

## Avaliação do crescimento em culturas de microalgas

### Introdução

Para avaliar o comportamento de uma cultura de microalgas e calcular a taxa de crescimento exponencial é necessário registar ao longo do tempo parâmetros que sejam indicadores de crescimento. As metodologias mais usadas, dependendo das espécies, são a contagem celular e a determinação da densidade ótica no espectrofotómetro. Podem também ser usados alguns constituintes celulares como indicadores de biomassa, é o caso da clorofila *a*. A medição da densidade ótica é um método prático, não destrutivo, que permite rapidamente avaliar o crescimento num número elevado de amostras.

Para qualquer medição de avaliação de crescimento um passo decisivo é a correta colheita das sub-amostras. É fundamental que a cultura esteja bem homogeneizada para que a amostra seja representativa.

Depois de obtidos os dados estes devem ser representados num gráfico em função do tempo (dias, para microalgas). Com base nestas curvas é possível calcular alguns parâmetros importantes na avaliação do crescimento: taxa de crescimento ( $r$ ), determinada na fase exponencial, o tempo de duplicação ou de geração ( $T_2$ ) e o número de duplicações por unidade de tempo  $k$ .

A curva de crescimento de uma cultura em *batch*, ou seja, em volume constante sem que haja adição de nutrientes, normalmente apresenta um comportamento em “ $f$ ”. No início o crescimento não é visível, e esta fase é designada por “fase lag”. A duração da fase lag está dependente da concentração inicial do inóculo e da adaptação prévia do mesmo às condições de cultivo. Quanto mais concentrado for o inóculo inicial menor será a fase lag.

Segue-se uma fase de crescimento rápido correspondente à fase de crescimento exponencial. Esta fase corresponde a um período de crescimento em que a taxa de crescimento é constante e proporcional ao número de células.

Por fim, a curva irá atingir uma fase estacionária durante a qual não se observa crescimento. Esta fase corresponde a um período em que se atingiram condições limitantes para o desenvolvimento da cultura, por exemplo, esgotamento de nutrientes ou limitação pela luz devido a densidade celular muito elevada. Caso a cultura não seja transferida para novas condições entrará numa fase de declínio onde os processos de morte celular predominam.

A taxa de crescimento da fase exponencial é uma característica muito importante que permite comparar e avaliar as condições que melhor estimulam o crescimento de uma determinada estirpe/espécie. A taxa de crescimento na fase exponencial pode ser calculada a partir da equação diferencial (1):

$$(1) \quad \frac{dN}{dt} = rN$$

onde  $r$  representa a taxa de crescimento líquida e  $N$  representa a concentração celular ou biomassa. A taxa líquida de crescimento  $r$  é resultado dos processos de reprodução e de morte podendo ser descrita como:

$$(2) \quad r = \mu - m$$

onde  $\mu$  é a taxa bruta de crescimento e  $m$  a taxa de mortalidade ou de perda da população. A taxa líquida de crescimento pode ser positiva ou negativa consoante o processo de reprodução ou de morte seja o dominante. De salientar que também é possível determinada população ter uma elevada taxa bruta de crescimento, mas a taxa líquida de crescimento ser nula. Isto observa-se quando a taxa de mortalidade se aproxima da taxa bruta de crescimento.

A solução da equação diferencial (1) pode ser expressa de acordo com a seguinte equação (3):

$$(3) \quad N_t = N_0 e^{rt}$$

onde,

$N_0$ , dimensão da população no início do intervalo de tempo

$N_t$ , dimensão da população no fim do intervalo de tempo

$r$ , taxa líquida de crescimento

$t$ , tempo

Resolvendo a equação em ordem a  $r$  obtêm-se a equação de uma reta cujo declive é a taxa líquida de crescimento  $r$  (4):

$$(4) \quad \ln N_t = rt + \ln N_0$$

A taxa de crescimento  $r$  pode ser calculada pela equação (5):

$$(5) \quad r(\text{dia}^{-1}) = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t_t - t_0}$$

Onde,  $N_0$  é a dimensão da população no início do intervalo de tempo ( $t_0$ ) e  $N_t$  a dimensão da população no tempo  $t_t$ .

$N$  pode ser expresso em número de células, peso seco ou densidade ótica, entre outros parâmetros utilizados na avaliação do crescimento de uma população.

Outro parâmetro utilizado na caracterização do comportamento de uma cultura é o tempo de duplicação, isto é, o intervalo de tempo para que  $N_t = 2N_0$ .

Resolvendo a equação (5) acima:

$$(6) \quad \Delta t = T_2 (\text{dia}) = \frac{\ln 2N_0 - \ln N_0}{r} = \frac{\ln 2}{r} = \frac{0,6931}{r}$$

Onde  $T_2$  é o tempo de duplicação da população em dias.

