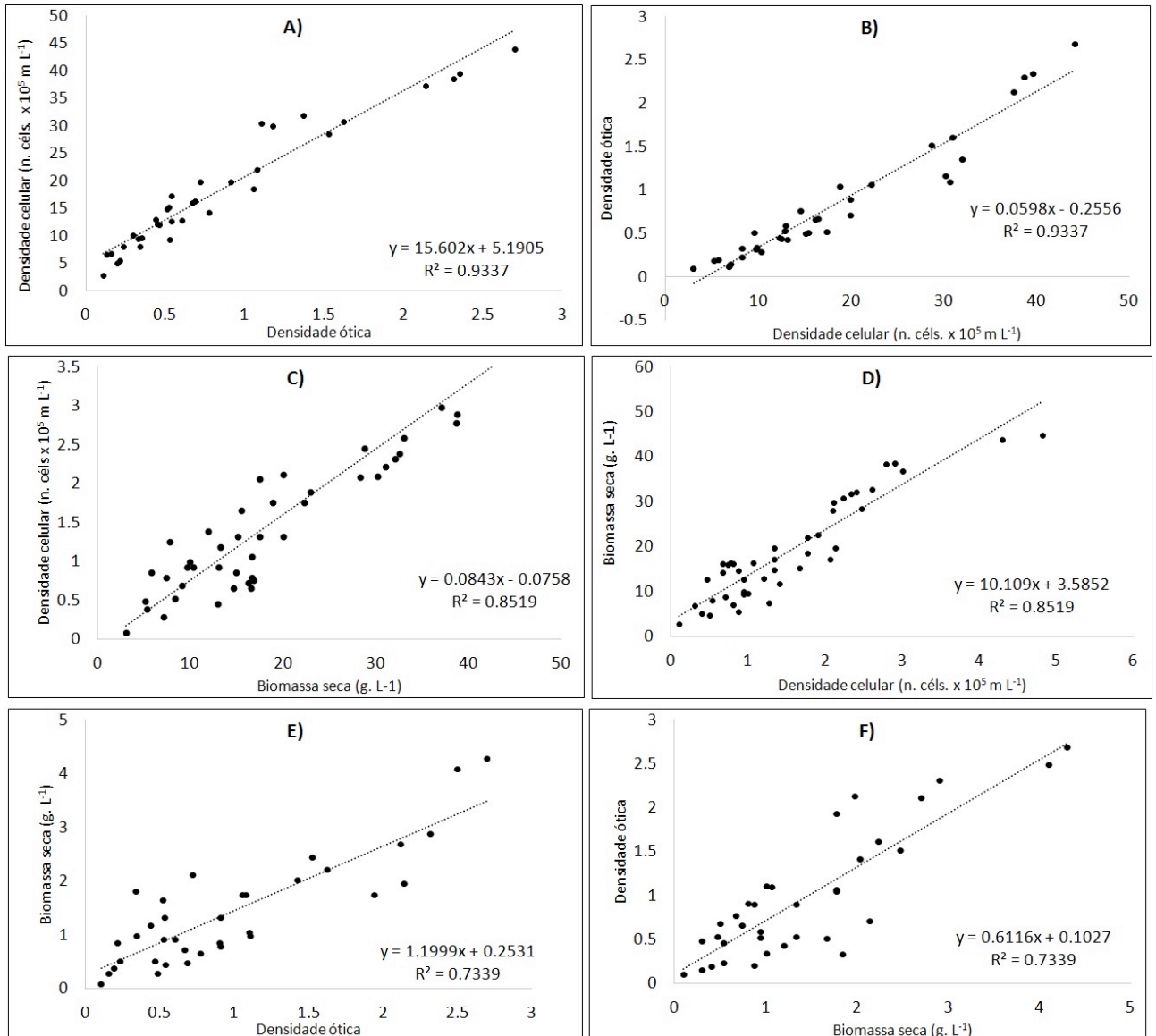
Inicialmente foi analisada a absorvância máxima da microalga *Chlorella sorokiniana* em diferentes concentrações (10 a 100 %) por varredura entre 200 a 800 nm (espectrofotômetro UV-VIS Bel Photonics), com o intuito de encontrar a melhor faixa de leitura. Os resultados indicaram que o pico máximo de absorvância variou entre 670 e 690 nm (Figura 1). Dessa forma, foi selecionado o comprimento de onda de 670 nm para a realização da leitura de densidade óptica.

Quando a absorvância espectrofotométrica é a técnica escolhida, é comum verificar a adoção do comprimento de onda de 750 (*e.g.* EPA, 1994; EATON et al., 1995). Entretanto, valores de 687 nm (VALER e GLOCK, 1998), 684 nm (RODRIGUES et al., 2011) e 686 nm (DZIOSA e MAKOWSKA, 2016) também sejam verificados na literatura. De qualquer forma, todos estes valores de leitura estiveram representados dentro do comprimento de onda estimado no presente trabalho.



**Figura 1.** Padrão de absorção de luz para as diluições com *Chlorella sorokiniana* rastreada entre 600 e 810 nm.

Posteriormente foi analisada a regressão linear ( $R^2$ ) entre as variáveis de densidade óptica, densidade celular e biomassa seca. Os resultados indicaram a melhor regressão linear entre a densidade óptica do cultivo de *Chlorella sorokiniana* com a densidade celular, seguido por densidade celular com biomassa seca, e densidade óptica com biomassa seca (Figura 2).



**Figura 2.** Correlação entre as variáveis: A) densidade óptica (absorbância 670nm) x densidade celular ( $n^{\circ}$  células  $\times 10^5 \text{ m L}^{-1}$ ); B) densidade celular x densidade óptica; C) biomassa seca ( $\text{g. L}^{-1}$ ) x densidade celular; D) densidade celular x biomassa seca; E) densidade óptica x biomassa seca; F) biomassa seca x densidade óptica.

Todos os cruzamentos apresentam correlação significativa pelo teste de Spearman, com probabilidade de 95 % de confiança ( $p < 0,05$ ): densidade óptica com densidade celular apresentou a maior correlação ( $r = 0,93$ ;  $p < 0,05$ ), seguido por densidade celular x biomassa seca ( $r = 0,85$ ;  $p < 0,05$ ) e densidade óptica x biomassa ( $r = 0,73$ ;  $p < 0,05$ ). A partir destes resultados é possível obter a mensuração da densidade algal, densidade celular e biomassa da microalga *C. sorokinina* a partir de somente uma técnica de mensuração, com maior confiança entre densidade óptica para densidade celular e vice-versa.

