

## POTENCIAL DE ABSORÇÃO DE CARBONO POR ESPÉCIES DE MICROALGAS USADAS NA AQUICULTURA: PRIMEIROS PASSOS PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM “MECANISMO DE DESENVOLVIMENTO LIMPO”.

LUCÉLIA BORGES<sup>1</sup>, BIAS MARÇAL DE FARIA<sup>2</sup>, CLARISSE ODEBRECHT<sup>1</sup> & PAULO C. ABREU<sup>1\*</sup>

\*Autor para quem as correspondências devem ser enviadas (Corresponding author)

<sup>1</sup>Departamento de Oceanografia – Fundação Universidade Federal do Rio Grande – FURG

Cx. Postal 474, 96201-900 – Rio Grande – RS – docpca@furg.br

<sup>2</sup>CENPES – PETROBRAS

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi o de determinar a taxa de absorção de CO<sub>2</sub> das espécies de microalgas, *Nannochloropsis oculata*, *Chaetoceros affinis*, *Chaetoceros muelleri*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira weissflogii*, *Thalassiosira pseudonana*, *Tetraselmis chuii*, *Tetraselmis tetrathele* e *Isochrysis galbana*, normalmente utilizadas na aquicultura. Medidas de produção primária (método do <sup>14</sup>C; produção dissolvida, particulada e total) foram realizadas em cultivos que estavam em fase logarítmica, sob diferentes intensidades luminosas e sem restrições nutritivas. *T. weissflogii* e *N. oculata* apresentaram os maiores valores de absorção de carbono, sendo indicadas para a realização de experimentos em grande escala, visando o desenvolvimento de um “Mecanismo de Desenvolvimento Limpo” para absorção de dióxido de carbono atmosférico.

**PALAVRAS-CHAVE:** Microalgas, Carbono, Produção primária, Fotossíntese, Aquicultura.

### ABSTRACT

#### Potential of carbon uptake by microalgae species used in aquaculture: first steps to development of a “clean development mechanism”

The aim of this work was to determine the rate of CO<sub>2</sub> uptake of the microalgae species *Nannochloropsis oculata*, *Chaetoceros affinis*, *Chaetoceros muelleri*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira weissflogii*, *Thalassiosira pseudonana*, *Tetraselmis chuii*, *Tetraselmis tetrathele* and *Isochrysis galbana*, used in aquaculture. Measurements of primary production (<sup>14</sup>C method; dissolved, particulate and total production) were accomplished in cultures growing in logarithmic phase, under different light intensities and without any nutrient restriction. *T. weissflogii* and *N. oculata* presented the largest carbon uptake rates, being indicated for further scaling experiments in order to develop a “Clean Development Mechanism” to the absorption of atmospheric carbon dioxide.

**KEYWORDS:** Microalgae, Carbon, Primary production, photosynthesis, aquaculture.

## INTRODUÇÃO

Na atmosfera da Terra alguns gases, principalmente o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) o metano (CH<sub>4</sub>) e o óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), funcionam como uma capa protetora que permite a entrada da luz solar, mas retêm uma quantia do calor produzido, impedindo que uma parcela da radiação absorvida escape para o espaço. Essa particularidade da atmosfera, denominada de “efeito estufa”, é benéfica para a vida pois, sem esses gases, a superfície da Terra estaria coberta de gelo e não haveria vida no planeta, tal como conhecemos. Entretanto, os níveis atmosféricos do dióxido de carbono e de outros gases aumentaram muito desde a Revolução Industrial, causando uma intensificação do “efeito estufa”, com sérios danos ambientais em todo o planeta (Kirschbaum 2003).

Para reduzir a concentração de dióxido de carbono atmosférico existem duas possibilidades: a redução das emissões ou a absorção do dióxido de carbono produzido em excesso, também denominado de seqüestro de carbono. Algumas medidas para a redução dos níveis atuais de CO<sub>2</sub> na atmosfera foram propostas no Tratado de Kyoto em 1997, que estabelece que os países desenvolvidos terão a obrigação de reduzir em 5% a emissão de gases que causam o “efeito estufa” até 2012. Como mecanismo de seqüestro de carbono (“Mecanismo de Desenvolvimento Limpo”), está sendo proposto o plantio de árvores (florestamento/reflorestamento), que possuem a capacidade de incorporar o dióxido de carbono à biomassa vegetal através do processo da fotossíntese (Araújo 2000). Entretanto, ao se lavar o solo para o plantio, grande quantidade de CO<sub>2</sub> é liberada para a atmosfera o que anularia o efeito benéfico da absorção de dióxido de carbono e sua incorporação na biomassa das plantas ao longo de sua vida (Araújo 2000). A utilização de outros organismos fotossintéticos com capacidade de absorver CO<sub>2</sub> da atmosfera poderia ser uma alternativa ao reflorestamento.

As microalgas são as principais responsáveis pela absorção biológica do CO<sub>2</sub> atmosférico nos oceanos que cobrem 3/4 partes da superfície do globo terrestre, uma vez que estão presentes em grande número na coluna de água (Falkowski & Raven 1997). Uma parte do CO<sub>2</sub> absorvido pelas microalgas é transferida para o fundo

oceânico num processo conhecido como "bomba biológica" (Lalli & Parsons 1993). Este processo, juntamente com a difusão direta do CO<sub>2</sub> para a água, impede que o acúmulo de gases do "efeito estufa" seja ainda maior.

Além de seu rápido crescimento, as microalgas podem ser cultivadas em águas salobra e/ou salgada, liberando o uso de água doce para o consumo humano e agricultura. Além disso, as microalgas apresentam uma ampla tolerância a fatores ambientais extremos, podendo ser cultivadas intensivamente em pequenos espaços e em regiões impróprias para atividades agrícolas representando, assim, uma alternativa efetiva para a diminuição do "efeito estufa" (Kurano et al. 1995). Estudos sobre a produção e qualidade dos lipídios produzidos por microalgas, indicam que o seu cultivo pode resultar na produção de biocombustíveis como o biodiesel, que poderia substituir combustíveis fósseis provenientes do refino de petróleo (Brown & Zeiler 1993). Isto qualificaria o cultivo de microalgas, para este fim, como um Mecanismo de Desenvolvimento Limpo (MDL), ou seja, alternativas tecnológicas para o desenvolvimento de fontes de energia "limpas", que não emitam dióxido de carbono, ou que reduzam os níveis deste e de outros gases da atmosfera.

As microalgas podem ser utilizadas no consumo humano, como fonte suplementar de proteínas, carboidratos, ácidos graxos, pigmentos, vitaminas, entre outras substâncias, e algumas espécies são utilizadas como matéria-prima na indústria de alimentos e farmacêutica (Borowitzka & Borowitzka 1988). Na aquicultura, as microalgas são empregadas como fonte primária de alimento para larvas, juvenis e até de adultos de moluscos, crustáceos e peixes, bem como do zooplâncton, usado como alimento para crustáceos e peixes (Brown et al. 1997). Outra função das microalgas na aquicultura, é proporcionar a melhoria da qualidade da água, através da absorção de produtos nitrogenados tóxicos (amônia e nitrito) (Lavens & Sorgeloos 1996) e combate a bactérias patogênicas pela produção de substâncias antibióticas (Reitan et al. 1994).