Por sua vez o inverso de  $T_2$ , corresponde ao número de duplicações por dia e é normalmente designado por  $k$ :

(3):

$$k \text{ (divisão dia}^{-1}\text{)} = \frac{r}{0,6931}$$

Em culturas produzidas em *batch*, durante a fase exponencial de crescimento assume-se que a mortalidade é zero, sendo  $r=\mu$ . Assim, é frequente utilizar o símbolo  $\mu$  para designar a taxa de crescimento na fase exponencial.

Para melhor esclarecer os conceitos acima, apresenta-se o seguinte exemplo:

Uma cultura a crescer com uma taxa  $k$  de uma divisão por dia, tem um tempo de duplicação  $T_2$  de 1 dia e uma taxa de crescimento exponencial  $r$  de  $0,69 \text{ d}^{-1}$ .

#### Bibliografia

Graham L. E. & Wilcox, L. W., 2000. Algae. Prentice Hall, 640 pp

Wood, A. M., Everroad, R.C., Wingard, L.M. 2005. Measuring growth rates in microalgal cultures. In: Andersen RA (ed) Algal Culturing Techniques Elsevier Academic Press 269-285.

## 1. Avaliação do crescimento por densidade ótica

A contagem de células/filamentos é um método moroso e pode em muitas situações ser substituído por outros métodos mais expeditos de avaliação de crescimento como por exemplo a leitura da densidade ótica (DO).

Para ser possível utilizar a densidade ótica como estimador do crescimento é necessário verificar que o incremento na DO ao comprimento de onda (c.d.o.) escolhido corresponde efetivamente a um incremento na densidade populacional. O c.d.o deve ser escolhido numa região do espectro onde a absorção pelos pigmentos fotossintéticos e acessórios (clorofilas, carotenoides, ficobilinas) seja negligenciável para não influenciar a avaliação da densidade ótica associada ao aumento do número de partículas. Os c.d.o. mais frequentemente escolhidos são 540nm e 750nm, sendo aconselhável verificar para a espécie em estudo qual o mais indicado, conforme se indica de seguida.

Há vários fatores que podem afetar a correspondência entre a concentração celular e a DO, nomeadamente as características técnicas do equipamento, o comprimento de onda utilizado e a concentração da suspensão celular.

Uma técnica simples de avaliar o grau de correspondência consiste em diluir repetidamente para metade, com meio de cultura, uma suspensão celular densa e em seguida ler a densidade ótica das suspensões resultantes. A cada diluição da cultura, bem homogeneizada, corresponde uma redução para metade da concentração celular que deverá ser acompanhada por correspondente redução na DO.

Em espécies para as quais é possível a contagem de células ao microscópio, depois de determinada a DO, deverá fixar a amostra original e/ou as amostras das diferentes diluições para estabelecer uma correlação entre os dois métodos.

### Procedimento:

#### Material

- Microscópio
- ocular micrométrica
- lâminas e lamelas
- cultura densa de microalga (*Arthrospira maxima*; *Haematococcus pluvialis*)
- tubos de centrifuga (15ml)
- suportes tubos
- cuvettes espectrofotómetro (plástico)
- espectrofotómetro UV/Vis
- água destilada
- pipetas automáticas e pontas (5ml)
- papel "kleenex"
- recipiente para descartar amostras
- canetas marcador
- lápiz
- folha de registo

Antes de iniciar o trabalho deverá familiarizar-se com o organismo a estudar. Observe ao microscópio ótico uma gota de cultura. Observe e registre a morfologia da espécie que observa. Com a ocular micrométrica registre as dimensões.

#### **Curva de diluição:**

1. Coloque num tubo de centrifuga (15ml) cerca de 10ml da cultura fornecida.
2. Com a ajuda de uma pipeta automática, prepare 4 tubos de centrifuga com 4,5ml de meio de cultura/água destilada. Coloque por ordem no suporte de tubos e identifique o fator de diluição  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{8}$ ,  $\frac{1}{16}$
3. Depois de bem homogeneizada a cultura mãe, retire 4,5ml que adiciona ao tubo  $\frac{1}{2}$ . Agite esta nova solução, retire 4,5ml e adicione ao tubo seguinte. Repita esta operação até à concentração mais baixa.
4. Leia a densidade ótica de cada suspensão no espectrofotómetro a 540nm. **e 750 nm** Certifique-se que a suspensão está bem homogeneizada antes de fazer a leitura. É conveniente fazer as leituras com alguma rapidez para evitar por exemplo que as células se depositem ou formem aglomerados. Utilize as cuvettes de plástico certificando-se que coloca a face de leitura na posição correta. Comece sempre da suspensão menos concentrada para a mais concentrada. Entre duas amostras lave a cuvette com umas gotas da amostra seguinte.
5. Faça um gráfico com os resultados e calcule a reta de regressão com os respetivos coeficientes.