A regressão linear gerou as seguintes equações:

Para regressão da densidade óptica para densidade celular (número células x  $10^5$  m L<sup>-1</sup>)  
 $DC = (15,602 \cdot N_{DO}) + 5,1905$

Onde: 15,602 é a constante de regressão;  $N_{DO}$  é a variável independente (densidade óptica), 5,1905 é o coeficiente de regressão.

Para regressão de densidade celular para densidade óptica  
 $DO = (0,0598 \cdot N_{DC}) - 0,2556$

Onde: 0,0598 é a constante da regressão;  $N_{DC}$  é a variável independente (densidade celular). 0,2556 é o coeficiente de regressão.  $y = 0.0598x - 0,2556$

Para regressão de biomassa seca (g.L<sup>-1</sup>) para densidade celular  
 $DC = (0,0843 \cdot N_{BS}) - 0,0758$

Onde: 0,0843 é a constante da regressão;  $N_{BS}$  é a variável independente (biomassa seca). 0,0758 é o coeficiente de regressão.  $y = 0.0843x - 0.0758$

Para regressão de densidade celular para biomassa seca  
 $BS = (10,109 \cdot N_{DC}) + 3,582$

Onde: 10,109 é a constante da regressão;  $N_{DC}$  é a variável independente (densidade celular). 3,582 é o coeficiente de regressão.  $y = 10,109x + 3,582$

Para regressão de densidade óptica para biomassa seca  
 $BS = (1,999 \cdot N_{DO}) + 0,2531$

Onde: 1,999 é a constante da regressão;  $N_{DO}$  é a variável independente (densidade óptica). 0,2531 é o coeficiente de regressão.  $y = 1,999x + 0,2531$

Para regressão de biomassa seca para densidade óptica  
 $DO = (0,6116 \cdot N_{BS}) + 0,1027$

Onde: 0,616 é a constante da regressão;  $N_{BS}$  é a variável independente (biomassa seca). 0,1027 é o coeficiente de regressão.  $y = 0,6116x + 0,1027$

Com base nos resultados supracitados é possível comparar os dados da produção algal com diferentes dados da literatura. A densidade óptica é uma metodologia que já tem sido utilizada para a quantificação de parâmetros de crescimento de cepas de microalgas (CEREIJO et al., 2015; BAUMGARTNER et al., 2013; RODRIGUES et al., 2011). Neste trabalho corroboramos que a quantificação através da densidade óptica é correspondente às outras técnicas utilizadas, como a densidade celular ou a biomassa seca. Esta técnica pode ser

usada para simplificar a aquisição dos dados usados para preparar inóculo para uma cultura inicial ou estimar a produtividade da biomassa de microalgas (CEREIJO et al., 2015). No entanto, para que esta técnica seja viável é necessário um espectrofotômetro nas proximidades do local de cultivo, o qual poderá requerer um investimento inicial.

Apesar das vantagens e desvantagens de cada técnica de quantificação, o que vai demandar sua utilização é o tipo de aplicação que se deseja da microalga. Nas pesquisas recentes realizadas com microalgas em cultivo em laboratório verifica-se que tanto os métodos de quantificação por densidade celular em câmara de Neubauer (densidade) quanto métodos indiretos como leitura em espectrofotometria (densidade óptica) e peso seco (biomassa), são importantes para validar os resultados.

A densidade celular é uma técnica de baixo custo, mas a desvantagem é que pode ser exaustivamente trabalhosa e pode apresentar maior variabilidade de erro. Dependendo do tipo de contaminante ou nutriente substrato utilizado no ensaio ou até mesmo mudanças na temperatura poderá ocorrer uma aglutinação das células de microalgas levando a uma superestimação ou subestimação da densidade celular. Além disso, para a contagem das células é necessário o investimento de um bom microscópio binocular, câmara de Neubauer (homocitômetro) e mão de obra com treinamento em microscopia.

Já a quantificação através da biomassa seca exige considerável tempo e trabalho, uma vez que as amostras devem ser preparadas e totalmente secas. A microalga em suspensão deve passar por centrifugação para separação do sobrenadante e secar em estufa a 60°C por aproximadamente 24 horas até peso constante. Devido a sequência de processos poderá ocorrer erros desde o preparo do recipiente da microalga para centrifugação e secagem, o qual deve estar previamente tarado e pesado, até mesmo por interferências no tempo para secagem e troca de amostras, diminuindo assim a exatidão da técnica. Além disso, é preciso ter como investimento uma balança analítica de precisão, centrífuga e estufa de secagem.

Com os resultados obtidos foi possível inferir que a regressão linear entre densidade celular e densidade óptica apresentou elevada correlação, indicando menor probabilidade de erro. Assim, torna-se possível substituir a técnica de densidade celular pela densidade óptica. A transformação dos valores se dá através da equação de regressão, permitindo realizar a quantificação algal a partir da densidade óptica, com rapidez e segurança (VALER; GLOCK, 1998). Apesar da menor correlação entre biomassa seca e densidade óptica, o valor ainda é significativo e a equação de regressão linear pode ser utilizada para a quantificação por densidade óptica, em detrimento da biomassa seca. O processo para se obter a biomassa seca de microalgas é demorado, além de mais caro, pois requer uma grande quantidade de energia

(HOSSEINIZAND et al., 2018). De acordo com Silva et al., (2007), ao correlacionarem a densidade celular em hemocítmetro com a contagem eletrônica a partir de plaquetas em esfregaço, foi obtido índice de correlação de  $r: 0,60$ , o qual consideraram esse valor como confiável. No entanto, nosso menor índice de correlação ainda foi superior aos valores encontrados pelos autores supracitados.

Utilizando as equações geradas com a análise de regressão para a microalga *Chlorella sorokiniana* é possível obter valores da densidade celular entre  $3$  e  $38 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  a partir da densidade óptica e valores de biomassa seca entre  $0,1$  e  $4,3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  a partir também dos valores de densidade óptica com alta precisão. Valores fora desse espectro podem apresentar um erro maior, o qual requer novas análises.

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Foi possível obter uma relação funcional por regressão linear, para as três técnicas de quantificação algal: densidade celular, densidade óptica e biomassa seca. Assim, foi possível quantificar as microalgas através de uma técnica e transformar tais valores através das equações geradas pela regressão linear.

Dentre as técnicas apresentadas, a densidade óptica se mostrou a mais apropriada em função da praticidade e rapidez na manipulação das amostras e obtenção dos valores em menor tempo. Diante dos resultados será possível estimar valores de densidade celular e biomassa algal seca utilizando-se apenas a técnica por espectrofotometria para obtenção da densidade óptica.

