

QUANTIFICAÇÃO DE ALGAS CLOROFÍCEAS DE INTERESSE ECOTOXICOLÓGICO ATRAVÉS DO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO.

VALER, R.M.¹ & GLOCK, L.²

¹Laboratório de Limnologia e Biotecnologia Vegetal – PUCRS. Av.Ipiranga, 6681, prédio 12 C, sala 253. Fone: 320-3500 ramal 4148. CEP 90619-900, Porto Alegre, RS, Brasil. e-mail valer@music.pucrs.br

²Professor de Bioestatística - Programa de Pós-Graduação em Biociências, Fac.Biociências – PUCRS

RESUMO: Quantificação de algas clorofíceas de interesse ecotoxicológico através do método espectrofotométrico. Para a maioria das espécies algais, principalmente as cultivadas em laboratório para alimento do zooplâncton e aquelas utilizadas em testes de ecotoxicidade, tem-se usado diferentes métodos para quantificação e avaliação do crescimento em condições artificiais. O método espectrofotométrico tem sido muito utilizado, porém, sem critérios definidos. O presente trabalho visa a determinação dos padrões ópticos básicos e a correlação com a biomassa de culturas unialgais de espécies de importância ecotoxicológica. Foram utilizadas culturas axênicas das espécies *Chlamydomonas reinhardtii*, *Scenedesmus communis*, *Cryptomonas phaseolus* e *Selenastrum rinoi*, em 5 concentrações para cada uma. A partir da leitura da absorbância e quantificação do número de células foram obtidas as equações de regressão para 2 modelos de espectrofotômetros e 2 comprimentos de onda diferentes, permitindo, de modo prático e seguro, quantificar a biomassa algal a partir da mensuração óptica.

Palavras-chave: Quantificação, culturas, algas clorofíceas, espectrofotometria.

ABSTRACT: Quantification of chlorophyceae algae of ecotoxicological interest through spectrophotometric method. Different methods are used to quantify and study the growth of algae at laboratory conditions, especially the species that are used to feed zooplankton and those used in ecotoxicologic tests. The spectrophotometric method has been used, however, without standartization. The present paper aims to determine the basic optical features and the correlation with the biomass of unialgal cultures. Five different concentrations of pure cultures from each of the species *Chlamydomonas reinhardtii*, *Scenedesmus communis*, *Cryptomonas phaseolus* e *Selenastrum rinoi* were tested. Regression equations from absorbance values and quantification of the number of cells, with the use of 2 spectrophotometers models at 2 different wavelengths, demonstrated that optical measurement is a practical and safe way to algae biomass estimatives.

Key-words: Quantification, cultures, Chlorophyceae algae, spectrophotometry.

INTRODUÇÃO

O método tradicional para o estudo das comunidades fitoplanctônicas baseia-se na quantificação das células em microscópio invertido. Porém, tal método necessita de técnicos altamente treinados, além de grande demanda de tempo para análise das amostras. O acompanhamento do crescimento, bem como da concentração algal (n° céls/ml), pela mensuração óptica, vem sendo muito utilizado como um método prático e rápido (Wong *et al.*, 1983).

Segundo Mittenzwey *et al.* (1992), a quantificação do fitoplâncton é, via de regra, determinada em laboratório pela mensuração de massa e volume, contagem das células ou análise de pigmentos. Porém, esses métodos são muito trabalhosos. Os métodos radiométricos, como o espectrofotométrico, são mais práticos e permitem mensurar opticamente partículas suspensas, como as células algais.

Um exemplo de aplicação deste método pode ser encontrado na norma Cetesb L5.018 abr/86. Nesta, a correlação absorvância / concentração celular, para *Chlorella vulgaris*, é de $0,3/6,0 \times 10^6$ céls/ml, a um comprimento de onda de 440 m. Obtida a correlação, as mensurações posteriores ficam simplificadas.

