



**CAPTAR**  
ciência e ambiente para todos

volume 10 • 2021 • art. 8

## Relação entre a disponibilidade de ferro (Fe<sup>2+</sup>) e a capacidade de sequestração de CO<sub>2</sub> pela espécie

### *Tetraselmis chuii*

O ferro provou ser um elemento fulcral para o balanço biogeoquímico da produtividade primária da zona eufótica dos oceanos. Estudos de “fertilização” em ferro que procuraram estabelecer esta relação foram conduzidos preferencialmente em meso- e macro- escala, embora experiências de pequena escala reflitam com rigor os processos que ocorrem *in situ*. Neste sentido, foi estudada a resposta da microalga *Tetraselmis chuii* a diferentes concentrações de Ferro (Fe<sup>2+</sup>), cultivando-a em três grupos experimentais: controlo (meio F/2), II (F/2 + 2x Fe<sup>2+</sup>) e III (F/2 + 4x Fe<sup>2+</sup>). Foi calculado o peso seco, que permitiu a determinação da biomassa algal ( $m_a$ , g L<sup>-1</sup>) e da massa de carbono inorgânico sequestrado ( $m_{Ci}$ , g L<sup>-1</sup>). Comparativamente ao controlo ( $m_a = (1,7 \pm 0,58)$ ,  $m_{Ci} = 0,85$ ), o Grupo II ( $m_a = (2,6 \pm 0,58)$ ,  $m_{Ci} = 1,3$ ) e particularmente o III ( $m_a = (4,0 \pm 1,0)$ ,  $m_{Ci} = 2,0$ ) verificou-se uma diferença estatisticamente significativa na produção de biomassa e na sequestração de carbono. O presente estudo permitiu demonstrar a existência de um maior crescimento algal em culturas expostas a uma maior concentração de Fe, concluindo que a sequestração de CO<sub>2</sub> é potenciada usando concentrações crescentes daquele metal, pelo menos na gama de concentrações testada no presente estudo. Investigações subsequentes deverão procurar compreender a influência da adubação em ferro na proliferação de outras espécies, nomeadamente no que se refere às florescências de microalgas com potencial tóxico (*harmful algal blooms*, HBAs).

#### Palavras-chave

fertilização em ferro  
microalga  
cultivo *in situ*  
biomassa

Diogo FR Heleno<sup>1</sup>

Beatriz A Fernandes<sup>1</sup>

Joana ES Couto<sup>1</sup>

Rui P Fernandes<sup>1</sup>

Teresa Mougat<sup>2</sup> \*

<sup>1</sup> Escola Secundária Eng.º Acácio Calazans Duarte (ESEACD), Marinha Grande, Leiria, Portugal.

<sup>2</sup> Centro de investigação de Ciências do Mar e do Ambiente MARE, ESTM, Politécnico de Leiria, Portugal.

\*mougat@ipleiria.pt

ISSN 1647-323X

Artigo em acesso aberto sob [licença CC-BY](#)

© 2021 Autores

## INTRODUÇÃO

Durante as últimas décadas, o papel do ferro nos ecossistemas marinhos tem sido alvo de um interesse renovado, sendo cada vez mais sublinhado como um importante micronutriente bioativo e tido como um dos responsáveis pela relação biogeoquímica da produtividade dos oceanos (Martin, 1990), a qual resulta, ultimamente, do estabelecimento de complexas relações entre fatores ecofisiológicos dependentes da disponibilidade daquele metal, cuja concentração média à superfície do oceano ronda os picomolar. Alguns dos limites potenciais impostos pela fisiologia dos organismos à sua própria adaptação ao seu nicho ecológico incluem a relação entre consumo e fixação de carbono acoplado às taxas de respiração aeróbia e fotossíntese e à substanciação e sustentabilidade do crescimento e dinâmica populacionais. Estas concentrações poderão ser insuficientes para suportar elevadas quantidades de biomassa de fitoplâncton ou taxas de crescimento máximas.