## 5. REFERÊNCIAS

- ANSILAGO, M.; Potencial de geração, valoração comercial e proposição de um modelo de gestão de materiais recicláveis na região Oeste do Paraná. 2017.
- ARAGAW, T. A.; ASMARE, A. M. Experimental Identifications of Fresh Water Microalgae Species and Investigating the Media and PH Effect on the Productions of Microalgae. *Journal of Environmental Science and Technology*. v. 5, p. 124-131, 2017.
- BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. O. An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro-and microalgae. *Journal of Applied Phycology*, v. 17, n. 5, p. 447-460, 2005.
- BAUMGARTNER, T. R. S.; BURAK, J. A. M.; KOGIKOSKI, M.E. SEBASTIEN, N. Y.; ARROYO, P. A. Avaliação da produtividade da microalga *Scenedesmus acuminatus* (Lagerheim) Chodat em diferentes meios de cultivo. *Revista brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 250-255, 2013.
- BRITO, R. S.; FERREIRA, F.; LOURENÇO, N. D.; PINHEIRO, H. M.; MATOS, J. S. Espectrofotometria para monitorização da qualidade de água residual em drenagem urbana. *Recursos Hídricos*. Associação Portuguesa dos Recursos Hídricos, v. 34, n. 01, 2013.
- CARVALHO, E. M. de; OTTONELLI, F.; ANSILAGO, M.; GODOY, H. C.; NAKAGAKI, J. M.; RAMIRES, I. Growth kinetics of the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) in natural water enriched with NPK fertilizer. *Biochemistry And Biotechnology Reports*, v.01, n.02, 2012.
- CEREIJO; C. R.; SANTANA; H.; SIQUEIRA, F. G.; BRASIL, B. Spectrophotometry as a Method for Microalgae Cultivation Analysis. *Anais do IV SOLABIAA*, 2015.
- CORCINI, C. D.; JUNIOR, A. S. V.; PIGOZZO, R.; BONGALHARDO, D. C.; JUNIOR, L. T. Comparação de diferentes diluentes na mensuração da concentração espermática de suínos em espectrofotômetro Comparison of different diluents to measure swine sperm concentration on the spectrophotometer. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 32, n. suplemento 1, p. 1965-1968, 2011.
- DZIOSA, K.; MAKOWSKA, M. Monitoring of *Chlorella* sp. growth based on the optical density measurement. *Problemy Eksploatacji*, 2016.
- EATON, A.D.; CLESCERI, L.S; GREENBERG, A.E. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater .ed. American Public Health Association, Washington. p. 19, 1995.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA) United States. Shortterm methods for measuring the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. 3<sup>a</sup> ed. Cincinnati, OH.: U.S. Environmental Protection Agency, 1994. EPA 600/4-91/002.
- HOSSEINIZAND, H.; SOKHANSANJ, S.; JIM LIM, C. Studying the drying mechanism of microalgae *Chlorella vulgaris* and the optimum drying temperature to preserve quality characteristics. *Drying Technology*, n. 36 v 9, p. 1049-1060, 2018.
- LEITE, G. B.; PARANJAPE, K.; HALLENBECK, P. C. Breakfast of champions: fast lipid accumulation by cultures of *Chlorella* and *Scenedesmus* induced by xylose. *Algal Research*, v. 16, p. 338-348, 2016.

MARXEN, K.; VANSELOW, K. H.; LIPPEMEIER, S.; HINTZE, R.; RUSER, A. HANSEN, U. P. Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements. *Sensors*, v. 7, n. 10, p. 2080-2095, 2007.

PASCHOAL, L. R.; FERREIRA, W. A.; PRADO, M. R. D.; VILELA, A. P. O. Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 39, n. 1, p. 105-113, 2003.

RODRIGUES, L. H.; ARENZON, A.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T.; FONTOURAL, N. F. Algal density assessed by spectrophotometry: A calibration curve for the unicellular algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology*, v. 3, n. 8, 2011.

SILVA, P. F. N.; BALARIN, M. R. S.; MARUCHI, H. P.; FLAIBAN, K. K. M. C.; RODRIGUES MOROZ, L. R. Correlação entre o hemocitômetro e outras técnicas de rotina para a contagem do número de plaquetas em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (HV-UEL). *Semina: Ciências Agrárias*, v. 28, n. 4, 2007.

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

SOBRINHO, T. J. D. S. P.; DA SILVA, C. H. T. P.; DO NASCIMENTO, J. E.; MONTEIRO, J. M.; DE ALBUQUERQUE, U. P.; DE AMORIM, E. L. C. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhiniacheilantha* (Bongard) Steudel. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 44, n. 4, 2008.

VALER, R.M.; GLOCK, L. Quantificação de algas clorofíceas de interesse ecotoxicológico através do método espectrofotométrico. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 11 (2): 149 – 156, 1998.



### Capítulo III - Efeito tóxico da salinidade no cultivo da microalga *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae)

**Resumo:** *As microalgas são microrganismos que apresentam elevada sensibilidade a alterações físicas e químicas na água, podendo ser utilizadas em testes ecotoxicológicos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade da microalga de água doce **Chlorella sorokiniana** sob diferentes concentrações salinas. Foram empregadas concentrações de NaCl de 5 %, 10 %, 20 % e 30 %. Todos os ensaios continham a microalga **C. sorokiniana** e meio enriquecido com fertilizante químico a base de NPK e vinhaça de mosto de cana-de-açúcar. Os ensaios foram mantidos por 72 horas em incubadora Shaker de piso, em triplicatas, , agitação constante de (100 rpm), temperatura (25°C) e luminosidade controladas (1.500 LUX). Os resultados observados indicaram que todos os tratamentos contendo NaCl obtiveram percentual de inibição superior a 50 %. Os tratamentos com maiores concentrações de salinidade (20 e 30 %) obtiveram menores taxas de duplicação e densidade algal. Assim, pode-se inferir que a microalga apresentou sensibilidade frente a salinidade presente no meio.*

**Palavras-chave:** concentração salina, ecotoxicologia, microalgas.

### Toxic effect of salinity on microalgae cultivation *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae)

**Abstract:** *Microalgae are microorganisms that show high sensitivity to physical and chemical variations in water and can be used in ecotoxicological tests. Thus, the objective of this work was to evaluate the sensitivity of the freshwater microalgae **Chlorella sorokiniana** to different saline concentrations. NaCl concentrations of 5 %, 10 %, 20 % and 30 % were employed. All assays contained the microalgae **C. sorokiniana** and medium enriched with chemical feedstock NPK based and sugarcane vinasse. The assays were maintained for 72 hours in shaker incubator, in triplicates, constant shaking (100rpm), temperature (25°C) and controlled luminosity (1,500 LUX). The observed results indicated that all treatments containing NaCl had a percentage of inhibition greater than 50 %. The treatments with higher concentrations of salinity (20 and 30 %) obtained lower rates of duplication and algal density. Thus, it can be inferred that the microalga presented sensitivity to the salinity present in the medium.*