Trabalhos com cultivo de microalgas utilizadas na aquicultura têm objetivado principalmente a análise nutricional (Zittelli et al. 1999, Pernet et al. 2003), de pigmentos (Lubián et al. 2000) e influência de luz (Fábregas et al. 2004, Meseck et al. 2005).

O presente trabalho teve como objetivo quantificar a taxa de fixação de carbono de dez espécies de microalgas comumente utilizadas na aquicultura e indicar dentre elas as espécies mais recomendadas para estudos com produção de biocombustíveis a fim de se desenvolver um Mecanismo de Desenvolvimento Limpo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados com dez espécies de microalgas utilizadas na aquicultura, e mantidas na coleção de cultivo do Laboratório de Ecologia do Fitoplâncton e de Microorganismos Marinhos da FURG (Tabela 1). Os cultivos foram mantidos em câmara ambiente para germinação (modelo 347-CDG, Fanem), com fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas de escuro e irradiância de 100  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

As estimativas de produção primária foram realizadas pelo método do <sup>14</sup>C (Steeman Nielsen 1952) para produção particulada (PP). A produção dissolvida (PD) e total (ABM) foram determinadas pelo método da acidificação e borbulhamento (Schindler et al. 1972). Os experimentos foram realizados com amostras de cultivo que estavam em fase de crescimento logarítmico (fase LOG). Para isso, as microalgas foram cultivadas adicionando-se inicialmente 5,0 mL do inóculo em 300 mL de meio #2 (Guillard 1975); esse volume foi gradualmente aumentado em intervalos de aproximadamente quatro dias até alcançar 9 litros de cultura. Aeração constante foi utilizada a partir do volume de 1000 mL.

Imediatamente antes da realização de cada experimento eram retiradas do cultivo duas amostras de 5,0 mL, uma para contagem celular e a outra para medição de clorofila *a*. Este pigmento foi extraído durante 24 horas no escuro a -12°C com acetona a 90% (Strickland & Parsons 1972), em fluorímetro calibrado (Turner, modelo TD-700), sem acidificação do extrato (Welschmeyer 1994).

Experimentos com duração de três horas, foram realizados em oito intensidades luminosas (curvas P<sub>x</sub>l), obtidas com a colocação em fila dos frascos de DBO (100 mL, duas repetições), em um aquário de vidro com

água circulante e temperatura igual a do cultivo, mantida por um banho termostatizado (Tecnal TE 184). Na frente do aquário foi instalada a fonte de luz, uma lâmpada de halogênio (250 W). A disposição em fila dos frascos DBO determinou um gradiente de luz entre um máximo de 780  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e m\u00ednimo de 65  $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . A intensidade luminosa foi medida no lugar em que estava cada garrafa utilizando um aparelho Li-Cor com sensor esf\u00e9rico de luz. Foram ainda utilizados frascos escuros, cobertos com papel alum\u00ednio, para medir qualquer absor\u00e7\u00e3o de carbono radioativo no escuro.

Em cada frasco DBO (2 frascos claros para cada intensidade luminosa e 3 frascos escuros) foi adicionado 1 (um) mL de bicarbonato de s\u00f3dio radioativo ( $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ ), com atividade de 5  $\mu\text{Ci/mL}$ . Inicialmente, foram retiradas 6 amostras aleat\u00f3rias de 50  $\mu\text{L}$  para a determina\u00e7\u00e3o da concentra\u00e7\u00e3o de carbono radioativo inicial. Ap\u00f3s o per\u00edodo de incubação (3h), foi adicionado 1 mL de formalina a 37% em cada frasco, para interromper o processo de fotoss\u00edntese. Ap\u00f3s isso, foram retiradas duas amostras de 10 mL de cada frasco, as quais foram filtradas em filtros de fibra de vidro (Whatman GF/F) com aux\u00edlio de bomba a v\u00e1cuo. Os filtros foram mantidos por 3 horas em atmosfera saturada de HCl e formalina a 37%, o \u00e1cido clor\u00eddrico serviu para eliminar o  $^{14}\text{C}$  inorg\u00e2nico e a formalina para evitar o crescimento bacteriano, sendo ap\u00f3s transferidos para "vials" com adi\u00e7\u00e3o de 20 mL do coquetel de cintila\u00e7\u00e3o Ready Safe<sup>®</sup> (Beckman), para leitura da radioatividade particulada (PP) em cintil\u00f4metro Beckman – LS 6500.

A produ\u00e7\u00e3o de material dissolvido (PD) excretado pelas algas foi determinada retirando-se 8 mL do filtrado e transferindo-os para "vials". Para a elimina\u00e7\u00e3o do  $^{14}\text{C}$  inorg\u00e2nico foi adicionado, neste filtrado, 1 mL de HCl a 6 N e realizado o borbulhamento das amostras por 20 minutos. As amostras foram ent\u00e3o neutralizadas com 1 mL de NaOH a 6 N e completado o volume de 20 mL do "vial" com l\u00edquido de cintila\u00e7\u00e3o (Schindler et al. 1972).

Para a determina\u00e7\u00e3o da produtividade total (ABM), duas al\u00edquotas de 8 mL de amostra n\u00e3o filtrada foram transferidas diretamente para "vials" onde se realizou o mesmo processo de acidifica\u00e7\u00e3o, borbulhamento e neutraliza\u00e7\u00e3o como descrito anteriormente

A taxa de produ\u00e7\u00e3o prim\u00e1ria foi calculada de acordo com Nielsen & Bresta (1984) para os valores dos filtros (produ\u00e7\u00e3o particulada), filtrados (produ\u00e7\u00e3o dissolvida) e sem filtra\u00e7\u00e3o (produ\u00e7\u00e3o prim\u00e1ria total – ABM) segundo a f\u00f3rmula:

$$\text{mgC/L.h} = \frac{A \times C \times D \times E \times F \times k_1}{B \times k_2}$$

onde:

A =  $^{14}\text{C}$  incorporado no organismo (dpm).

B =  $^{14}\text{C}$  inicial (dpm).

C = Concentra\u00e7\u00e3o do carbono na \u00e1gua.

D = Peso at\u00f4mico do carbono (12).

E e F = Fatores de corre\u00e7\u00e3o (1,05 e 1,06).

$k_1 = \frac{\text{mL amostra} + \text{mL NaOH}^{14}\text{CO}_3}{\text{mL filtrado}}$

$k_2 =$  Tempo de incubação

O carbono inorg\u00e2nico total presente nas amostras foi estimado a partir da alcalinidade, determinada a partir de dados de temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), salinidade (refrat\u00f4metro Atago S/Mill-E) e pH (Medidor de pH, Digimed DMPH-3) antes e ap\u00f3s a adi\u00e7\u00e3o de HCl a 0,01 N \u00e0 amostra, conforme descrito em Strickland & Parsons (1972).