Eaton *et al.* (1995) recomenda este método para o monitoramento da concentração algal e dos pigmentos fotossintéticos (determinação da clorofila-a) utilizando um espectrofotômetro ou colorímetro, a um comprimento de onda de 750 nm, padronizado para corrigir a turbidez da amostra. Porém, é fundamental que seja indicado o equipamento utilizado, modelo, cubeta, comprimento de onda e o equivalente em biomassa (n° céls/ml) obtido previamente através de câmaras de contagem. Mittenzwey *et al.* (1992) aconselha o uso da faixa de luz vermelha (700-750nm), porque a radiação vermelha não penetra profundamente no líquido da amostra e a absorção de luz por outras partículas suspensas é menor nesta faixa do espectro.

Wong *et al.* (1983) advertem para as vantagens e desvantagens de avaliar a biomassa algal por métodos isolados: leitura da absorvância ou contagem do número de células. O primeiro é um método de baixo custo e permite quantificar amostras grandes; porém, não faz distinção entre células vivas e mortas, e pode considerar também partículas de restos metabólicos, resultando em pouca precisão. O segundo método também é de baixo custo, permite calcular as taxas reprodutivas e detectar alterações morfológicas; porém, trata-se de um trabalho exaustivo e subjetivo. Sendo assim, a combinação dos dois métodos aumenta a precisão dos resultados e a praticidade, pois envolve menos tempo. Os padrões de equivalência são definidos através da quantificação do número de células em câmaras de contagem e leitura da absorvância da amostra, sendo que quanto maior a concentração de partículas na suspensão, maior a quantidade de luz absorvida, e conseqüentemente, maior o valor da absorvância.

Segundo Eaton (1995), várias espécies de microalgas tem sido utilizadas em testes de ecotoxicidade, nos quais é avaliado o potencial tóxico de efluentes industriais ou substâncias específicas presentes na água, ao organismo testado. Neste contexto, avaliação do efeito de herbicidas sobre o desenvolvimento de microalgas foi realizada por Ferreira *et al.* (1998). Taub (1984) sugere o uso de comunidades algais como modelos biológicos para o monitoramento de ecossistemas aquáticos. Culturas unialgais com elevada capacidade de de-

envolvimento em meios artificiais, e que representam fonte potencial de alimento para o zooplâncton dos modelos biológicos, tem sido amplamente utilizadas. Os cultivos de microalgas também são essenciais para o fornecimento de alimento a grupos zooplancônicos, muitos deles utilizados em bioensaios. A determinação da concentração algal fornecida, conforme exigência das normas técnicas, pode ser realizada por espectrofotometria. (Cetesb, 1986; Cardoso & Valer, 1996)

Portanto, este trabalho visa correlacionar a densidade óptica com a biomassa de culturas unialgais de espécies de importância ecotoxicológica, permitindo mensurar o volume de alimento a ser fornecido para manutenção de organismos utilizados em bioensaios.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas culturas axênicas das microalgas *Chlamydomonas reinhardtii*, *Scenedesmus communis*, *Cryptomonas phaseolus* e *Selenastrum rinoi*, obtidas do Banco de Algas do Laboratório de Limnologia e Biotecnologia Vegetal da PUCRS. Estas foram selecionadas com base no interesse em manter cultivos de determinadas espécies, principalmente aquelas utilizadas diretamente em testes de toxicidade ou como fonte de alimento para o zooplâncton.

As culturas de estoque são mantidas em meio de cultivo "D" (Jebram, 1993), em sala climatizada com temperatura de $18 \pm 2^\circ\text{C}$ e com iluminação artificial (lâmpada fluorescente branca) de 844 lux por um fotoperíodo de 12 horas, com renovações mensais do meio de cultivo.

A partir das culturas de estoque, para cada espécie, inicialmente foram feitas quantificações em microscópio óptico Zeiss Axioplan, com o auxílio da Câmara de Neubauer, segundo técnica descrita por Guillard (1978), e preparadas diluições em meio D a partir da solução mãe (10^5 céls/ml), atingindo as concentrações A, B, C, D e E, respectivamente de 1; 2,5; 5; 7,5 e 10×10^4 céls/ml, com um volume final de 30ml.

Para as leituras, foram utilizados dois modelos de espectrofotômetros (Tab.I).

