

# Morfotipos de novos isolados de microalgas da Coleção do Laboratório de Biotecnologia de Algas da Embrapa Agroenergia

*Cesar Heraclides Behling Miranda<sup>1</sup>, Rosana Falcão<sup>2</sup>, Brenda Rabello de Camargo<sup>3</sup>, Daniela Flávia Machado Turati<sup>4</sup>, Lorena Costa Garcia Calsing<sup>5</sup>*

## Resumo

São reportados os procedimentos realizados com o objetivo de caracterizar os morfotipos obtidos de colônias de microalgas isoladas em meio de cultura tendo como fonte principal de Nitrogênio o nitrato (meio BG11) ou amônio (meio BGUF). Estes isolados resultaram do crescimento de microalgas coletadas de lagoas ou poças de água ao longo da Estrada Parque Pantanal, no Mato Grosso do Sul, em viagem realizada em 11 de novembro de 2019. Após crescimento inicial em meio líquido, amostras foram riscadas em placas com meios semissólidos, com posterior repicagem de colônias selecionadas ao acaso para novo crescimento em meio líquido. Então, frações de 1 mL foram separadas, tratadas com solução fixadora (2,5% glutaraldeído em 0,1M cacodilato de sódio, pH 7,2) e montadas em lamínulas, para observação em Microscópio Óptico AxioImage Z2, marca Zeiss, em contraste de interferência diferencial. As microalgas presentes foram registradas digitalmente, usando-se câmera digital IcC3 e o software Zen-Zeiss, avaliando-se os descritores morfológicos visíveis de núcleo, estrutura do talo, forma e cor. A fotodocumentação das microalgas isoladas resultou numa variedade significativa de morfotipos, com predominância de formas cocoides ou assemelhadas, em detrimento de formas filamentosas. Tal resultado indica que é necessário cuidado nos procedimentos iniciais de seleção para não serem isolados apenas microalgas de um macrogrupo específico, limitando-se o enriquecimento da diversidade de algas numa coleção de diferentes espécies.

**Palavras-chave:** biodiversidade, microalgas cocoides, microalgas filamentosas, microscopia de contraste, morfotipos.

## Introdução

Microalgas são organismos fotossintéticos que crescem em ambientes úmidos (rios, lagos, mares ou solos) e tem potencial econômico para a sua utilização em vários bioprodutos como óleos combustíveis, produção de pigmentos, formulações cosméticas, ração animal e suplementos alimentares (Khan et al., 2018). As microalgas

<sup>1</sup> Engenheiro-agrônomo, doutor em Microbiologia e Bioquímica do Solo, pesquisador da Embrapa Agroenergia, cesar.miranda@embrapa.br

<sup>2</sup> Bióloga, mestre em Ciências Genômicas e Biotecnologia, analista da Embrapa Agroenergia, rosana.falcao@embrapa.br

<sup>3</sup> Bioquímica, doutora em Ciências, Biologia Molecular, consultora da Embrapa Agroenergia, brendarc@gmail.com

<sup>4</sup> Bióloga, mestre em Microbiologia Aplicada, bolsista DTI do CNPq, daniela.flavia@colaborador.embrapa.br

<sup>5</sup> Engenheira de Alimentos, doutora em Ciências, analista da Embrapa Agroenergia, lorena.garcia@embrapa.br

englobam organismos de dois super-reinos procariontes e eucariontes, por isso a classificação taxonômica acurada dos indivíduos deve ser multidisciplinar atendendo a critérios mínimos de características morfológicas, composição bioquímica (pigmentos e cloroplastos), ultraestrutura celular (disposição dos tilacoides), ciclo de vida, tipo de reprodução e dados de sequências genômicas por técnicas de biologia molecular.

A coleção de microalgas do Laboratório de Biotecnologia de Algas da Embrapa Agroenergia foi iniciada em 2012 (Brasil; Garcia, 2016) e conta atualmente com 24 acessos cadastrados no Banco de Microrganismos e Microalgas Aplicados a Agroenergia e Biorrefinarias no Portal Alelo (<http://alelo.cenargen.embrapa.br/>). Estes acessos foram inicialmente isolados de vários biomas brasileiros, como Pantanal, Amazônia, Mata Atlântica e Cerrados, os quais foram caracterizados por biologia molecular ou por morfologia para designação taxonômica possibilitando assim o seu registro no banco e a sua utilização em estudos para produção de biomassa e metabólitos de interesse, visando o desenvolvimento de bioprodutos.