Os estudos subordinados à avaliação dos efeitos de ferro (Fe) no crescimento de fitoplâncton em áreas de elevada concentração de nitratos e baixa concentração de clorofila têm sido realizados preferencialmente em macro- ou meso- escala, recorrendo a modelos globais biogeoquímicos a partir do estudo de ecossistemas completos, como o Oceano Antártico (Boyd *et. al.*, 2004; Gervais *et. al.*, 2002; Coale *et. al.*, 2004), a região este do Pacífico equatorial (Martin *et. al.*, 1994; Coale *et. al.*, 1996) ou o Pacífico subártico (Tsuda *et. al.*, 2003; Boyd *et. al.*, 2004). Porém, experiências de pequena escala podem também refletir com rigor processos que ocorrem *in situ* ao nível dos produtores primários ou ao nível químico.

O sucesso das experiências de “fertilização” em ferro *in situ* tem vindo a suportar a ideia da possibilidade de o enriquecimento artificial em micronutrientes do oceano poder vir a mitigar o aumento da quantidade de CO<sub>2</sub> atmosférico que resulta das atividades antropogénicas (Gribbin, 1998; Martin, 1990), a partir do desencadeamento da proliferação da comunidade fitoplânctónica. Este fenómeno de desenvolvimento de elevadas densidades de organismos em várias escalas de espaço e tempo de forma relativamente repentina e local ou geograficamente limitada (Al-Ghelani, Alkindi & Al-Akhzami, 2005) é designado por florescimento algal ou, por apropriação do termo anglo-saxónico, *algal bloom*. No entanto, tem surgido um debate considerável quanto a esta questão, mormente devido à dificuldade de, a partir de experiências de “fertilização” dispersa e de curto-prazo, se extrapolar em conclusões válidas à previsão dos cenários resultantes da adição massiva de Fe que seria necessário introduzir no oceano para afetar consideravelmente os níveis de CO<sub>2</sub> atmosférico (Chisholm *et. al.*, 1991; Buesseler & Boyd, 2003). Isto porque, apesar das grandes diferenças de magnitude nas respostas obtidas, virtualmente todos os estudos desenvolvidos até data provocaram, a partir da adição de Fe, uma redução superficial na pCO<sub>2</sub> que se localizaria entre os 50 partes por milhão em volume (ppmV) e os 107 ppmV após um século de “fertilização” ininterrupta. Assim, a “fertilização” ainda não aparenta prover a solução para a atual problemática do desequilíbrio carbónico, devido a uma previsível depleção parca e demorada em dióxido de carbono. Por outro lado, a “fertilização” em ferro poderá provocar, potencialmente, efeitos secundários que poderiam parcial ou totalmente anular as possíveis vantagens da mesma, tais como o aumento de situações de anóxia ou hipóxia na zona mesopelágica e no oceano profundo (Sarmiento & Orr, 1991; Jin & Gruber, 2003;

Gnanadesikan *et. al.*, 2003).<sup>1</sup>. Apesar de tudo, os resultados obtidos até hoje estão longe de poderem ser considerados insignificantes e ainda se revelam atrativos enquanto um de entre vários meios de capturar o carbono antropogénico (Aumont & Bopp, 2006). Com efeito, o aperfeiçoamento das técnicas de “fertilização” existentes encontra-se dependente da compreensão da resposta da biota pelágica<sup>2</sup> ao aumento da disponibilidade de Fe, nomeadamente a partir de bioensaios.

Os resultados de experiências laboratoriais baseadas em bioensaios desempenham também um papel crítico no apoio à hipótese de limitação de ferro<sup>3</sup> (Geider & La Roche, 1994), consistindo na análise de subamostras replicadas de uma amostra homogénea em balões de crescimento, alternando entre diferentes combinações de nutrientes potencialmente limitantes, registando a mudança na quantidade de biomassa, na fotossíntese ou na captação de nutrientes após incubação em condições idênticas por períodos de 1 dia a ~ 1 semana. Estudos daquela natureza, em que se enquadra o presente trabalho, permitem, pois, suprir algumas das lacunas da macro-escala, nomeadamente permitindo contrair o escopo do estudo, prontificando maior facilidade na interpretação dos resultados obtidos; aumentar a celeridade da reação estudada; evitar danos imprevisíveis no ecossistema alterado; permitir a viabilidade administrativa e económica do projeto.