Os resultados de produ\u00e7\u00e3o obtidos foram padronizados, dividindo-se a taxa de produ\u00e7\u00e3o prim\u00e1ria pela concentra\u00e7\u00e3o de clorofila *a* (CLA). Os resultados de produ\u00e7\u00e3o total (ABM) foram utilizados na elabora\u00e7\u00e3o das curvas P-I (Henley 1993), onde se determinaram os seguintes par\u00e2metros fotossint\u00e9ticos:  $P_{\text{m\u00e1x}}$  (taxa m\u00e1xima da fotoss\u00edntese),  $\alpha$  (inclina\u00e7\u00e3o inicial da reta) e  $I_K$  (irradi\u00e2ncia de satura\u00e7\u00e3o,  $I_K = P_{\text{m\u00e1x}}/\alpha$ ) de cada esp\u00e9cie. A inclina\u00e7\u00e3o inicial ( $\alpha$ ) foi calculada atrav\u00e9s de regress\u00e3o linear entre os pontos que formavam uma reta com a maior inclina\u00e7\u00e3o em rela\u00e7\u00e3o ao eixo X (luz).

A análise comparativa das variáveis medidas (produção particulada, produção dissolvida e produção total) para as diferentes espécies de microalgas foi realizada empregando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (Teste H), para amostras independentes e de mesmo tamanho (Wonnacott & Wonnacott 1980).

## RESULTADOS

A abundância celular e a concentração de clorofila *a* (CLA) inicial dos cultivos utilizados nos experimentos variaram de acordo com as espécies e também de acordo com o conteúdo de CLA por célula (Tab. 1). Por exemplo, *Nannochloropsis oculata* apresentou uma alta abundância mas, devido a sua baixa concentração de clorofila *a* por célula, apresentou baixa concentração deste pigmento. A prasinofícea *Tetraselmis tetraathele* iniciou com o menor número de células e concentração de clorofila; a diatomácea *Phaeodactylum tricornutum* apresentou maior densidade, enquanto que *Thalassiosira weissflogii* foi a espécie com maior concentração de clorofila *a* no início dos experimentos, seguida por *P. tricornutum* (Tab. 2).

TABELA 1 – Espécies testadas e valores ótimos de temperatura (T-°C) e salinidade (S) usados nos experimentos de crescimento. (Dados da literatura para as mesmas espécies).

Classe	Espécie	T	S	Referência
Eustigmatophyceae	<i>Nannochloropsis oculata</i> (Droop) Hibberd, 1955	20	28	Abu-Resq et al. 1999
Bacillariophyceae	<i>Chaetoceros affinis</i> Lauder, 1864	15	22	Brunel, 1970
Bacillariophyceae	<i>Chaetoceros muelleri</i> Lemmermann, 1898	25	28	McGinnis, 1997
Bacillariophyceae	<i>Phaeodactylum tricornutum</i> Bohlin, 1897	20	28	Goldman, 1977
Bacillariophyceae	<i>Skeletonema costatum</i> (Greville) Cleve, 1873	20	28	Goldman, 1977
Bacillariophyceae	<i>Thalassiosira pseudonana</i> (Husted) Hasle & Heimdal, 1970	27	28	Goldman, 1977
Bacillariophyceae	<i>Thalassiosira weissflogii</i> (Grunow) G. Fryxell et Hasle, 1977	20	28	-
Prasinophyceae	<i>Tetraselmis chuii</i> Butcher, 1958	20	28	Abu-Resq et al. 1999
Prasinophyceae	<i>Tetraselmis tetraathele</i> (G.S. West) Butcher 1959	20	28	Abu-Resq et al. 1999
Prymnesiophyceae	<i>Isochrysis galbana</i> Parke, 1949	27	28	Kaplan et al. 1986

TABELA 2 – Valores da densidade celular (células/mL), clorofila *a* (µg/L), e clorofila *a* por célula no início dos experimentos com as diferentes espécies.

Espécie	Contagem (células/mL)	Clorofila <i>a</i> (µg/L)	Clorofila <i>a</i> (pg/célula)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	28.9 . 10 <sup>4</sup>	95,66	0,33
<i>Chaetoceros affinis</i>	5.52 . 10 <sup>4</sup>	162 ±22,2	9,04
<i>Chaetoceros muelleri</i>	7.48 . 10 <sup>4</sup>	148,4 ± 4,0	3,27
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	44.4 . 10 <sup>4</sup>	345 ± 40,2	0,78
<i>Skeletonema costatum</i>	37.5 . 10 <sup>4</sup>	530,03	1,41
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	4.66 . 10 <sup>4</sup>	152,3 ± 4,0	2,93
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	10.7 . 10 <sup>4</sup>	965,4 ± 23	1,98
<i>Tetraselmis chuii</i>	9.04 . 10 <sup>4</sup>	286,9	3,17
<i>Tetraselmis tetraathele</i>	2.86 . 10 <sup>4</sup>	34,5 ± 3,4	1,21
<i>Isochrysis galbana</i>	9.08 . 10 <sup>4</sup>	142,3 ± 2,4	1,57

### Produção Particulada (PP)

As espécies *Nannochloropsis oculata*, com o máximo de 33,8 mgC mgCLA<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> na intensidade luminosa de 369 µmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, e *Thalassiosira weissflogii*, com 17,7 mgC mgCLA<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> em 542 µmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de luz, apresentaram os maiores valores. *Chaetoceros affinis* e *Chaetoceros muelleri* foram as espécies com menor PP, cujos valores foram independentes da iluminação, de no máximo 0,22 e 0,15 mgC mgCLA<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente (Fig. 1).

**Produção Dissolvida (PD)**

As espécies *T. weissflogii* (6,67 mgC mgCLA<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> em 163 μmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de luminosidade), *S. costatum* (2,58 mgC mgCLA<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> em 245 μmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) e *N. oculata* (1,82 mgC mg CLA<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> em 195 μmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) foram as microalgas que apresentaram os maiores valores de PD. *C. affinis* e *C. muelleri* apresentaram os menores valores de produção dissolvida independentemente da luz utilizada (0,13 e 0,11 mgC mgCLA<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), (Fig. 2).

**Produção Total (ABM)**

Os maiores valores de produção total (ABM) foram encontrados para as espécies *T. weissflogii* (22,7 mgC mgCLA<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> em 163 μmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de luz), e *N. oculata* (22 mgC mgCLA<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> em 369 μmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Os menores valores foram medidos para as espécies *C. affinis* e *C. muelleri*, com 0,31 em 235 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> e 0,14 mgC mgCLA<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> em 469 μmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de luz, respectivamente (Fig. 3).