A coleção é mantida atualizada, por repicagem e limpeza de manutenção das cepas armazenadas, bem como aumentada, por troca com outras coleções ou por coletas próprias. Neste trabalho são apresentados resultados iniciais de estudos morfológicos de um grupo de cepas isoladas a partir de viagem de coleta realizada em 2019, visando avaliar o potencial de cepas individuais para inclusão na coleção e estudos posteriores.

O objetivo deste trabalho é produzir informações preliminares sobre acessos isolados através de fotodocumentação diferencial, para facilitar o reconhecimento e análise dos principais descritores morfológicos individuais para auxiliar sua posterior classificação taxonômica.

## Material e Métodos

Em viagem de coleta realizada no dia 11 de novembro de 2019, foram coletadas, principalmente, ao longo da Estrada Parque do Pantanal (rodovias MS 184 e MS 228), amostras de água de lagoas ou poças de água a beira da estrada, cerca de 50 mL de água, que foram armazenadas em tubos Falcon. Para cada local de foram anotadas as coordenadas geográficas (Tabela 1), obtidas usando-se aplicativo interno de telefone celular.

Os tubos com as amostras foram armazenados em caixa de isopor e transportados para a Embrapa Agroenergia, onde amostras de 5 mL foram dispostas em tubos de ensaio fechados contendo 50 mL de meio de crescimento BG11, como descrito por Allen e Steiner (1968), ou meio de crescimento BGUF, como descrito em Ribeiro et al. (2020), respectivamente. Posteriormente, observando-se turbidez do meio e outros sinais característicos de crescimento de algas, especialmente a coloração esverdeada, fez-se de repicagem de cada um dos tubos para placas contendo os mesmos meios semissólidos, pelo acréscimo de Agar. Após o crescimento de colônias individuais nas placas, um total de 40 colônias (20 do meio BGUF e 20 do meio BG11) foi escolhido, sendo repicadas novamente nos respectivos meios líquidos, para conservação e análises posteriores. De forma geral, os procedimentos de isolamento e crescimento das amostras seguiram aqueles preconizados nos trabalhos apresentados na obra de Andersen (2005).

Das 40 amostras obtidas, 1 mL foi colhido após agitação do meio respectivo e disposto em Ependorf para avaliações microscópicas, após processo inicial de fixação e montagem

das lâminas. Para tal, foram retirados 200 uL de amostra e colocados em 400 uL de solução fixadora (2,5% glutaraldeído em 0,1M cacodilato de sódio, pH 7,2), por 24h a 4°C. Após uma centrifugação rápida a solução fixadora foi trocada por tampão 0,05M de cacodilato de sódio, pH 7,2, montando-se rapidamente as lâminas com glicerol 25% sob lamínulas pré-lavadas. As lâminas foram então avaliadas utilizando-se o Microscópio óptico Axiolmage Z2 da marca Zeiss, em contraste de interferência diferencial. Durante as observações, as microalgas presentes foram registradas digitalmente, usando-se câmera digital IcC3 e o software Zen-Zeiss. Foram avaliados para os descritores morfológicos visíveis de núcleo, estrutura do talo, forma e cor, segundo Bellinger e Sigee (2010) e Andrade e Colozzi Filho (2014), utilizando-se os seguintes critérios:

- I. Núcleo
  - A. Presente (eucarioto).
  - B. Ausente (procarioto).
- II. Estrutura do talo
  - A. Talo unicelular
    - i. Imóvel: ausência de flagelos.
    - ii. Móvel: flagelado (geralmente 2).
  - B. Talo colonial
    - i. Cenobial: número de indivíduos e forma de colônia definidos.
    - ii. Tetraspórica: número de indivíduos e forma da colônia indefinidos.
  - C. Talo multicelular
    - i. Filamentoso (filamento unitário ou soldado a outros).
    - ii. Parenquimatoso (tecido mais ou menos compacto).
- III. Forma principal
  - A. Cooide – célula arredondada ou esférica.
  - B. Ovoide/elipsoide – esférica ovalada simétrica.
  - C. Obovoide – oval com uma extremidade mais larga e a outra afilada.
  - D. Cilíndrica – forma de cilindro que pode ser curto ou longo com extremidades arredondadas.
  - E. Fusiforme – forma cilíndrica alongada com as extremidades afuniladas.
  - F. Filamentosa – formato de fios.
- IV. Cor
  - A. Verde azulada.
  - B. Verde débil.
  - C. Verde.
  - D. Verde intenso.
  - E. Parda (amarelo - marrom).