**Keywords:** saline concentration, ecotoxicology, microalgae.

## 1. INTRODUÇÃO

As microalgas possuem uma alta sensibilidade à alterações físicas e químicas do meio, além de um ciclo de vida curto e baixa necessidade nutricional (CARVALHO et al., 2012; ANSILAGO et al., 2016). Em função dessas características algumas espécies de microalgas tem se tornado indicadores de efeitos agudos e crônicos em ensaios ecotoxicológicos. Existem protocolos bem definidos para testes com algumas espécies dulcícolas de microalgas verdes, tais como *Chlorella vulgaris*, *Desmodesmus subspicatus*, *Monoraphidium dybowskii*, *Raphidocelis subcapitata* (sinonímia *Pseudokirchneriella subcapitata*) as quais são descritas em normas técnicas, como a NBR 12648 (ABNT, 2018) que descreve a metodologia de ensaio para algumas algas Chlorophyceae. Para algumas espécies marinhas, como *Skeletonema costatum*, *Phaeodactylum tricornutum* Bholin, *Minutocellus polimorphus*, *Thalassiosira pseudonana*, *Dunaliella tertiolecta*, *Tetraselmis chuii*, *Isochrysis aff. galbana*, *Chaetoceros calcitrans*, é possível encontrar as normas técnicas na NBR 16181 (ABNT, 2013).

As normas técnicas e protocolos para ensaios ecotoxicológicos com microalgas avaliam efeitos crônicos, ou seja, efeitos compreendidos em parte ou todo ciclo de vida do organismo-teste durante a exposição do ensaio, para amostras líquidas ou substâncias solúveis/dispersas em água. Para tais testes, é avaliado a inibição no crescimento microalgal em contraste ao crescimento da testemunha que não é exposta à amostra, podendo variar de 72h a 96h (ABNT, 2018). As normas técnicas, de modo geral, são bastante criteriosas e específicas, protocolando desde coleta, preparo, preservação e montagem do ensaio (ABNT, 2015, 2018).

Os ensaios com microalgas são utilizados desde a década de 1920, mas somente em 1970 iniciaram-se os ensaios ecotoxicológicos (MINEI, 2011). As microalgas possuem grande representatividade como produtoras primárias nos ecossistemas onde ocorrem, e um desequilíbrio na sua população poderá afetar toda a dinâmica dos níveis superiores do ecossistema em que estão presentes (REGINATTO, 1998).

Existem vários fatores importantes no desenvolvimento algal, como temperatura, luminosidade, disponibilidade de nutrientes, presença de metais e outros compostos que podem afetar de forma positiva ou negativa a duplicação celular (CARVALHO et al., 2012; ANSILAGO et al., 2016). Considerando que 95 % da água do planeta é salina, e que as microalgas estão presentes na maior parte dos ambientes aquáticos, surge a necessidade de se

avaliar a plasticidade algal em relação as concentrações de sais. Com isso, será possível determinar os fatores limitantes da concentração salina para o desenvolvimento da microalga e avaliar sua sensibilidade.

Neste trabalho utilizou-se a espécie *Chlorella sorokiniana*, uma Chlorophyceae de água doce, conhecida pelo alto percentual de carboidratos, vitaminas e proteínas, o que tornou seu gênero muito utilizado como fonte alimentar em sistemas de aquicultura (AKHTAR, 2008) e suplementação alimentar humano. Além disso, este gênero é largamente utilizado em estudos de produção de biomassa e fotossíntese, decorrente de sua elevada resistência à intensidades luminosas altas e capacidade de crescer em grandes variações de temperatura (MORITA et al., 2000, 2002). O objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade da microalga de água doce *C. sorokiniana* sob diferentes concentrações salinas.

## 2. METODOLOGIA

Foi utilizada a cepa da microalga *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae) adquirida da Fundação André Tosello (Ref. 211-32) e cultivada *in vitro* em meio com adição de: 1) 5 % de cloreto de sódio (NaCl); 2) 10 % de cloreto de sódio; 3) 20 % de cloreto de sódio; 4) 30 % de cloreto de sódio e 5) controle sem a solução salina. Todos os meios de cultivo foram preparados com a adição de 1 % da solução estoque de NPK e 1% de vinhaça concentrada do mosto de cana-de-açúcar. A solução estoque de NPK foi preparada com 0,70 g.L<sup>-1</sup> de adubo químico N:P:K (20-5-20 g/L<sup>-1</sup>), segundo Sipaúba-Tavares e Rocha, (2003), Carvalho et al., (2012) e Ansilago et al., (2016).

Os ensaios foram realizados em triplicadas, acondicionados em *Erlemeyers* de 250 mL, no período de 72 horas, em uma incubadora *shaker* de piso, com agitação contante, luminosidade (1500 lux) e temperatura controladas (25 °C).

Foram coletadas alíquotas de 2 mL no início do ensaio e a cada 24 horas para a contagem das células em câmara de *Neubauer* (hemocitômetro) durante 72h. Foram obtidos os valores de densidade, taxa de duplicação específica e percentual de inibição. A Análise de Variância (ANOVA) foi empregada para verificar diferenças estatísticas entre as concentrações salinas e o controle, seguido pelo teste de Tuckey com probabilidade de 95 % de confiança ( $p < 0,05$ ).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise de variância foi possível identificar um padrão para os parâmetros analisados. As microalgas cultivadas em meio com maior concentração de NaCl (20 % e 30 %) apresentaram valores de densidade celular e taxa de duplicação menores, com alto potencial de inibição (>80 %). Os tratamentos com menores concentrações salinas (5 % e 10 %) não apresentaram diferença estatística quando comparados ao tratamento controle (sem adição de NaCl) para densidade e taxa de duplicação. Todos tratamentos apresentaram percentual de inibição acima de 50 % nos meios salinos (Tabela 1).

A sensibilidade da microalga *Chlorella sorokiniana* ao meio de cultivo contendo concentrações salinas foi observado por meio da mortalidade da espécie acima de 50 % nas primeiras 24h de ensaio, principalmente nas concentrações de 20 e 30 % de NaCl, indicando o grau de toxicidade para a microalga. A adaptação das microalgas ao cultivo em águas salinas significaria uma potencialidade para o seu cultivo em meio saturado e, possivelmente, elevaria sua função biorremediadora de sais em águas residuárias. No entanto, com os resultados obtidos, foi possível inferir que a microalga *C. sorokiniana* não apresenta plasticidade adaptativa frente às condições dos meios testados.