A maioria dos bioensaios já realizados mediram as respostas ecológicas de populações de fitoplâncton, estudando, como variáveis dependentes, a concentração de clorofila *a*, a abundância de fitoplâncton ou o consumo de macronutrientes (e.g. CO<sub>2</sub>, NO<sup>3-</sup> e PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>). O presente trabalho tem como objetivo estudar o efeito da suplementação de Fe ao meio nutritivo F/2, comumente utilizado no crescimento de microalgas marinhas, utilizando a espécie *Tetraselmis chuii* Butcher 1959 como espécie modelo (Figura 1). Esta espécie é uma Chlorophyta tetraflagelada, fitoplanctónica marinha.

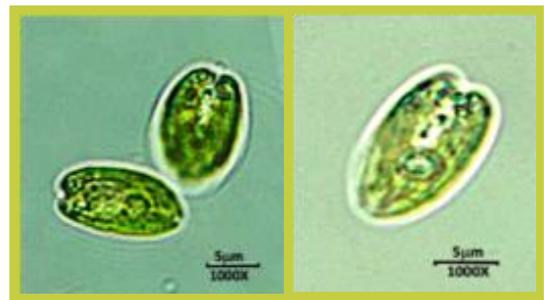


FIGURA 1. Célula de *Tetraselmis chuii* (fotos de Teresa Mougá).

Os sistemas de cultivo mais comuns de microalgas são os descontínuos (em *batch*). Estas são culturas muito dinâmicas, em que a população algal exhibe um crescimento característico, em curva sigmoide (ver Figura 2), consistindo numa sucessão de 6 fases de crescimento: fase *Lag* (1), onde não se verifica crescimento porque a população se está a adaptar às condições de cultivo; fase de aceleração (2), onde se verifica o início da divisão celular; fase exponencial (3), fase de crescimento constante no qual a população cresce alterando as condições do meio; fase de retardamento (4), na qual se observa o decréscimo do crescimento, dadas as alterações introduzidas no meio, designadamente a redução dos nutrientes

<sup>1</sup> Considere-se que o processo de fertilização potencia o crescimento de fitoplâncton, suportado pelo sequestro de dióxido de carbono e nutrientes à superfície do oceano. Esta depleção altera a distribuição em CO<sub>2</sub> e nutrientes na coluna de água, que se desloca preferencialmente para a profundidade, ao passo que a distribuição de oxigénio experimenta a tendência oposta. O conteúdo oceânico naquele gás concentra-se, portanto, à superfície, onde escapa para a atmosfera. Concomitantemente, a respiração aeróbia fitoplanctónica (estimulada por meio da fertilização) contribui para o consumo de oxigénio dissolvido nas águas do oceano.

<sup>2</sup> Refere-se aqui a biota que ocupa toda a coluna de água desde a superfície até acima dos sedimentos que cobrem o fundo oceânico.

<sup>3</sup> Hipótese que sugere que o ferro é um elemento limitante do crescimento algal, pelo que o enriquecimento do oceano neste metal poderia potenciar este crescimento, transferindo mais carbono para o oceano profundo, assim diminuindo os níveis de CO<sub>2</sub> atmosférico.

disponíveis, entre outras; fase estacionária (5), na qual o crescimento termina dado que um dos nutrientes ou a luz se tornou indisponível; e fase de declínio (6), onde o tamanho da população decresce. A duração da fase estacionária e a velocidade a que ocorre a fase de declínio variam de espécie para espécie (Barsanti & Gualtieri, 2014).