## Resultados e Discussões

As características gerais das cepas observadas por microscopia, a partir de isolados da viagem de coleta realizada ao longo da Estrada Parque Pantanal, no Mato Grosso do Sul (Tabela 1) estão dispostas na Tabela 2. De forma geral, verifica-se que predominaram as formas cocoides ou características de microalgas individuais (Tabela 2, Figura 1). Apenas um isolado, o número 9, apresentou forma filamentosa, muito embora fossem observadas várias formas indicativas destes morfotipos de microalgas nas amostras crescidas na primeira fase.

**Tabela 1.** Identificação das amostras e seus locais de coleta ao longo da Estrada Parque Pantanal, bem como o meio de cultural do isolamento original. Coleta realizada em 11 de Novembro de 2019.

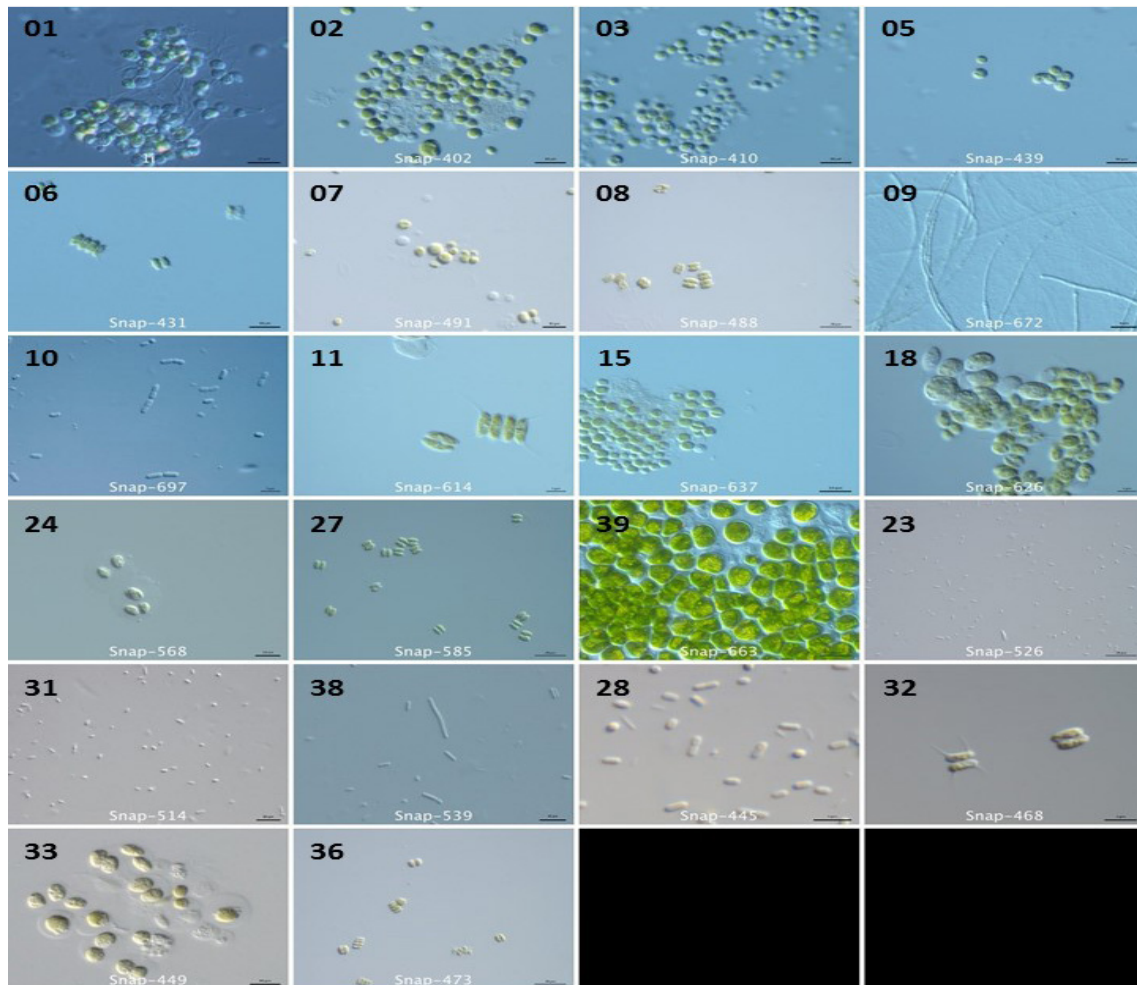
Número da amostra	Meio de isolamento	Latitude	Longitude	Altitude (m)
1	BGUF	20; 27; 32.20000	55; 37; 17.37499	nd
2	BGUF	19; 28; 18.52139	57; 2; 39.53969	99.55
3	BGUF	19; 28; 10.28250	57; 2; 40.00810	112.517
5	BGUF	20; 27; 32.20000	55; 37; 17.3749	nd
6	BGUF	20; 14; 1.259799	56;22;52.05710	122
7	BGUF	20; 27; 16.74999	54; 35; 1.43160	580
8	BGUF	20; 27; 16.74999	54; 35; 1.43160	580
9	BGUF	20; 14; 1.259799	56;22;52.05710	122
10	BGUF	19; 23; 25.48759	57; 2; 59.36656	92,667
11	BGUF	19; 23; 25.48759	57; 2; 59.36656	92,667
15	BGUF	19; 28; 18.52139	57; 2; 39.53969	99.55
18	BGUF	19; 37; 14.94150	57; 2; 4.287099	98.44
23	BG11	20; 14; 1.259799	56;22;52.05710	122
24	BG11	20; 27; 32.20000	55; 37; 17.3749	nd
27	BG11	19; 28; 18.52139	57; 2; 39.53969	99.55
28	BG11	19; 37; 14.94150	57; 2; 4.287099	98.44
31	BG11	19; 23; 25.48759	57; 2; 59.36656	92,667
32	BG11	19; 15; 35.87919	57; 14; 1.00459	106.944
33	BG11	19; 15; 35.87919	57; 14; 1.00459	106.944
36	BG11	20; 4; 56.415099	56; 45; 17.2282	134,01
38	BG11	19; 15; 28.89860	57; 9; 3.570500	112,575
39	BG11	19; 15; 27.22669	57; 18; 6.05489	95.776