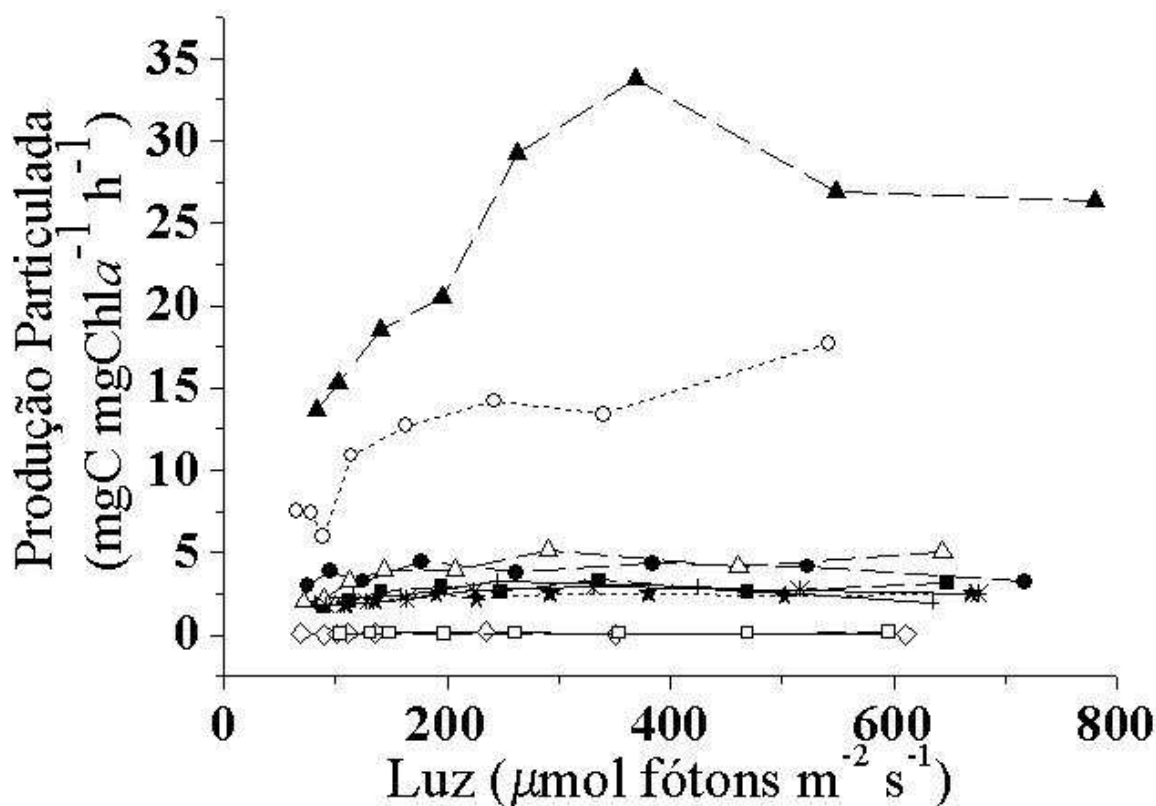


FIGURA 1 – Produção particulada (mgC mg Chl-*a*<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>) pelas espécies nas diferentes intensidades luminosas (μmol fótons m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). ...▲... *Nannocloropsis oculata*, ...◇... *Chaetoceros affinis*, ...□... *Chaetoceros muelleri*, ...●... *Phaeodactylum tricornutum*, ...+... *Skeletonema costatum*, ...■... *Thalassiosira pseudonana*, ...○... *Thalassiosira weissflogii*, ...△... *Tetratasmis chuii*, ...\*... *Tetratasmis tetrathele*, ...★... *Isochrysis galbana*.

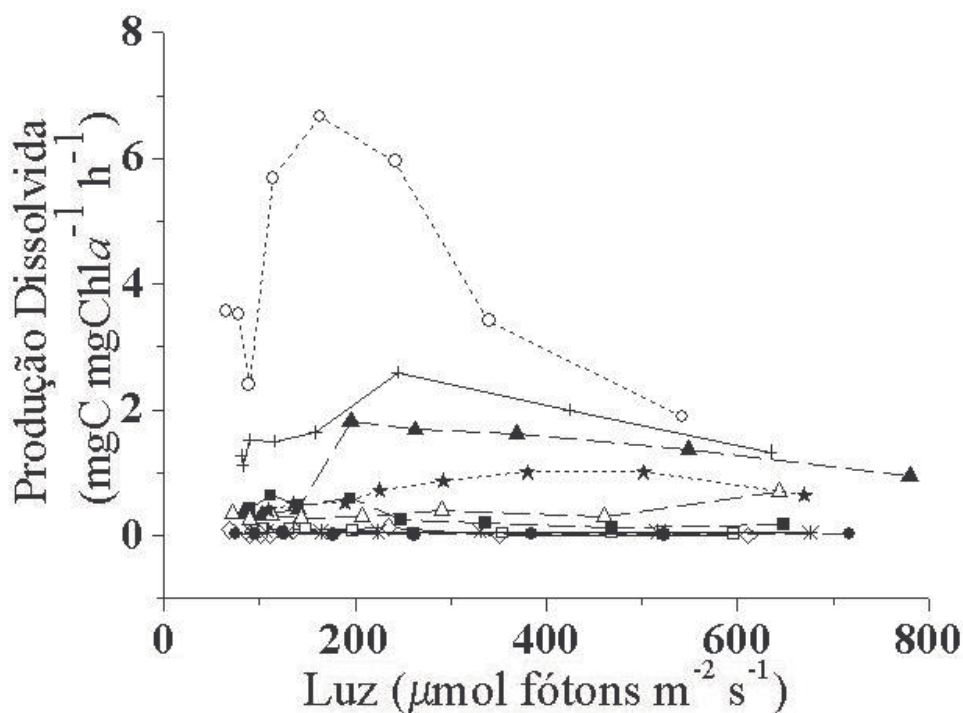


FIGURA 2 – Produção dissolvida ( $\text{mgC mg Chl-}a^{-1}\text{h}^{-1}$ ) pelas espécies nas diferentes intensidades luminosas ( $\mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ ).  $\cdots\blacktriangle\cdots$  *Nannocloropsis oculata*,  $\cdots\circ\cdots$  *Chaetoceros affinis*,  $\cdots\blacksquare\cdots$  *Chaetoceros muelleri*,  $\cdots\bullet\cdots$  *Phaeodactylum tricornutum*,  $\cdots+\cdots$  *Skeletonema costatum*,  $\cdots\blacksquare\cdots$  *Thalassiosira pseudonana*,  $\cdots\circ\cdots$  *Thalassiosira weissflogii*,  $\cdots\triangle\cdots$  *Tetraselmis chuii*,  $\cdots*\cdots$  *Tetraselmis tetrathele*,  $\cdots\star\cdots$  *Isochrysis galbana*.