Tabela I - Características ópticas dos espectrofotômetros utilizados.

Modelo	Cary 1-E	B 442
Fabricante	Varian	Micronal
Cubetas	Polietileno - 4mm	Acrílico - 10mm
Escala	190 a 900nm	340 a 1000nm
Feixe de luz	UV-VIS	UV-VIS

Através do método de varredura, no modelo Cary 1-E (Varian), inicialmente foi tomada a distribuição espectral da absorvância de todas as espécies, nas cinco concentrações, num intervalo 600-750 nm, a fim de verificar os picos de absorção de luz.

Posteriormente, foram tomadas leituras de absorvância no Cary 1-E (Varian) e no B442 (Micronal), para cada amostra, no comprimento de onda no qual ocorreram os picos de absorção e em 750nm, o qual é recomendado por Eaton *et al.* (1995) para descontar a turbidez quando existem partículas em suspensão na amostra. Em ambos os casos, o equipamento foi calibrado com "branco", representado pelo próprio meio de cultivo algal.

As leituras e as quantificações foram tomadas no início e ao final de 7 dias.

Análise estatística dos dados através do programa Excel 97 permitiu calcular os coeficientes de correlação de Pearson (r), os coeficientes de determinação (r^2) e a estimação das retas de regressão que expressam as relações entre as leituras de absorvância nos dois equipamentos testados para os diferentes comprimentos de onda; e entre as variáveis absorvância e número de células, nos mesmos parâmetros.

Foram também comparadas as diferenças entre as médias dos valores de absorvância obtidos nos dois equipamentos, para os dois comprimentos de onda. Em todos os casos, os resultados foram testados através do teste-t de Student (bicaudal), sendo que o nível de significância foi considerado significativo quando $P \leq 0,05$. (Zar, 1996)

RESULTADOS

A análise da distribuição espectral da absorvância mostrou picos de absorção de luz a um comprimento de onda semelhante para todas as espécies, em torno de 687nm, sendo todas as espécies clorofíceas. Sabe-se que as clorofilas extraídas apresentam pico de absorção em torno de 663nm. Com base nas observações de Mittenzwey *et al.* (1992), isto pode sugerir a influência de outros sólidos suspensos na amostra ou a presença de substâncias amarelas presentes no meio de cultivo, caracterizadas pela alta absorção específica em torno de 700nm. O resultado também pode ter sido influenciado pelo efeito das membranas e parede celular, já que as amostras são compostas por células intactas, e não somente extrato do pigmento.

Foi observado um alto índice de correlação entre as leituras obtidas nos dois equipamentos, para ambos os comprimentos de onda utilizados. Alta correlação também foi obtida entre absorvância e número de células, para os 2 equipamentos, nos 2 comprimentos de onda. Como as correlações foram altas e significativas para todas as espécies, isso indica que a probabilidade da regressão ter sido ao acaso é muito pequena. O cálculo dos coeficientes de determinação ($0 < r^2 < 1$) demonstrou que a variação obtida foi devida à regressão, e não obra do acaso.

O teste de significância (teste-t) demonstrou diferença significativa ($\alpha \leq 0,05$) para o B442 em 750nm. No Cary 1-F, esta diferença não se mostrou significativa. (Tab.II)

A análise de regressão permitiu calcular o número de células algais a partir da leitura da absorvância, através das equações de regressão obtidas e apresentadas nas figuras 1 a 4.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Para aplicação das equações apresentadas em culturas algais de concentrações muito baixas ou elevadas, isto é, fora do intervalo previsto (10^4 a 10^5 céls/ml), o erro de estimação é alto, sendo este definido como a diferença entre a pontuação obtida e a estimada. Portanto, o uso das equações apresentadas neste trabalho somente é adequado para concentrações algais na ordem de 10^4 a 10^5 céls/ml. Para concentrações fora deste intervalo, é recomendada nova análise de regressão, conforme parâmetros definidos.

Os resultados demonstraram, comparando-se os dados obtidos nos 2 equipamentos e nos 2 comprimentos de onda, que houve diferença significativa para o B 442 em 750nm, indicando uma maior sensibilidade do equipamento nas leituras, a esse comprimento de onda.