Por outro lado, foi possível observar que a microalga *C. sorokiniana* apresentou sensibilidade às concentrações salinas, o qual infere potencialidade para o seu emprego em ensaios ecotoxicológicos na avaliação dos efeitos agudos e deletérios sobre a mortalidade e duplicação celular em condições de saturação salina. De acordo com a Norma Técnica 12648 microalgas da espécie *Chlorella vulgaris* já são empregadas em ensaios ecotoxicológicos para efeitos crônicos, nos quais todo tipo de ação, a nível de inibição celular (redução no crescimento em relação ao crescimento celular do controle) é incluso, seja esta aditiva, antagônica ou sinérgica.

**Tabela 1:** Médias ( $\pm$  desvio padrão) da densidade celular (número de células  $\times 10^5$ . mL<sup>-1</sup>), taxa de duplicação celular (%.dia<sup>-1</sup>) e percentual de inibição de duplicação (%) da microalga *C. Sorokiniana* para cada concentração de salinidade e controle (Ct).

	Densidade			Taxa Dupl. Cel.			% de inibição		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
<b>F</b>	64,1	45,1	83,3	49,1	16,5	43,6	60,7	14,2	1,1
<b>p</b>	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	0,40
<b>5%</b>	11,23 <sup>A</sup>	6,70 <sup>A</sup>	5,40 <sup>AB</sup>	0,13 <sup>A</sup>	0,03 <sup>A</sup>	0,01 <sup>A</sup>	52,96 <sup>A</sup>	65,68 <sup>A</sup>	80,29

	Densidade			Taxa Dupl. Cel.			% de inibição		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h
	±1,02	±0,26	±0,10	±0,01	±0,004	±0,003	±4,60	±5,06	±5,41
<b>10%</b>	9,37 <sup>A</sup>	5,43 <sup>AB</sup>	4,60 <sup>B</sup>	0,11 <sup>A</sup>	0,02 <sup>A</sup>	0,01 <sup>A</sup>	58,89 <sup>A</sup>	69,69 <sup>A</sup>	79,21
	±0,87	±0,30	±0,50	±0,01	±0,003	±0,003	±5,45	±3,52	±5,92
<b>20%</b>	4,20 <sup>B</sup>	3,83 <sup>B</sup>	4,33 <sup>B</sup>	0,030 <sup>B</sup>	0,01 <sup>A</sup>	0,01 <sup>A</sup>	88,95 <sup>B</sup>	84,30 <sup>B</sup>	79,21
	±0,30	±0,12	±0,56	±0,004	±0,004	±0,001	±1,62	±5,40	±2,48
<b>30%</b>	4,20 <sup>B</sup>	3,43 <sup>B</sup>	3,73 <sup>B</sup>	0,032 <sup>B</sup>	0,009 <sup>B</sup>	0,008 <sup>B</sup>	88,34 <sup>B</sup>	87,59 <sup>B</sup>	84,59
	±0,75	±0,20	±0,25	±0,012	±0,004	±0,0003	±4,25	±5,51	±0,62
<b>Ct</b>	16,30 <sup>A</sup>	9,13 <sup>A</sup>	9,33 <sup>A</sup>	0,22 <sup>A</sup>	0,05 <sup>A</sup>	0,03 <sup>A</sup>	-	-	-
	±1,90	±1,25	±0,50	±0,03	±0,012	±0,004	-	-	-

Em um estudo de sensibilidade da microalga marinha *Dunaliella tertiolecta*, Minei (2011) observou correlações significativas negativas para a taxa de crescimento celular com a salinidade. É preciso considerar que a microalga em questão tem origem marinha e o sal é um elemento essencial para o seu desenvolvimento. Fernandes et al., (2017) também não observaram inibição significativa da microalga de água doce *Scenedesmus* sp. submetida às diferentes concentrações salinas. No entanto, a concentração mais alta testada por estes autores foi de 5g/L de NaCl, enquanto que para *C. sorokiniana* a menor concentração utilizada foi de 11g/L (5 %).

Dessa forma, são necessários estudos que avaliem o cultivo de *C. sorokiniana* em concentrações salinas inferiores as analisadas no presente estudo, pra confirmar qual a plasticidade adaptativa desta espécie. Além de estudos que avaliem a toxicidade, é importante avaliar a variabilidade e reprodutibilidade dos resultados encontrados, de forma que tais resultados e metodologias ecotoxicológicas possam ser validadas, diversos autores apresentam cartas-controle, tais como Pereira et al. (2010) e Turner & Charlton (2005) realizaram com microalgas, que tem como objetivo estabelecer uma faixa de aceitação para os dados experimentais, avaliando o desempenho, exatidão e precisão não só dos ensaios realizados mas dos laboratórios que os realizam.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A microalga *Chlorella sorokiniana* apresentou elevada sensibilidade a diferentes concentrações de salinidade, com um percentual de inibição superior a 50 % em todos os ensaios contendo NaCl. Verificou-se que nos ensaios com maiores concentrações salinas, os valores de densidade celular e taxa de duplicação foram menores, com maior potencial de inibição.

Assim, pode-se inferir que nas condições de estudo apresentada, houve inibição do crescimento da microalga, mostrando o efeito tóxico da salinidade sobre este microrganismo.