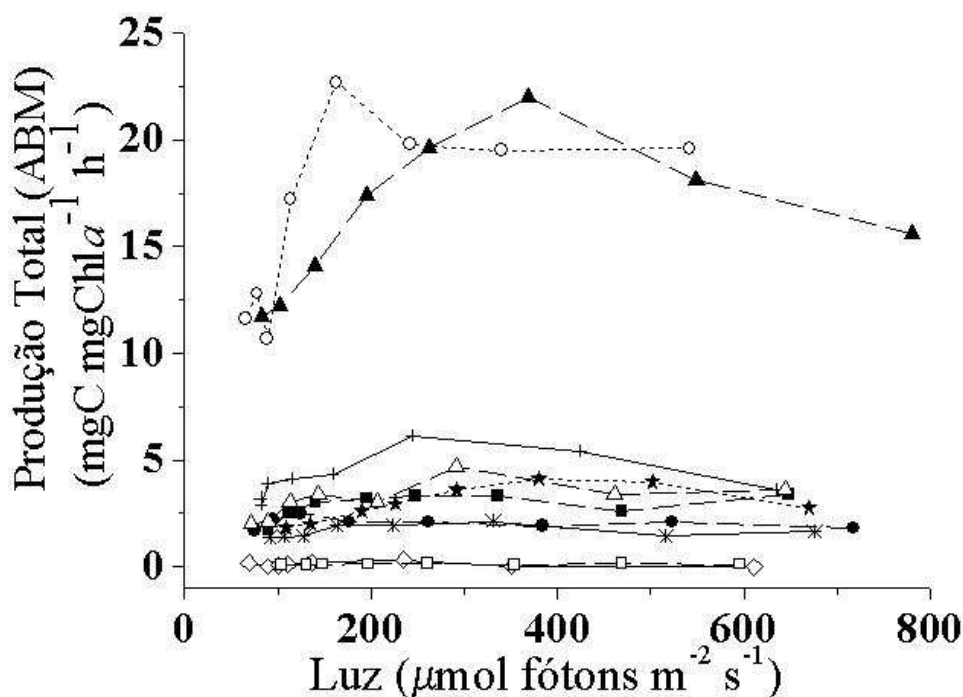


FIGURA 3 – Produção total ABM ( $\text{mgC mg Chl-}a^{-1}\text{h}^{-1}$ ) pelas espécies nas diferentes intensidades luminosas ( $\mu\text{mol fótons m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ ).  $\cdots\blacktriangle\cdots$  *Nannocloropsis oculata*,  $\cdots\circ\cdots$  *Chaetoceros affinis*,  $\cdots\blacksquare\cdots$  *Chaetoceros muelleri*,  $\cdots\bullet\cdots$  *Phaeodactylum tricornutum*,  $\cdots+\cdots$  *Skeletonema costatum*,  $\cdots\blacksquare\cdots$  *Thalassiosira pseudonana*,  $\cdots\circ\cdots$  *Thalassiosira weissflogii*,  $\cdots\triangle\cdots$  *Tetraselmis chuii*,  $\cdots*\cdots$  *Tetraselmis tetrathele*,  $\cdots\star\cdots$  *Isochrysis galbana*.

Os valores de produção total pelo método ABM em comparação com a soma de PP + PD, foram estatisticamente semelhantes, sendo que a relação entre estes dois parâmetros apresentou um  $r^2 = 0,89$  (Fig 4).

A produção particulada (PP) representou a maior fração da produção total na maioria das espécies, chegando a 100% em *P. tricornutum* (Tab. 3). Porém, as espécies *Chaetoceros affinis*, *C. muelleri*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana*, *T. weissflogii* e *Isochrysis galbana* apresentaram alta PD, alcançando até 58% da produção total em *C. muelleri*. Em *C. muelleri*, *T. pseudonana* e *T. weissflogii* o aumento da irradiância coincidiu com uma redução de PD (Tab. 3)

TABELA 3: Percentual das diferentes frações, de produção particulada (%P) e dissolvida (%D), na produção total nas diferentes intensidades luminosas ( $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) para cada espécie.

Espécie	Luz	% P	% D
<i>N. oculata</i>	82,5	98	2
	101,5	98	2
	139,6	98	2
	194,9	92	8
	262,6	95	5
	368,5	95	5
	549,1	95	5
	780,4	97	3
<i>C. affinis</i>	68,8	52	48
	89,8	71	29
	101,5	90	10
	110,9	93	7
	135,9	64	36
	235,1	62	38
	350,7	69	31
	610,9	85	15
<i>C. muelleri</i>	104,2	42	58
	131,4	48	52
	147,6	53	47
	197,2	48	52
	260,9	73	27
	354,0	72	28
	469,1	68	32
	596,0	86	14
<i>P. tricornutum</i>	74,9	99	1
	94,7	99	1
	125,2	99	1
	177,3	99	1
	262,2	100	0
	383,9	99	1
	522,5	99	1
	717,0	99	1
<i>S. costatum</i>	81,7	61	39
	83,4	62	38
	90,1	60	40
	114,7	61	39
	159,0	60	40
	244,5	56	44
	425,3	59	41
	634,5	60	40
<i>T. weissflogii</i>	65,0	68	32
	77,6	68	32
	89,1	71	29
	113,8	66	34
	162,9	66	34
	241,7	71	29
	339,9	80	20
	542,0	90	10
<i>T. pseudonana</i>	90,2	80	20
	111,7	76	24
	141,0	85	15
	194,5	83	17
	248,3	91	9
	335,8	94	6
	469,4	95	5
	648,3	95	5
<i>T. chuii</i>	72,3	85	15
	90,4	89	11
	113,2	91	9
	143,5	94	6
	207,4	93	7
	290,6	93	7
	461,0	93	7
	643,7	88	12
<i>T. tetrahele</i>	91,58	98	2
	106,7	97	3
	128,1	98	2
	163,7	98	2
	223,8	98	2
	330,8	98	2
	516,2	98	2
	676,4	98	2
<i>I. galbana</i>	109,4	82	18
	135,0	80	20
	189,9	82	18
	226,3	75	25
	291,7	74	26
	380,0	71	29
	502,3	70	30
	669,6	80	20

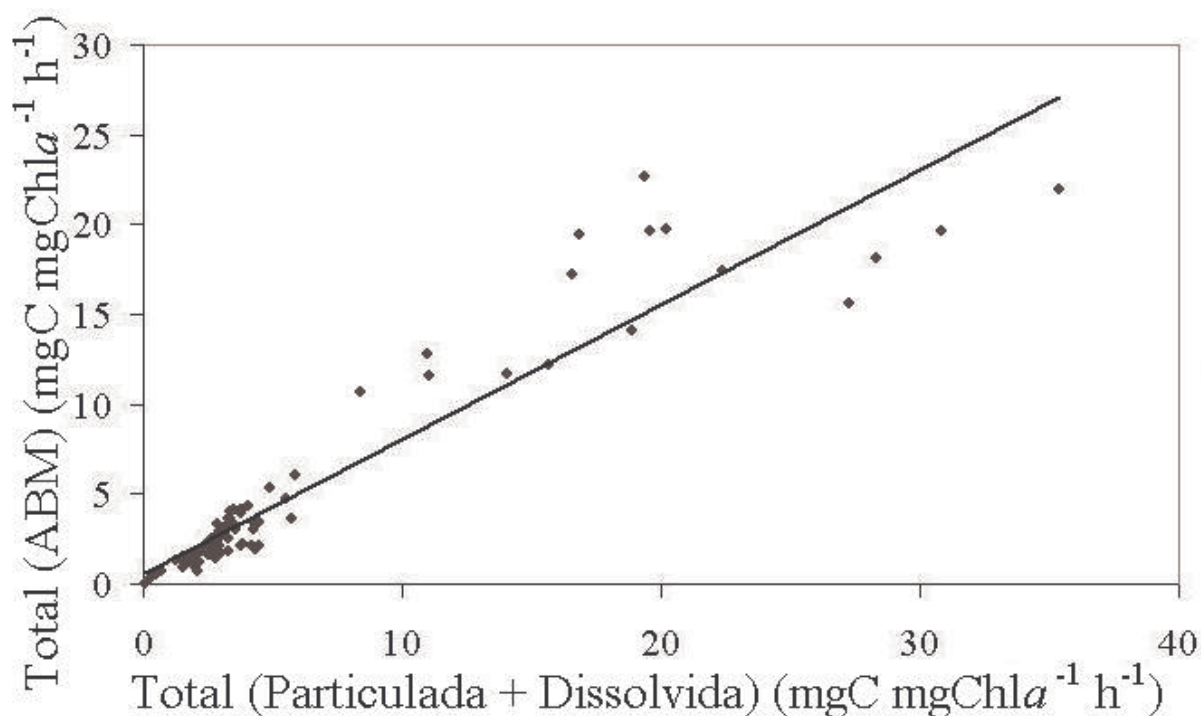


FIGURA 4 – Gráfico de dispersão da produção total (ABM) pela produção (particulada + dissolvida)  $y=0,7497x + 0,5229$ ,  $r^2 = 0,9$ .