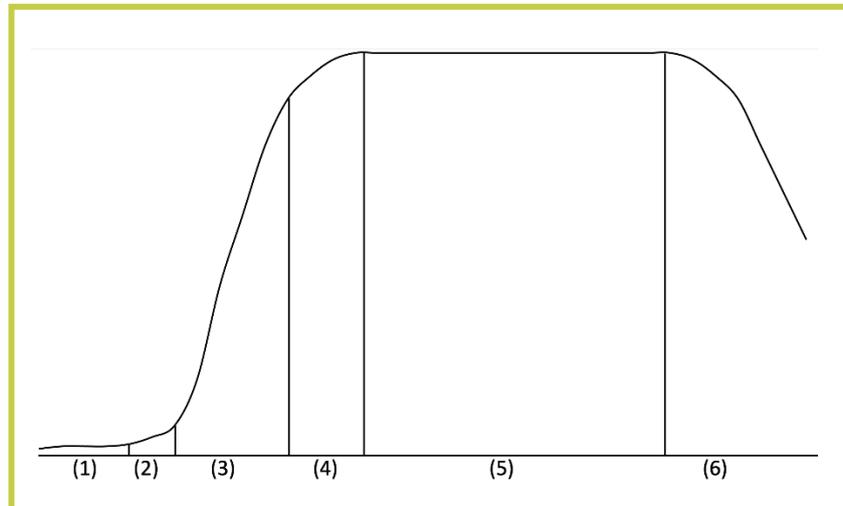


FIGURA 2: Curva de crescimento algal (fonte própria).

Espera-se obter a variação do crescimento da população *T. chuii* pela adição de Fe ao meio, durante a fase exponencial. Dos ajustamentos fisiológicos esperados, contam-se a alteração na concentração de determinadas enzimas, como a ferredoxina, bem como da sua atividade (Geider & La Roche, 1994). As respostas ecológicas envolvem frequentemente mudanças na estrutura da população estudada, sendo observáveis num período temporal curto, associadas à divisão celular e, portanto, ao crescimento populacional.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Meios de cultura e inóculos de microalgas

As culturas-mãe de microalgas em fase exponencial, num total de 5 L, e os meios de cultivo, foram fornecidos pela Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar (ESTM), Politécnico de Leiria, Peniche. O meio de cultura utilizado foi meio F/2 Guillard, cuja composição está descrita na Tabela 1. A espécie modelo utilizada foi a Chlorophyta marinha *Tetraselmis chuii*.

TABELA 1. Composição do meio F/2 (Guillard, 1975; Guillard &amp; Ryther, 1962).

Componente	Solução Stock	Quantidade
NaNO <sub>3</sub>	75 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	5 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O	30 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL
NaNO <sub>3</sub>	75 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL
Solução <i>trace-metal</i>	(infra)	1 mL
Solução vitaminas	(infra)	0.5 mL
Solução trace-metal		
Componente	Solução Stock	Quantidade
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	...	3.15 g
Na <sub>2</sub> EDTA · 2H <sub>2</sub> O	...	4.36 g
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	7.8 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	6.3 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	22.0 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL
CoCl <sub>4</sub> · 6H <sub>2</sub> O	10.0 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	180.0 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL
Solução vitaminas		
Componente	Solução Stock	Quantidade
Tiamina HCL (vit. B1)	...	200 mg
Biotina (vit. H)	1.0 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL
Cianocobalamina (vit. B12)	1.0 g/L dH <sub>2</sub> O	1 mL

### Condições do cultivo da cultura-mãe

O cultivo da cultura-mãe de microalgas deu-se ao longo de 30 dias, tendo-se realizado, neste período, operações de repicagem<sup>4</sup> com frequência quinzenal, em condições de 30-33‰ de salinidade, fotoperíodo de luz:escuro de 16h:8h com uma intensidade luminosa de 1000 lux e arejamento constante. Durante a fase experimental, as salas de cultivo foram mantidas com iluminação artificial contínua, fornecida por 3 lâmpadas LED de cor branca de 4 W de potência elétrica (LED T5 4W 0.3 m AIGOSTAR).