**Tabela 2.** Resumo dos descritores morfológicos observados nos isolados de microalgas.

Amostra	Núcleo	Estrutura do talo	Forma	Cor do isolado
1	Presente	Unicelular móvel	Cocoide	Verde
2	Presente	Unicelular imóvel	Cocoide	Verde
3	Presente	Unicelular imóvel	Cocoide	Verde débil
5	Presente	Unicelular imóvel	Cocoide	Verde débil
6	Presente	Colonial cenobial	Fusiforme	Verde
7	Presente	Unicelular imóvel	Cocoide	Verde
8	Presente	Colonial cenobial	Fusiforme	Verde
9	Presente	Multicelular filamentosos	Filamentosa	Pardo
10	nd	Unicelular	Cilíndrica	Verdestra
11	Presente	Colonial cenobial	Fusiforme	Verde
15	Presente	Colonial tetraspórica	Cocoide	Verde
18	Presente	Colonial tetraspórica(?)	Elipsoide	Verde
23	nd	Unicelular	Cilíndrica	Pardo
24	Presente	Colonial tetraspórica(?)	Elipsoide	Verde
27	Presente	Colonial cenobial	Fusiforme	Verde
28	nd	Unicelular	Cilíndrica	Pardo
31	nd	Unicelular	Cilíndrica	nd
32	Presente	Colonial cenobial	Fusiforme	Verde
33	Presente	Colonial tetraspórica	Elipsoide	Verde
36	Presente	Colonial cenobial	Fusiforme	Verde
38	nd	Unicelular	Cilíndrica	Verde azulada
39	Presente	Unicelular imóvel	Cocoide	Verde intenso

Devido à forma de isolamento, em meio líquido e posterior formação de colônias em meio semissólido, é de se esperar que as espécies com taxa de duplicação mais rápidas, como as cocoides, predominem dentre os isolados. Isto, por um lado, é altamente desejável, pois indica que estas espécies podem ser bastante competitivas, crescendo rapidamente. Dependendo do seu conteúdo em metabólitos de interesse e produção de biomassa, podem ser de alto interesse para produção massal (Coelho et al., 2019).