## 5. REFERÊNCIAS

- AKHTAR, N., IQBAL, M., ZAFAR, S. I., & IQBAL, J.; Biosorption characteristics of unicellular green alga *Chlorella sorokiniana* immobilized in loofa sponge for removal of Cr (III). *Journal of Environmental Sciences*, 2008.
- ANSILAGO, M.; OTTONELLI, F.; CARVALHO, E. M. Cultivo da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* em escala de bancada utilizando meio contaminado com metais pesados. *Engenharia Sanitária e Ambiental (Online)*, v.21, n. 3, p.603-608, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS.. NBR 15469; Ecotoxicologia aquática — Ecotoxicologia - Coleta, preservação e preparo de amostras, 2015.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS.. NBR 12648; Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica — Método de ensaio com algas (*Chlophyceae*), 2018.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR16181; Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica — Método de ensaio com microalgas marinhas, 2013.
- CARVALHO, E. M. de; OTTONELLI, F.; ANSILAGO, M.; GODOY, H. C.; NAKAGAKI, J. M.; RAMIRES, I. Growth kinetics of the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) in natural water enriched with NPK fertilizer. *Biochemistry And Biotechnology Reports*, v.01, n.02, p.14-18, 2012.
- FERNANDES, M. S. M., FRANÇA, K. B., ALVES, R. V., PEARSON, H. W., LIMA, S. A., COSTA, T. S., & GUIMARÃES, B. D. S. Avaliação do crescimento da microalga *Scenedesmus sp.* em diferentes concentrações de NaCl. *Engevista*, v. 19, n. 1, p. 185-193, 2017.
- MINEI, C. C.; Sensibilidade da microalga *Dunaliella tertiolecta* BUTCHER a diferentes substâncias químicas utilizadas como referência em ensaios ecotoxicológicos. 2011. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) - Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo. 121 p. 2011.
- MORITA, M.; WATANABE, Y.; SAIKI, H. High photosynthetic productivity of green microalga *Chlorella sorokiniana*. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 87, n. 3, p. 203-218, 2000.
- MORITA, M.; WATANABE, Y.; SAIKI, H. Photosynthetic productivity of conical helical tubular photobioreactor incorporating *Chlorella sorokiniana* under field conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 77, n. 2, p. 155-162, 2002.
- PEREIRA, S. A., NASCIMENTO, I. A., LEITE, M. B. N., CRUZ, A. C., BARROS, D. A., ARAÚJO, V. Q., SAMPAIO, L. M. A., NASCIMENTO, N. C.; Sensibilidade de quatro organismos-teste (*Skeletonema costatum*, *Tetraselmis chunii*, *Crassostrea rhizophorae* e *Echinometra lucunter*) ao dodecil sulfato de sódio: elaboração das cartas-controlê. *Diálogos e Ciência. Revista da Faculdade de Tecnologia e Ciências*, 2010.
- REGINATTO, V.; Avaliação do ensaio de toxicidade com a alga *Scenedesmus subspicatus* para o estudo de efluentes industriais - Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O.; Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos. 2 ed. São Carlos: RiMa. 2003.
- TURNER, ROBERT J.; CHARLTON, STEVEN J.; Assessing the minimum number of data points required for accurate IC50 determination. *Assay and drug development technologies*, v. 3, n. 5, p. 525-531, 2005.

## Capítulo IV - Sensibilidade da microalga *Chlorella sorokiniana* ao inseticida fipronil

**Resumo:** *O fipronil é um inseticida comercial utilizado principalmente na agricultura contra lepidópteros, ortópteros e coleópteros em estágios iniciais de vida. Os agrotóxicos são os principais contaminantes dos recursos hídricos, provocando efeitos agudos e crônicos à maioria dos organismos aquáticos. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a sensibilidade da microalga de água doce **Chlorella sorokiniana** na presença do Fipronil. Os resultados observados neste trabalho indicaram a microalga **C. sorokiniana** apresentou baixa sensibilidade ao Fipronil, não sendo indicada como indicadora em ensaios ecotoxicológicos sob contaminação deste inseticida.*

**Palavras-chave:** pesticida, ecotoxicologia, Chlorophyceae.

## Sensitivity of microalgae *Chlorella sorokiniana* to insecticide fipronil

*Abstract: Fipronil is a commercial insecticide used mainly in agriculture against lepidoptera, orthoptera and coleoptera in the early stages of life. Considering that pesticides are the main contaminants of water resources and that microalgae are organisms that are sensitive to changes in the environment, with the capacity to remove and degrade nutrients that can cause eutrophication of the environment, this work aimed to evaluate the sensitivity of the microalgae **Chlorella sorokiniana** in the presence of the Fipronil in different concentrations. The observed results of this study indicated that in these conditions the **microalgae C. sorokiniana** presented resistance to Fipronil, not being indicated as a bioindicator of contamination of this insecticide.*

**Keywords:** pesticide, ecotoxicology, Chlorophyceae.



## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui cerca de 22% do solo agricultável do mundo e possui um setor de agronegócio moderno e competitivo em cenário internacional (LOURENÇO e DE LIMA, 2009). Em consequência dos avanços das fronteiras agrícolas também se observa um aumento considerável no uso de agrotóxicos, culminando na contaminação do solo e dos corpos hídricos, já que somente 0,1% destes produtos atingem os organismos-alvo (PIMENTEL & LEVITAM, 1986).

Os agrotóxicos e agroquímicos são os produtos que mais contaminam recursos hídricos em todo o mundo (RAND, 1995; CELLA, 2009), o que pode causar a contaminação diretamente de organismos aquáticos, causando mortalidade, ou indiretamente, afetando taxas de crescimento, reprodução ou mesmo o nicho natural de organismos (VAN DERROOST et al., 2003).

O fipronil é um inseticida comercial que contém um substituinte trifluorometilsulfinil, o que o difere de outros agrotóxicos por ter ação a longo prazo contra lepidópteras, ortópteras e coleópteros em estágios iniciais de vida, mesmo quando aplicado em baixas dosagens (COLLIOT, 1992; HAINZL, 1996). O seu mecanismo de ação é pelo bloqueio, não competitivo, pré e pós-sináptico da passagem dos íons cloro pelos neurotransmissores GABA e dos canais de glutamato-cloro, matando os parasitas por hiper excitação (QU et al., 2014; COLE et al., 1993). O fipronil tem estrutura quirál, sendo R-Fipronil e S-Fipronil seus enantiômeros. Estudos indicam que tais enantiômeros possuem diferentes processos de metabolismo, degradação e transformação, além de possuir toxicidade enantiosseletiva de acordo com o organismo alvo (QU et al., 2014; LU et al., 2010, DORAN et al., 2009).

Tendo em vista o efeito recalcitrante e tóxico do fipronil no solo e as possibilidades deste atingir os recursos hídricos, é fundamental que se estabeleçam protocolos ecotoxicológicos para avaliar o seu efeito sobre os organismos não alvo. Ensaios ecotoxicológicos com organismos representativos do ambiente auxiliam no monitoramento ambiental, uma vez que podem predizer possíveis impactos de xenobióticos ao ambiente, além de estimar os efeitos que causam na espécie em questão (ESPÍNDOLA, 2003; IGNÁCIO, 2014; RAMSDORF, 2007).

As microalgas são organismos fundamentais para a manutenção da biodiversidade e dos ecossistemas aquáticos. Participam da cadeia trófica de muitos organismos, apresentam alta sensibilidade a alterações ambientais, ciclo de vida curto e baixa necessidade nutricional (ANSILAGO et al., 2016). Com base nessas características, as microalgas têm sido utilizadas em ensaios de avaliação de toxicidade crônica em diferentes concentrações de efluentes ou substâncias químicas. Os protocolos já estão bem estabelecidos para as espécies *Raphidocelis subcapitata* (sinonímia *Pseudokirchnerilla subcapitata*), *Chlorella vulgaris*, *Desmodesmus Subspicatus* e outras algas unicelulares. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito tóxico do inseticida fipronil sobre a microalga *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae).