Porém, o modelo experimental testado pode ser executado em qualquer espectrofotômetro disponível, desde que sejam previamente definidas as equações de regressão. As equações apresentadas neste trabalho permitem estimar a concentração algal a partir da leitura da absorbância, com rapidez e segurança na obtenção dos resultados dos testes ecotoxicológicos, visto que as questões ambientais geralmente são emergenciais e exigem soluções imediatas.

Tabela II – Síntese dos resultados obtidos na análise de correlação entre as variáveis absorbância x número de células algais, onde r = índice de correlação, r^2 = índice de determinação e P = grau de significância. (* significativo para $\alpha \leq 0,01$; ** significativo para $\alpha \leq 0,05$).

		<i>Cblamydomonas reinhardtii</i>	<i>Scenedesmus communis</i>	<i>Cryptomonas phaseolus</i>	<i>Selenastrum rinoi</i>	
Correlação Cary / B 442	687nm	$r=0,938992$	$r=0,993017$	$r=0,96669$	$r=0,998054$	
		$r^2=0,881706$ ($P=5,6$ E-05)	$r^2=0,986083$ ($P=1,03$ E-08)	$r^2=0,934489$ ($P=5,17$ E-06)	$r^2=0,996111$ ($P=6,27$ E-11)	
	750nm	$r=0,950892$	$r=0,995818$	$r=0,969199$	$r=0,992816$	
		$r^2=0,904195$ ($P=2,4$ E-05)	$r^2=0,991653$ ($P=1,33$ E-09)	$r^2=0,939348$ ($P=3,79$ E-06)	$r^2=0,985684$ ($P=1,16$ E-08)	
Correlação absorbância / número de células	Cary	687nm	$r=0,957053$	$r=0,964936$	$r=0,96511$	$r=0,928533$
			$r^2=0,915951$ ($P=1,41$ E-05)	$r^2=0,931101$ ($P=6,34$ E-06)	$r^2=0,931437$ ($P=6,22$ E-06)	$r^2=0,862173$ ($P=0,000105$)
	750nm	$r=0,958944$	$r=0,963874$	$r=0,963294$	$r=0,928933$	
		$r^2=0,919574$ ($P=1,18$ E-05)	$r^2=0,929054$ ($P=7,13$ E-06)	$r^2=0,927935$ ($P=7,6$ E-06)	$r^2=0,862916$ ($P=0,000102$)	
	B 442	687nm	$r=0,942121$	$r=0,946391$	$r=0,875488$	$r=0,929572$
			$r^2=0,887591$ ($P=4,58$ E-05)	$r^2=0,895655$ ($P=3,39$ E-05)	$r^2=0,76648$ ($P=0,000902$)	$r^2=0,864105$ ($P=9,88$ E-05)
	750nm	$r=0,885916$	$r=0,948301$	$r=0,873516$	$r=0,901853$	
		$r^2=0,784847$ ($P=6,44$ E-04)	$r^2=0,899275$ ($P=2,94$ E-05)	$r^2=0,76303$ ($P=0,000959$)	$r^2=0,81334$ ($P=0,00036$)	
Teste-t	687nm	0,099006	0,089505	0,32276	0,05199	
Cary/B 442	750nm	0,00372 *	0,008178 *	0,021686 **	0,002638 *	
Teste-t	Cary	0,739438	0,724907	0,896801	0,458052	
687/750nm	B 442	0,005731 *	0,008134 *	0,003096 *	0,007857 *	