Por outro lado, as espécies filamentosas são mais difíceis de formarem colônias em meio semissólido. Com isto, dificilmente serão selecionadas no tipo de procedimento usado nesse estudo. Entretanto, elas possuem características vantajosas relacionadas ao seu morfotipo, pois são separadas e colhidas do meio do crescimento mais facilmente e com menor custo do que células cocoides de menor diâmetro e massa. Sabe-se que a colheita de biomassa algal é um dos maiores impedimentos para o aproveitamento de microalgas em escala industrial (Pragya et al., 2013).



**Figura 1.** Fotodocumentação em contraste de interferência diferencial das microalgas isoladas.

Assim, neste estudo, de certa forma, foram privilegiadas as microalgas cocoides e assemelhadas, sendo necessário buscarem-se formas alternativas de isolamento para aumentar o número de acessos de microalgas filamentosas.

O procedimento de fixação das células com a técnica utilizada para observação ao microscópio se mostrou bastante favorável para a fase de isolamento e caracterização inicial, pois manteve as características básicas das cepas, permitindo observações com boa riqueza de detalhes. As informações microscópicas coletadas constituem informações importantes dos acessos isolados, suficientes para o preenchimento dos principais descritores morfológicos individuais, sendo úteis para fomentar a classificação taxonômica dos candidatos a cadastro no Banco AleloMicro de microalgas. Desta forma, a coleção de algas da Embrapa Agroenergia está sendo enriquecida com estes novos representantes da biodiversidade brasileira, abrindo-se o leque de opções de espécies para estudos posteriores nos diversos campos de aplicação biotecnológica destes microrganismos.

## Conclusões

A fotodocumentação de isolados de microalgas coletados em lagoas ou poças de água da região do Pantanal por microscopia de contraste mostrou variedade de morfotipos, com nível de detalhes que permitirá diferenciação entre isolados e posterior classificação de gêneros ou espécies.

O método de cultivo inicial em meio líquido e seleção de colônias crescidas por repique em meio semissólido favorece a seleção de formas cocoides ou assemelhadas, em detrimento de formas filamentosas.

## Referências

- ALLEN, M. M., STEINER R. Y. Selective isolation of blue-green algae from water and soil. **Journal of General Microbiology**, **51**: 203-209, 1968.
- ANDERSEN, R. A. **Algal culturing techniques**. Academic Press, New York, 2005. 504 p.
- ANDRADE, D. S., COLOZZI FILHO, A. **Microalgas de águas continentais. Volume 3. Coleção IPR de microalgas**. Instituto Agrônomo do Paraná, Londrina, PR. 2014. 57 p.
- BELLINGER, E.G.; SIGEE, D.C. A Key to the More Frequently Occurring Freshwater Algae. In: BELLINGER, E.G.; SIGEE, D.C. (Ed.). Chapter 4: **Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators**. John Wiley & Sons Ltd. 2010. p. 137–244. DOI: 10.1002/9780470689554.
- BRASIL, B. S. A. F., GARCIA, L. C. Microalgas: alternativas promissoras para a indústria. **Agroenergia em Revista – Microalgas** 10: 6-11, 2016.
- COELHO, D. F.; TUNDISI, L. L.; CERQUEIRA, K. S.; RODRIGUES, J. R. S.; MAZZOLA, P. G.; TAMBOURGI, E. B., SOUZA, R. R. Microalgae: cultivation aspects and bioactive compounds. **Brazilian Archives of Biology and Technology** **62**: e19180343, 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4324-2019180343>
- KHAN, M. I.; SHIN, J. H. KIM, J. D. **The promising future of microalgae**: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, **17**, 36, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>.
- PRAGYA, N.; PANDEY, K. K.; SAHOO, P. K. A review on harvesting, oil extraction and biofuels technologies from microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews** **24**: 159-171, 2013.
- RIBEIRO, D. G; ROCARRATTI, L. F.; POSSA, G. C.; GARCIA, L. C.; CANÇADO, L. J.; WILLIAMS, T. C. R., BRASIL, B. S. A. F.. A low-cost approach for *Chlorella sorokiniana* production through combined use of urea, ammonia and nitrate based fertilizers. **Bioresource Technology Reports** **9**: 1-9, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bitech.2019.100354>