#### Parâmetros das Curvas Pxl

A análise dos parâmetros fotossintéticos das curvas P, obtidos a partir da produção total (ABM) (Tab. 3), resultou em maiores valores de  $P_{\text{máx}}$  para *T. weissflogii* (23,9) e *N. oculata* (20,8), coincidindo com os valores mais altos de  $\alpha$ , 0,12 e 0,052, respectivamente. Os menores valores de  $P_{\text{máx}}$  foram exibidos pelas espécies de *Chaetoceros*, *C. affinis* (0,09) e *C. muelleri* (0,14). Os valores mais altos de  $I_k$  foram obtidos por *I. galbana*, *T. pseudonana*, *N. oculata* e *C. muelleri*, enquanto que *C. affinis*, *P. tricornutum* e *T. weissflogii* apresentaram os menores (Tab. 4).

TABELA 4 – Parâmetros das curvas de produção x intensidade luminosa (P-I) para o carbono total (ABM).  $P_{\text{máx}}$  (mg C/mg Chl- $a^{-1}h^{-1}$ );  $I_k$  ( $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ );  $\alpha$  (mg C mg Chl- $a^{-1}/\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Esp\u00e9cie	$P_{\text{m\u00e1x}}$ (ABM)	$I_k$	$\alpha$
<i>N. oculata</i>	20,8	399	0,052
<i>C. affinis</i>	0,09	64	0,001
<i>C. muelleri</i>	0,14	369	0,039
<i>P. tricornutum</i>	2,02	135	0,015
<i>S. costatum</i>	5,31	279	0,019
<i>T. pseudonana</i>	3,59	416	0,009
<i>T. weissflogii</i>	23,9	199	0,12
<i>T. chuii</i>	4,37	209	0,020
<i>T. tetrathele</i>	1,83	261	0,007
<i>I. galbana</i>	4,52	457	0,009



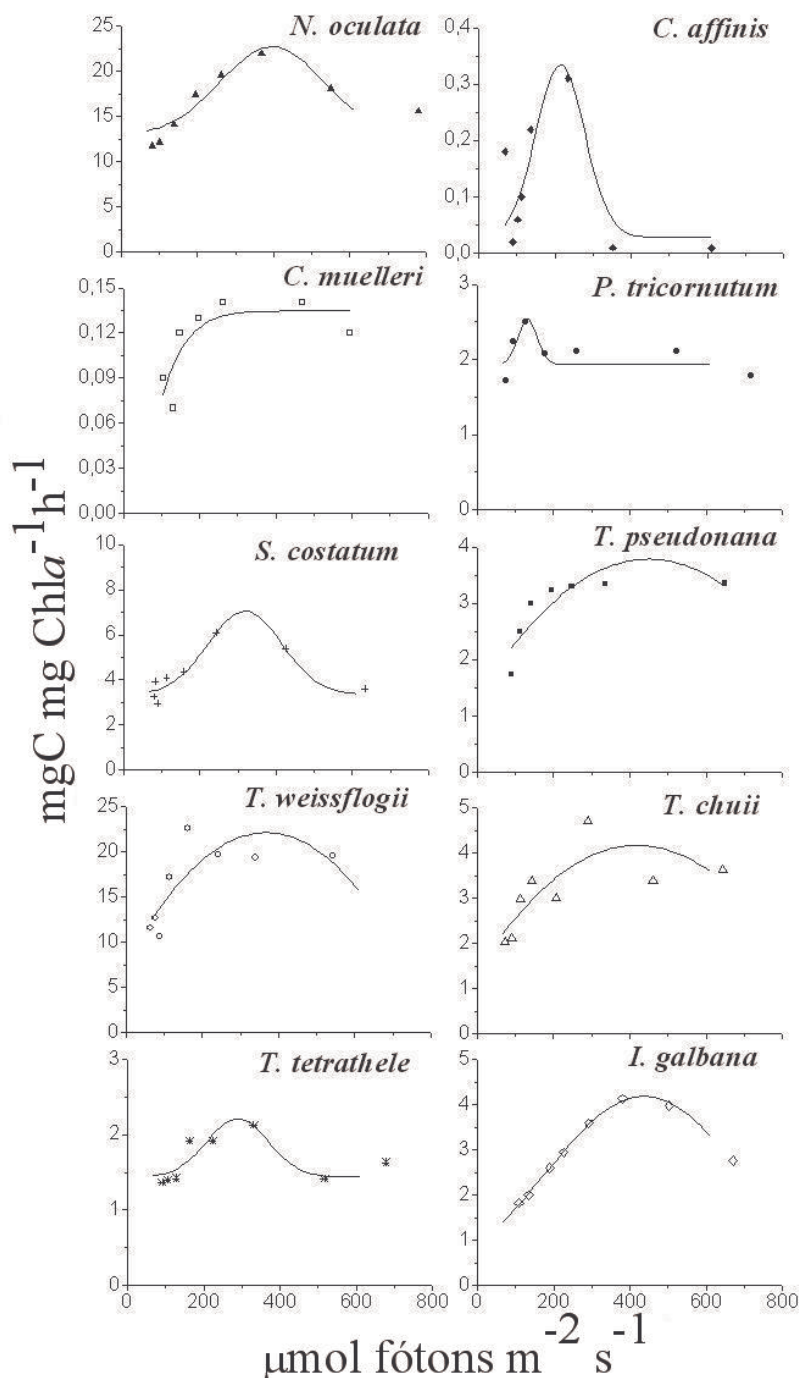


FIGURA 5 – Curvas produção ABM ( $\text{mgC mg Chl-}a^{-1} \text{h}^{-1}$ ) vs intensidade luminosa ( $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) das esp\u00e9cies testadas.

**An\u00e1lise estat\u00edstica**

A aplica\u00e7\u00e3o do Teste de Kruskal-Wallis para os tr\u00eas experimentos (PP, PD e PT –ABM) resultou na separa\u00e7\u00e3o de dois grupos de microalgas, de acordo com o n\u00edvel de produ\u00e7\u00e3o: (1) produ\u00e7\u00e3o mais baixa e (2) com produ\u00e7\u00e3o mais elevada. Para a PP, o grupo de esp\u00e9cies com valores estatisticamente mais baixos (menores que  $4 \text{ mgC mgCLA}^{-1} \text{h}^{-1}$ ), foi formado por *S. costatum*, *C. affinis*, *C. muelleri*, *T. tetrathele* e *I. galbana*; e o grupo com valores mais altos, pelas esp\u00e9cies *N. oculata*, *P. tricornutum*, *T. weissflogii* e *T. chuii*. Para a PD e PT (ABM), os grupos foram, *P. tricornutum*, *C. affinis*, *C. muelleri* e *T. tetrathele* com produ\u00e7\u00e3o mais baixa (menores que 0,7 para PD e menores que  $4 \text{ mgC mgCLA}^{-1} \text{h}^{-1}$  para PT), e *N. oculata*, *S. costatum*, *T. weissflogii*, *T. chuii* e *I. galbana* com

produção mais alta. Resultados obtidos com *T. pseudonana* não foram significativamente diferentes para nenhum dos tratamentos analisados.