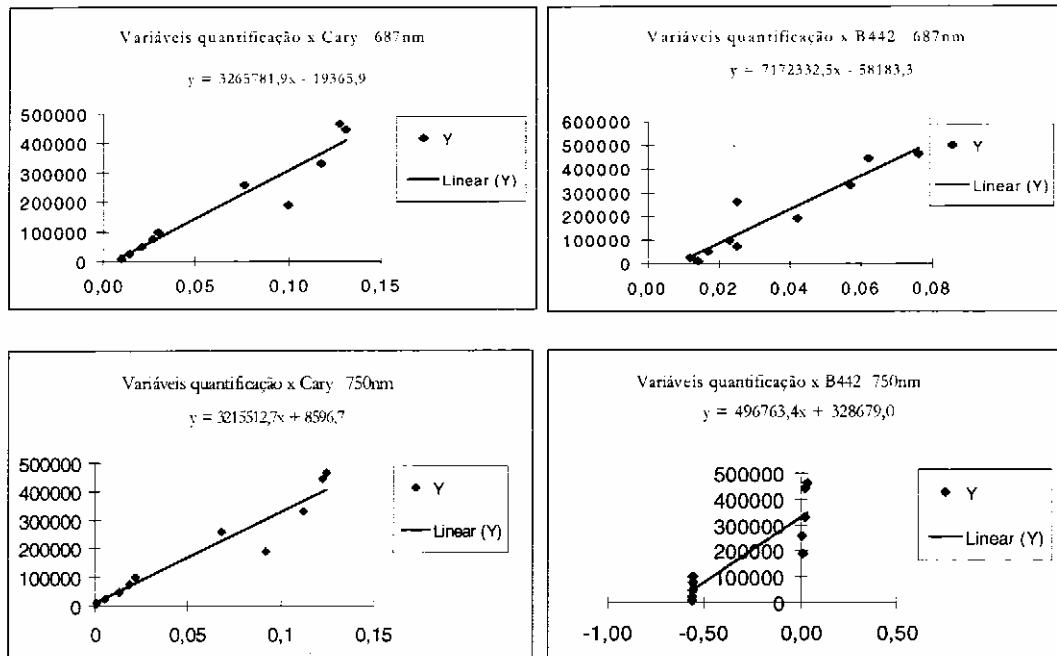


Figura 1. Equações de regressão para mensuração do número de células algais/ml (y) de *Chlamydomonas reinhardtii* a partir da leitura da absorbância (x), para ambos os equipamentos e comprimentos de onda.

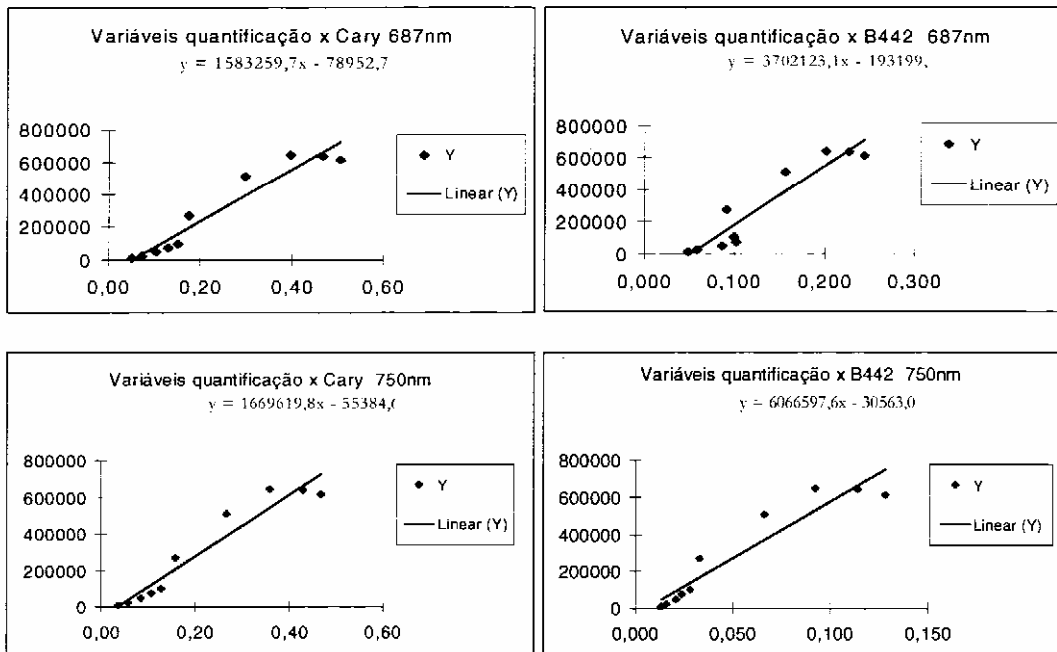


Figura 2. Equações de regressão para mensuração do número de células algais/ml (y) de *Scenedesmus communis* a partir da leitura da absorbância (x), para ambos os equipamentos e comprimentos de onda.