### Esterilização

Realizou-se a esterilização da vidraria e sistema de tubagens usado para o arejamento recorrendo à desinfecção química por cloração de água através de um banho de hipoclorito de sódio, de concentração 1 ml L<sup>-1</sup>, durante um período de 22 h. Seguiu-se a neutralização da solução recorrendo a uma solução de tiosulfato de sódio, de concentração mássica 150 g L<sup>-1</sup>. Verificou-se a neutralidade da solução recorrendo a um sensor de pH (PH-BTA, Vernier). Seguidamente, rejeitou-se o conteúdo dos balões, enxaguou-se o seu interior com água destilada e rolhou-se e selou-se cada um dos 9 balões de crescimento, usando algodão e gaze estéreis como isolamento, às quais se sobrepôs um fragmento de folha de alumínio posteriormente fixada com um material colante adesivo. Este procedimento repetiu-se para a vidraria sempre que necessária a transferência de material biológico entre balões.

A inoculação da biomassa algal para os balões e as repicagens foram feitas à chama do bico de Bunsen, no interior de uma *hotte* previamente desinfetada recorrendo a uma solução de base alcoólica, tendo o cuidado de esterilizar todo o material que viesse a contactar com o interior dos balões de crescimento, incluindo varetas de vidro, espátulas, funis, provetas graduadas, entre outro.

<sup>4</sup> Em condições de esterilidade, realizou-se a transferência de metade do volume total da cultura algal para balões recém-esterilizados com meio de cultura novo.

## Cultivo

Apesar de, na maioria das experiências laboratoriais, o ferro ser usado na sua forma quelada, enquanto EDTA férrico, citrato férrico ou ascorbato ferroso (Anderson *et. al.*, 2005; Botebol *et. al.*, 2013) e, mais recentemente, nano-partículas de ferro se terem revelado excelentes fontes deste metal (Kadar *et. al.*, 2012), foi eleita, como espécie química fornecedora de ferro, o cloreto de ferro, por ser o mais comumente utilizado nas experiências de cultura em macro-escala (Borowitzka, Beardall & Raven, 2016).

Para o cultivo da espécie modelo, *T. chuii*, foram usados 9 balões de fundo raso de 1 L de capacidade (Figura 3) agrupados em três grupos de estudo distintos (3 réplicas experimentais por grupo), com quantidades crescentes de ferro dissolvido: controlo, com a concentração *standard* de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $c_{\text{Fe}} = 3,45 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ;  $c_{\text{mFe}} = 9,33 \times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ ) presente no meio F/2; Grupo II, de concentração mássica em  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  no valor de  $1,87 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$  (correspondente ao dobro da quantidade de ferro presente no meio F/2); Grupo III, de concentração mássica em  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  no valor de  $3,73 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$  (correspondente ao quádruplo da quantidade de ferro presente no meio F/2). Para cada um dos balões de crescimento, foi usada uma concentração inicial de 25% (V/V) de cultura de *T. chuii*, i.e. 187,5 ml acrescentando, 560,5 ml em água destilada e 2,0 ml de meio de cultura F/2 Guillard, perfazendo o volume final de 750 mL por balão de cultura. A salinidade usada foi de 30 a 33‰, já que a estirpe algal usada é marinha (ver Figura 1). As culturas foram arejadas através de um sistema de arejamento que incluiu 7 m de tubagens de silicone (12/05 mm) conectadas a 9 pipetas graduadas de 1 ml de capacidade associadas a cada um dos balões de crescimento e a um compressor de ar (Hagen Marina 200 Air Pump,  $2 \times 1800 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ ).

Após um período de 15 dias foi realizada uma repicagem, usando um fator de diluição de 2. À chama de um Bico de Bunsen, foram ainda coletadas amostras de 2 ml de suspensão de cada um dos balões, para avaliação do grau de contaminação das culturas, determinada por observação ao Microscópio Ótico Composto a uma ampliação de 400 x.



FIGURA 3. Ensaio experimental de cultivo de *Tetraselmis chuii* (a) Grupo I: controlo, Grupo II: Fex2; Grupo III: Fex4 (b) detalhes dos balões de cultivo, mostrando o sistema de arejamento no exterior e (c) no interior do balão (n = 3).