## DISCUSSÃO

Através das curvas P<sub>xl</sub> é possível se obter informações sobre a fisiologia da alga tais como sua capacidade fotossintética, ponto máximo de saturação de luz, onde ocorre a produção fotossintética máxima, e o seu comportamento em condição de pouca ou intensa luminosidade. Os parâmetros fotossintéticos das curvas P<sub>xl</sub> apresentam particular relevância para quantificar o fluxo de carbono, bem como para prever a época do ano mais propícia para o florescimento de determinadas espécies, considerando-se condições favoráveis de nutrientes e temperatura.

Entre as algas testadas neste estudo, *Nannochloropsis oculata* e *Thalassiosira weissflogii* apresentaram as maiores taxas de fixação de carbono, com valores no mínimo duas vezes mais altos quando comparados aos resultados das outras oito espécies testadas. O P<sub>máx</sub> representa a taxa máxima de fotossíntese exibida por uma população de microalgas, usualmente padronizada pelo teor de clorofila (índice de assimilação, Parsons et al. 1984), sendo importante para identificar a sua capacidade fotossintética e indicar as espécies mais produtivas. Neste estudo, o P<sub>máx</sub> (ABM) das espécies *N. oculata* e *T. weissflogii* foi de 20,8 e 23,9 mgC mgCLA<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, respectivamente. Esses valores são considerados altos, mesmo que possam sofrer alguma alteração, uma vez que variações de nutrientes ocorrem em cultivos estáticos. Com base nos valores obtidos para *N. oculata* e *T. weissflogii*, calculamos uma absorção aproximada de 17 a 32 ton C ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>. Obviamente estes valores deveriam ser confirmados através de experimentos de “escalonamento”, isto é, aumentando-se o volume de cultivo. Mesmo assim a estimativa obtida neste estudo estaria de acordo com o citado por Margalef (1995) para microalgas cultivadas em condições ótimas (11–36 ton C ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>), representando uma produtividade de aproximadamente três a treze vezes os valores citados para o reflorestamento (3 - 4 ton C ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>).

Para *C. muelleri*, *T. pseudonana* e *T. weissflogii*, a intensidade luminosa parece ter interferência na produção dissolvida, com uma alta liberação de carbono dissolvido em intensidades de luz mais baixas, e sua redução com o aumento da irradiância. As duas espécies mais produtivas, *T. weissflogii* e *N. oculata*, apresentaram baixa contribuição de produção dissolvida nas intensidades luminosas de P<sub>máx</sub>. A maioria das espécies apresentou valores baixos de produção dissolvida, exceto *C. affinis*, *C. muelleri*, *S. costatum*, nas quais esta fração representou grande parte da produção total, chegando a 58% em *C. muelleri*. Constata-se portanto, uma grande variação entre as respostas fisiológicas das espécies, e a importância de medir a liberação do carbono orgânico dissolvido na quantificação do fluxo de carbono.

Apesar do significado ecológico e biogeoquímico bem conhecido, a produção de carbono orgânico dissolvido não é habitualmente medida na maioria das pesquisas de produtividade marinha, que tipicamente incluem apenas as determinações de carbono orgânico particulado. A medida da produção primária total pela técnica ABM (Schindler et al. 1972) foi introduzida como uma alternativa para reduzir os erros associados com a filtração e para acrescentar a fração dissolvida da produção primária estimada através de <sup>14</sup>C, não considerada pela técnica clássica de filtração de Steeman Nielsen (1952). O método ABM considera as duas frações da produção primária, sendo portanto mais acurado (Abreu et al. 1994); a desconsideração da fração dissolvida pode conduzir a significativa subestimativa da real taxa de fixação de carbono em ecossistemas altamente produtivos (Marañón et al. 2004).

Na comparação entre os dados da produção total ABM com a produção total PP+PD, a dispersão dos dados é menor nos valores mais baixos de produção indicando que a possibilidade de erros aumenta ao se utilizar somente o método de medição da fração particulada de produção, especialmente em experimentos com microalgas em cultivo ou no ambiente em situações de alta produção de carbono.

*T. weissflogii* e *N. oculata*, as espécies mais produtivas, também apresentaram os maiores valores de  $\alpha$ . A inclinação inicial da reta ( $\alpha$ ) indica a eficiência de absorção de luz e na conversão de energia fotossintética

(Henley 1993), sendo definida como a “eficiência fotossintética” (Parsons et al. 1984). Ela depende do conteúdo de pigmentos da célula e de suas características de absorção e, em geral, resultaria de aspectos fisiológicos e bioquímicos da célula (Lalli & Parsons 1993) como a presença de pigmentos acessórios (aumentam o  $\alpha$ ), o estado fisiológico e as condições de crescimento da microalga. Em cultivos, este parâmetro expressa a capacidade de aproveitamento da luz para a fotossíntese em situações de sombreamento, indicando as espécies que podem obter benefícios no caso de pouca luminosidade. Tendo em vista que em cultivos “outdoor” a luz é um dos principais fatores limitantes do crescimento de microalgas, tanto num nível máximo quanto no mínimo (Borowitzka 1999), torna-se importante conhecer a eficiência fotossintética das espécies.

Os valores de  $I_k$  (intensidade luminosa de saturação) indicam o grau de adaptação a intensidade luminosa, com valores altos indicando uma adaptação à intensidade mais alta de luz, e valores baixos uma adaptação à sombra. *N. oculata*, *C. muelleri*, *T. pseudonana* e *I. galbana* apresentaram valores de  $I_k$  mais altos, e *C. affinis* e *P. tricornutum* mais baixos. Segundo Morris (1980), espécies adaptadas à sombra mostram fotoinibição em intensidades luminosas mais baixas, enquanto que espécies adaptadas à luz tendem a ter menor eficiência fotossintética, mas parecem ser menos suscetíveis a fotoinibição.

### Indicações de espécies com maior fixação de carbono para cultivos em grande escala:

*Thalassiosira weissflogii* e *Nannochloropsis oculata* apresentaram as maiores taxas de crescimento e produção de biomassa, o que estaria ligado a melhor eficiência fotossintética e a baixa liberação de carbono dissolvido na intensidade luminosa  $I_k$ , ou seja no ponto máximo de saturação de luz, onde ocorre a produção fotossintética máxima ( $P_{máx}$ ). A liberação de carbono orgânico dissolvido no meio contribui para o crescimento acelerado de bactérias e conseqüentemente de outros microorganismos, o que seria indesejável neste tipo de cultura, criando gastos extras com a adição de antibióticos ao meio.

De acordo com seu comportamento de adaptação à sombra, *Thalassiosira weissflogii* é indicado o seu cultivo em intensidades luminosas de aproximadamente  $200 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , como em situação de sombreamento, ou em períodos de inverno em região geográfica temperada. Já para *Nannochloropsis oculata* os cultivos seriam recomendados sob condições de intensidade luminosa de aproximadamente  $400 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

## CONCLUSÕES

Dentre as dez espécies analisadas neste estudo, consideramos *N. oculata* e *T. weissflogii*, as mais recomendadas para cultivos em grande escala na aquicultura, e indicamos sua escolha para estudos de biotecnologia para mecanismos de desenvolvimento limpo (MDL), como por exemplo na produção de biocombustíveis.