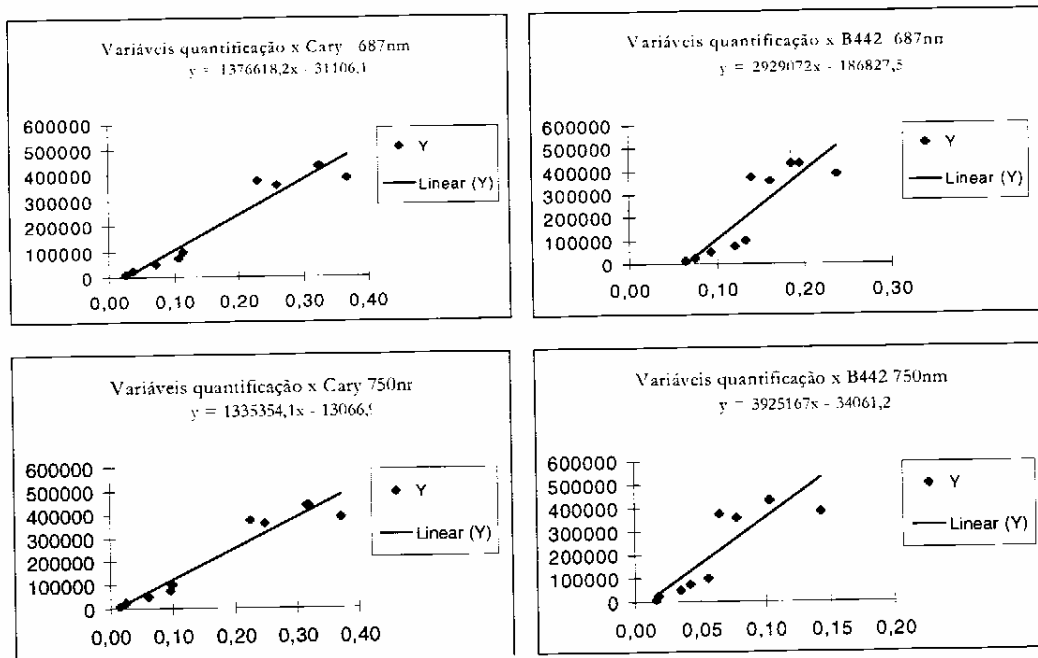


Figura 3. Equações de regressão para mensuração do número de células algais/ml (y) de *Cryptomonas phaeovirus* a partir da leitura da absorbância (x), para ambos os equipamentos e comprimentos de onda.