## 2. METODOLOGIA

Foram utilizadas cepas da microalga *Chlorella sorokiniana* (Chlorophyceae) adquirida da Fundação André Tosello (Ref. 211-32), cultivada *in vitro* no laboratório do Centro de Pesquisa em Biodiversidade (CPBio) na Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS).

Para o cultivo da microalga foram utilizados tratamentos com diferentes concentrações de Fipronil (Regente<sup>®</sup> WG 800 BASF), 75 mg.L<sup>-1</sup>, 150 mg.L<sup>-1</sup>, 300 mg.L<sup>-1</sup>, 600 mg.L<sup>-1</sup> e o controle no qual não houve adição do fipronil.

Os cultivos foram realizados em Erlenmeyers de 125 mL, nos quais foram adicionados 5 mL de inóculo da microalga *C. sorokiniana* em 25 mL de meio ATZ-R nas concentrações em g.L<sup>-1</sup> : Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2,4); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2,0); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,01); CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,01), e enriquecido com 1% de NPK (20-5-20 g.L<sup>-1</sup>) e 1 % de vinhaça de mosto de cana-de-açúcar (nutrientes para as microalgas).

As amostras foram acondicionadas em incubadora shaker de piso, em triplicatas, com temperatura (25°C), agitação (100 rpm) e luminosidade (1.500 LUX) constantes. Foram retiradas alíquotas nos tempos de 0h, 12h, 24h, 48h e 72h e mensurada a densidade, crescimento específico e percentual de inibição. A densidade foi obtida por meio da contagem celular pelo hemocítmetro (Câmara de Neubauer), a taxa de duplicação (densidade final – densidade inicial/ horas) e o percentual de inibição ( $[\text{controle} - \text{amostra} / \text{controle}] \times 100$ ) a partir dos valores da densidade; com os valores inferidos foi realizado análise de covariância (ANCOVA).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando analisada as curvas de crescimento do cultivo pela análise de covariância (ANCOVA) verifica-se diferença estatística significativa para os valores do percentual de inibição ( $F_{4,65}: 7,96 p < 0,05$ ), crescimento específico ( $F_{4,65}: 3,97 p < 0,05$ ) e densidade ( $F_{4,65}: 6,76 p < 0,05$ ).

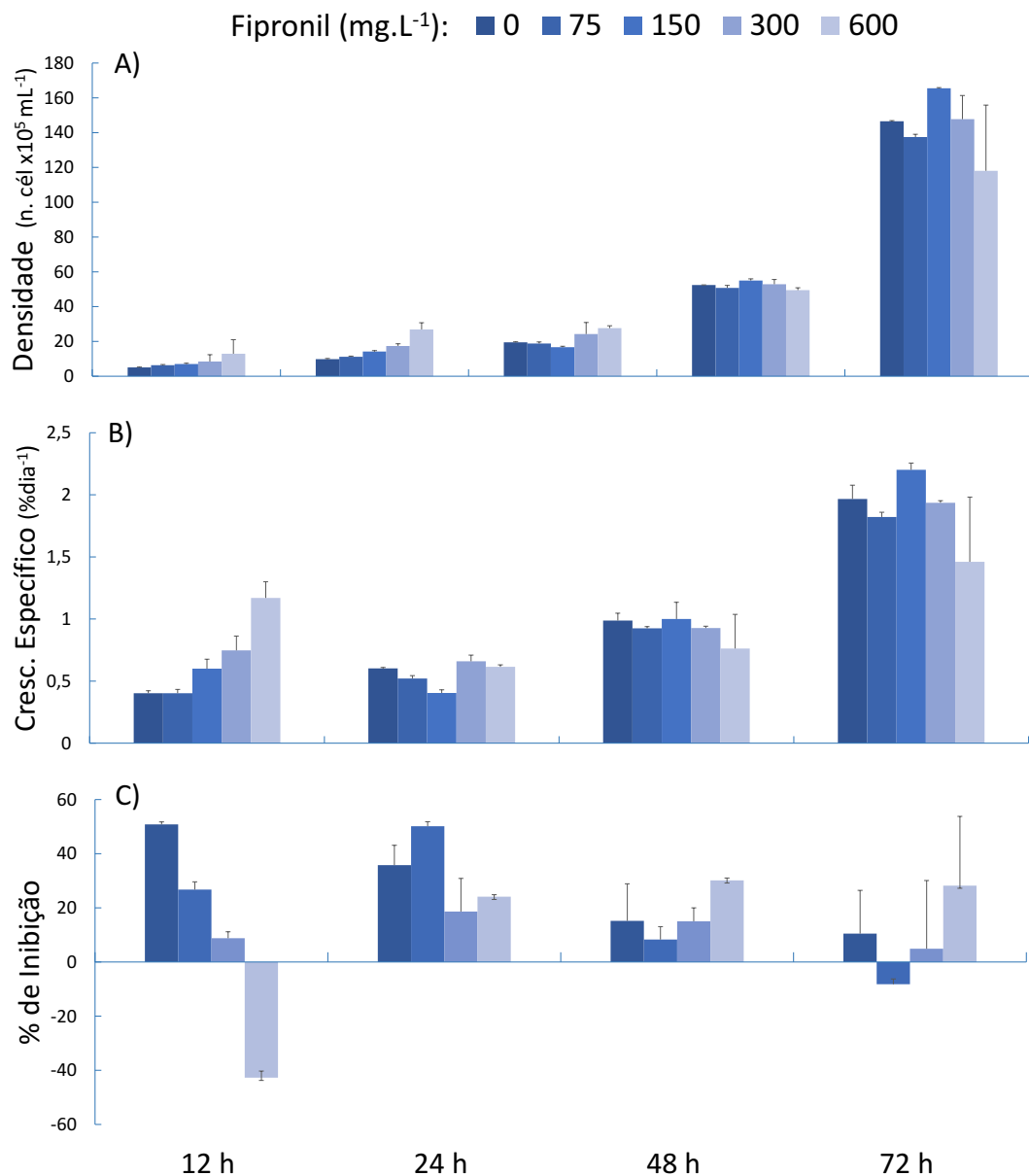
Quando analisada a densidade (Figura 1a) e a taxa de crescimento específico da microalga (Figura 1b) observa-se um elevado aumento celular em 72 horas de ensaio para todos os tratamentos contaminados com fipronil e para o controle. Ao analisar o percentual de inibição é possível observar um efeito agudo (12 horas de ensaio) no tratamento contaminado com  $75 \text{ mg.L}^{-1}$  fipronil e um efeito crônico no tratamento contaminado com  $600 \text{ mg.L}^{-1}$  fipronil (Figura 1c).