## AGRADECIMENTOS

Este estudo foi financiado com verbas do projeto “Cultivo de microalgas de água estuarina e costeira como alternativa para absorção de dióxido de carbono da atmosfera” do convênio FURG/FAURG – CENPES/PETROBRAS. C. Odebrecht e P.C. Abreu são Bolsistas de Produtividade do CNPq. Agradecemos as sugestões e críticas de dois Revisores anônimos a este trabalho.

## LITERATURA CITADA

- ABREU, PC, C ODEBRECHT & A GONZÁLEZ. 1994. Particulate and dissolved phytoplankton production of the Patos Lagoon estuary, southern Brazil: comparisons of methods and influencing factors. J. Plankton Res. 16 (7): 737 – 753.
- ABU-REZQ, TS, L AL-MUSALLAM, J AL-SHIMMARI, & P DIAS. 1999. Optimum production for different high-quality marine algae. Hydrobiologia 403, 97-107.

- ARAÚJO, MSM 2000. Relatório de análise de Desenvolvimento Limpo – MDL. ANEEL. (<http://www.ivig.coppe.ufrj.br/doc/r1parte2d.pdf>)
- BOROWITZKA, MA & LJ BOROWITZKA. 1988. Micro-algal biotechnology. Cambridge, Cambridge University. 477p.
- BOROWITZKA, MA. 1999. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. J. Biotechnol. 70: 313 - 321.
- BROWN, LM. & KG ZEILER. 1993. Aquatic biomass and carbon dioxide trapping. Energy Convers. Mgmt. Vol. 34, nº 9-11: 1005-1013.
- BROWN, MR, SW JEFFREY, JK VOLKMAN, & GA DUNSTAN. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. Aquaculture, 151: 315-331.
- BRUNEL, J. 1970. Le phytoplancton de la Baie des Chaleurs. Montreal. Les presses de l'université de Montréal, 365p.
- FÁBREGAS, J, A MASEDA, A DOMINGUEZ & A OTERO. 2004. The cell composition of *Nannochloropsis* sp. Changes of different irradiances in semicontinuous culture. World J. Microbiol. Biotechnol. 20: 31–35.
- FALKOWSKI, PG & JA RAVEN. 1997. Aquatic Photosynthesis. Oxford. Blackwell Scientific Publishers. 374p.
- GOLDMAN, JC 1977. Temperature effects on phytoplankton growth in continuous culture. Limnol. Ocean. 22, 932-935.
- GUILLARD, RRL. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, WL & MH CHANLEY (Eds.) Culture of Marine Invertebrate Animals. New York. Plenum, 29-60.
- HENLEY, WJ 1993. Measurement and interpretation of photosynthetic light–response curves in algae in the context of photoinhibition and diel changes. J. Phycol. 29: 729-739.
- KAPLAN, D, Z COHEN & A ABELIOVICH. 1986. Optimal growth conditions for *Isochrysis galbana*. Biomass (9), 37-48.
- KIRSCHBAUM, MUF. 2003. To sink or burn? A discussion of the potential contributions of forests to greenhouse gas balances through storing carbon or providing biofuels. Biomass Bioenergy, 24: 297-310.
- KURANO, N, H IKEMOTO, H MIYASHITA, T HASEGAWA, H HATA & S MIYACHI, 1995. Fixation and utilization of carbon dioxide by microalgal photosynthesis. Energy Convers. Mgmt. Vol. 36, nº 6-9: 689-692.
- LALLI, C & T PARSONS. 1993. Biological Oceanography: an Introduction. Oxford, Butterworth & Heinemann Ltd. 301 p.
- LAVENS, P & P SORGELOOS. 1996. Manual on the production and use of live food for aquacultures. FAO Fisheries Technical Paper. Nº 361. Rome, FAO. 295p.
- LUBIÁN, LM, O MONTERO, I MORENO-GARRIDO, IE HUERTAS, C SOBRINO, M GONZÁLEZ-del VALLE, & G PARES. 2000. *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. J. appl. Phycol. 12: 249-255.
- MACEDO, MF, P DUARTE, & JG FERREIRA. 2002. The influence of incubation periods on photosynthesis-irradiance curves. J. Exp. Mar. Bio. Ecol. 274: 101-120
- MARAÑÓN, E, P CERMEÑO, E FERNÁNDEZ, J RODRIGUEZ & L ZABALA. 2004. Significance and mechanisms of photosynthetic production of dissolved organic carbon in a coastal eutrophic ecosystem. Limnol. Oceanogr., 49(5)1652–1666.
- MARGALEF, R 1995. Ecología. Barcelona, Omega S.A., 958p.
- MCGINNIS, KM, TA DEMPSTER & MR SOMMERFELD. 1997. Characterization of the growth and lipid content of the diatom *Chaetoceros muelleri*. J. appl. Phycol. 9, 19-24.
- MESECK, SL, JH ALIX, GH WIKFORS. 2005. Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by the aquaculture feed microalga, *Tetraselmis chui* (PLY429). Aquaculture 246: 393– 404
- MORRIS, I 1980. The physiological ecology of phytoplankton. California. University of California Press. 625p.
- NIELSEN, GE. & AM BRESTA. 1984. Guidelines for the measurement of phytoplankton primary production. Baltic. Mar. Biol. Publ. 1: 1-23.
- PARSONS, TR, M TAKAHASHI & B HARGRAVE 1984. Biological Oceanographic Processes, 3<sup>rd</sup> ed. Oxford, Pergamon Press Ltd. 330p.
- PERNET, F, R TREMBLAY, E DEMERS, M ROUSSY. 2003. Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis* sp. grown in a semicontinuous system. Aquaculture 221: 393–406.
- REITAN, KI, JR RAINUZZO & Y OLSEN. 1994. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae. J. Phycol., 30:972-979.
- SCHINDLER, DW, RV SCHMIDT & RA REID. 1972. Acidification and bubbling as an alternative to filtration in determining phytoplankton production by the <sup>14</sup>C method. J. Fish. Res. Board Can. 29: 1627-1631.
- STEEMAN NIELSEN, E. 1952. The use of radioactive carbon (<sup>14</sup>C) for measuring primary production in the sea. J. Cons. Explor. Mer. 18: 117 – 140.
- STRICKLAND, JDH. & TR PARSONS. 1972. A Practical handbook of seawater analysis. J. Fish Res. Board. Can. Ottawa, 310p.
- WELSCHMEYER, NA. 1994. Fluorometric analysis of chlorophyll a in the presence of chlorophyll b and phaeopigments. Limnol. Oceanogr. 39 (8): 1985-1992.
- WONNACOTT, TH. & RJ WONNACOTT 1980. Introdução à estatística. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. 589 pp.
- ZITTELLI, GC, F LAVISTA, A BASTIANINI, L RODOLFI, M VINCENZINI & MR TREDICI. 1999. Production of eicosapentaenoic acid by *Nannochloropsis* sp. cultures in outdoor tubular Photobioreactors. J. Biotechnol. 70: 299–312.