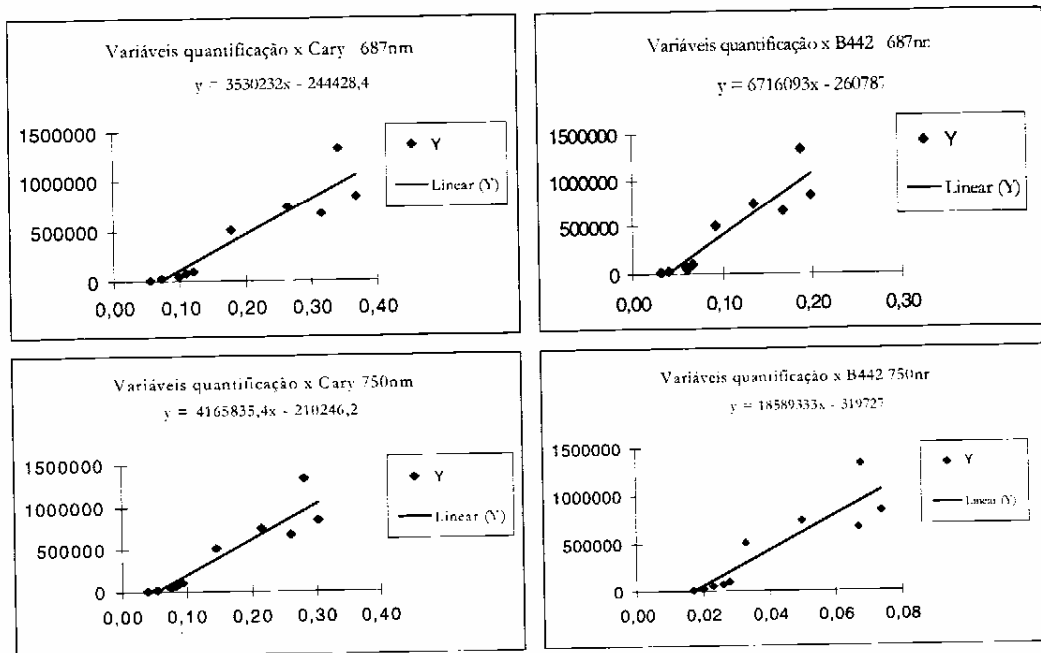


Figura 4. Equações de regressão para mensuração do número de células algais/ml (y) de *Selenastrum rinoi* a partir da leitura da absorbância (x), para ambos os equipamentos e comprimentos de onda.

REFERÊNCIAS CITADAS

- Cardoso, L.S. & Valer, R.M. 1996. Crescimento populacional de *Daphnia similis* (Cladocera) em relação à dieta alimentar como instrumento básico para o monitoramento ambiental. In: I SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE QUALIDADE AMBIENTAL - Projeto de aterro de resíduos e saneamento de áreas degradadas, 1996, Porto Alegre. *Anais...* Rio de Janeiro: ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 1996. 251p. p.172-175.
- Cetesb -Norma Técnica L5.018 abr/86. 1996. Água - Teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea). Método de ensaio. Cetesb, São Paulo. 28 p.
- Coillie R.Van; Couture P.; Visser, S.A. 1983. Use of algae in Aquatic Toxicology. In: Nriagu, J.O. (ed.) Aquatic Toxicology. Vol.13 da série Advances in Environmental Science and Technology. John Wiley & Sons Publ., New York. p.487-502.
- Eaton, A.D.; Clesceri, L.S.; Greenberg, A.E. 1995. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 19.ed. American Public Health Association, Washington. 1040 p.
- Ferreira, D.L.; Valer, R.M.; Cardoso, L.S. 1998. Efeito do herbicida Roundup em culturas de microalgas: uma ferramenta para avaliação da toxicidade em ecossistemas aquáticos. In: II SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE QUALIDADE AMBIENTAL - Gerenciamento de resíduos e certificação ambiental, 1998, Porto Alegre. *Anais...* Rio de Janeiro: ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 1998. 634p. p.505-509.
- Guillard, R.R.L. 1978. Counting slides. In: Sournia, A. (ed.) Phytoplankton manual. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization Publ. (UNESCO), Paris. p.182-189.
- Jebram, D.H.A. 1993. Métodos básicos e novos para o cultivo de protistas livres. *Comum.Mus.Ciênc.PUCRS, Sér.Zoologia*, 50:3-20.
- Mittenzwey, K.H.; Ullrich, S.; Gitelson, A.A.; Kondratiev, K.Y. 1992. Determination of chlorophyll-a of inland waters on the basis of spectral reflectance. *Limnol. Oceanogr.*, 37(1):147-149.
- Taub, F.B. 1984. Synthetic microcosms as biological models of algal communities. In: Shubert, L.F. (ed.) Algae as ecological indicators. Academic Press. London. p. 363-394.
- Wong P.T.S.; Chau, Y.K.; Patel, D. 1983. The Use of Algal Batch and Continuous Culture Techniques in Metal Toxicity Study. In: Nriagu, J. O. (ed.) Aquatic Toxicology. Vol.13 da série Advances in Environmental Science and Technology. John Wiley & Sons Publ. New York. p.449-466.
- Zar, J.H. 1996. Biostatistical Analysis. Prentice-Hall, London. 870 p.