Apesar das diferenças observadas entre os tratamentos não é possível inferir sensibilidade da microalga *C. sorokiniana* ao contaminante fipronil. Diante dos resultados apresentados, a microalga *C. sorokiniana* não é indicada para análise ecotoxicológica do composto agroquímico fipronil.

Em outros ensaios na literatura é possível também verificar resistência de microalgas a diversos contaminantes. Moraes et al. (2014) realizou bioensaios com o antimicrobiano pentaflorofenol, ao qual a microalga *Chlorella vulgaris* apresentou resistência, ao contrário da *Microcystis aeruginosa* que se mostrou sensível ao mesmo antimicrobiano. No ensaio de Lai et al. (2009) a microalga *Chlorella pyrenoidosa* apresentou resistência ao antibiótico tianfenicol. Contudo, há diversos trabalhos na literatura em que há sucesso na utilização de microalgas como organismos testes. No trabalho de González-Pleiter et al. (2013) que testou a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* em presença de cinco antibióticos foi observado resistência à amoxicilina, mas sensibilidade aos outros quatro (eritromicina, levofloxacina, norfloxacina e tetraciclina). Ragassi et al. (2017) também verificaram sensibilidade das microalgas *Chlorella vulgaris* e *Pseudokirchneriella subcapitata* para o herbicida bromoxynil e aos fungicidas fluazinam e macozeb.

O aumento do crescimento específico da microalga *Chlorella sorokiniana* no meio contendo o inseticida fipronil pode estar relacionado ao seu mecanismo de ação, através do bloqueio pré e pós sináptico da passagem dos íons cloro pelos neurotransmissores GABA, matando os parasitas por hiper excitação. No caso específico da microalga essa ação por neurotransmissores não seria possível em função da sua estrutura biológica pouco complexa. Além disso, o fipronil é um composto quiral e possui os enantiômeros S-Fipronil e R-Fipronil, e alguns estudos realizados com microalgas mostraram que a toxicidade do fipronil pode variar

de acordo com a quiralidade deste inseticida sobre determinados organismos (QU et al., 2014).



**Figura 1.** Médias ( $\pm$  erro padrão) da densidade, crescimento específico máximo e percentual de inibição de duplicação celular da microalga *C. sorokiniana* cultivadas em diferentes concentrações de fipronil.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desta forma, pode-se inferir que nas condições de estudo apresentadas, não houve inibição do crescimento da microalga *Chlorella sorokiniana* pelo fipronil em nenhuma das concentrações testadas, indicando a resistência da microalga ao inseticida. A microalga *C. sorokiniana* não é recomendada como organismo teste em ensaios de toxicidade do fipronil

nas concentrações apresentadas. Por outro lado, os resultados inferiram um elevado potencial da microalga para a remediação do fipronil em ambientes aquáticos, necessitando de novos estudos.

## 5. REFERÊNCIAS

- ANSILAGO, M.; OTTONELLI, F.; CARVALHO, E. M. Cultivo da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* em escala de bancada utilizando meio contaminado com metais pesados. *Engenharia Sanitária e Ambiental (Online)*, v.21, n. 3, p.603-608, 2016.
- CELLA, A. L.; Ecotoxicologia do agrotóxico fipronil em pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmerg) e paulistinha (*Danio rerio*) e resíduos de agrotóxicos na bacia do rio Corumbataí. 2009.
- COLLIOT, F., KUKOROWSKI, K. A., HAWKINS, D., & ROBERTS, D. A.; Fipronil: a new soil and foliar broad spectrum insecticide. In: Brighton Crop Protection Conference Pests and Diseases. BRIT CROP PROTECTION COUNCIL, 1992.
- DORAN, G., EBERBACH, P. & HELLIWELL, S.; Sorption and degradation of fipronil in flooded anaerobic rice soils. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 57, n. 21, p. 10296-10301, 2009.
- ESPÍNDOLA, E. L. G.; BRIGANTE, J.; DORNFELD, C. B. Estudos ecotoxicológicos no rio Mogi-Guaçu. BRIGANTE, J., ESPÍNDOLA, ELG *Limnologia fluvial: um estudo no rio Mogi-Guaçu*, p. 129-180, 2003.
- GONZÁLEZ-PLEITER, M., GONZALO, S., RODEA-PALOMARES, I., LEGANÉS, F., ROSAL, R., BOLTES, K., & FERNÁNDEZ-PIÑAS, F.; Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: implications for environmental risk assessment. *Water research*, v. 47, n. 6, p. 2050-2064, 2013.
- HAINZL, D.; CASIDA, J. E.; Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 93, n. 23, p. 12764-12767, 1996.
- IGNÁCIO, N. F., AMÉRICO, J. H. P., SILVA, M. A., CARRASCHI, S. P., IKEFUTI, C. V., CRUZ, C., & MACHADO-NETO, J. G.; Classificação ecotoxicológica do inseticida Fipronil para o peixe de espécie pacu. In: Congresso Nacional de Meio Ambiente de Poços de Caldas. 2014.
- LAI, H. T., HOU, J. H., SU, C. I., & CHEN, C. L.; Effects of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol on growth of algae *Chlorella pyrenoidosa*, *Isochrysis galbana*, and *Tetraselmis chui*. *Ecotoxicology and Environmental safety*, v. 72, n. 2, p. 329-334, 2009.
- LOURENÇO, J. C., & DE LIMA, C. E. B.; Evolução do agronegócio brasileiro, desafios e perspectivas. *Observatorio de la Economía Latinoamericana*, n. 118, 2009.
- PIMENTEL, D.; LEVITAN, L.; Pesticides: amounts applied and amounts reaching pests. *Bioscience*, v. 36, n. 2, p. 86-91, 1986.
- QU, H., MA, R. X., LIU, D. H., WANG, P., HUANG, L. D., QIU, X. X., & ZHOU, Z. Q.; Enantioselective toxicity and degradation of the chiral insecticide fipronil in *Scenedesmus obliquus* suspension system. *Environmental toxicology and chemistry*, v. 33, n. 11, p. 2516-2521, 2014.
- RAGASSI, Bruna; AMÉRICO-PINHEIRO, Juliana Heloisa Pinê; DA SILVA JUNIOR, Osmar Pereira. Ecotoxicidade de agrotóxicos para algas de água doce. *Revista Científica ANAP Brasil*, v. 10, n. 19, 2017.
- RAND, G. M.; (Ed.). *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment*. CRC press, 1995.

RAMSDORF, W.A. Utilização de duas species de *Astyanax* (*Astyanax* sp e *A. altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Canguiri – UFPR). Dissertação de Mestrado, Curitiba, 2007.

VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N. PE.; Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.