### Cálculo do peso seco

Ao 28.º dia da experiência, uma amostra homogeneizada de 100 ml de cada um dos balões de crescimento foi filtrada por vácuo, usando um dispositivo composto por um kitasato, um funil de Büchner e uma mangueira de silicone conectada a uma bomba de vácuo manual, usando filtros de fibra de vidro de 47 mm e de porosidade 0,20 µm (ver Figura 4), ao que se seguiu a determinação da biomassa por peso seco após secagem a uma temperatura de 100 °C num forno comercial, durante um período de 6 h (Figura 4).



FIGURA 4: Registo fotográfico do processo de filtração (a) e filtrados obtidos antes da secagem (b).

Para o cálculo do peso seco (Dry Weight, ou DW), recorreu-se à seguinte fórmula (Rukminasari, Omar & Lukman, 2019):

$$DW = (W_1 - W_0)/V \cdot 1000$$

em que  $DW$  corresponde ao peso seco ( $\text{g L}^{-1}$ );  $W_1$  ao peso do filtro + papel de alumínio + biomassa algal final;  $W_0$  ao peso do filtro + papel de alumínio; e  $V$  ao volume da amostra (100 ml). Ultimamente, para a conversão da medida de peso seco na unidade indicada ( $\text{g L}^{-1}$ ), aplicou-se um fator de 1000 (observe-se que o valor  $V$  é expresso em ml).

### Aferição da quantidade de carbono

Segundo Richmond (2004), o conteúdo em carbono varia significativamente consoante as espécies de microalgas estudadas e as condições de cultivo, podendo variar entre 17,5 e 65% do peso seco. No entanto, a maioria das espécies contém cerca de 50% de carbono em peso seco. Assim, considerar-se-á o seguinte fator de conversão biomassa/conteúdo em C:

$$cC = DW \cdot 0,50$$

em que  $cC$  corresponde ao conteúdo em carbono ( $\text{g L}^{-1}$ ); e  $DW$  ao peso seco ( $\text{g L}^{-1}$ ).

## Análise estatística

Os ensaios foram efetuados em triplicado e os resultados foram expressos em média e desvio padrão. O tratamento estatístico dos dados obtidos fez-se recorrendo a uma análise de variância (ANOVA)<sup>5</sup>, considerando o nível de significância a 5% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

Durante um período de ~ 72 h após inoculação de material biológico, as culturas entraram na fase *Lag*, que corresponde à adaptação à baixa concentração algal e elevada concentração de nutrientes consistentes com algum *stress* fisiológico, que se manifesta através da opacidade e intensidade de cor bastante reduzidas, quase transparência do conteúdo dos balões de crescimento próximo da superfície, deposição de alguma matéria algal sobre o fundo e áreas laterais dos balões.

Após estes dias de adaptação, as culturas entraram na fase de crescimento exponencial, registando-se um aumento da cor da cultura ao longo dos dias.

No período que mediou entre o 1.º e o 15.º dias de experiência, verificou-se um crescimento uniforme das culturas, atingindo todas elas a fase estacionária entre os 12.º e 14.º dias, evidenciada pela permanência de uma cor escura e opaca das culturas de algas. A observação ao microscópio permitiu, ainda, verificar a ausência de contaminações significativas.

No período que se seguiu à repicagem, entre os 16.º e 22.º dias, registou-se um crescimento diferencial das culturas, ao longo de três linhas distintas, correspondentes aos três grupos experimentais em estudo. Macroscopicamente, aqueles distinguiram-se pela quantidade de matéria biológica precipitada, intensidade de cor e opacidade das soluções, de tal forma que para disponibilidades superiores de Fe se observaram maior opacidade e intensidade de cor e, em simultâneo, menor sedimentação de matéria orgânica (Figura 5).

Ao 22.º dia de experiência, os balões do Grupo experimental III registam uma maior intensidade de cor das culturas. De registar que, entre

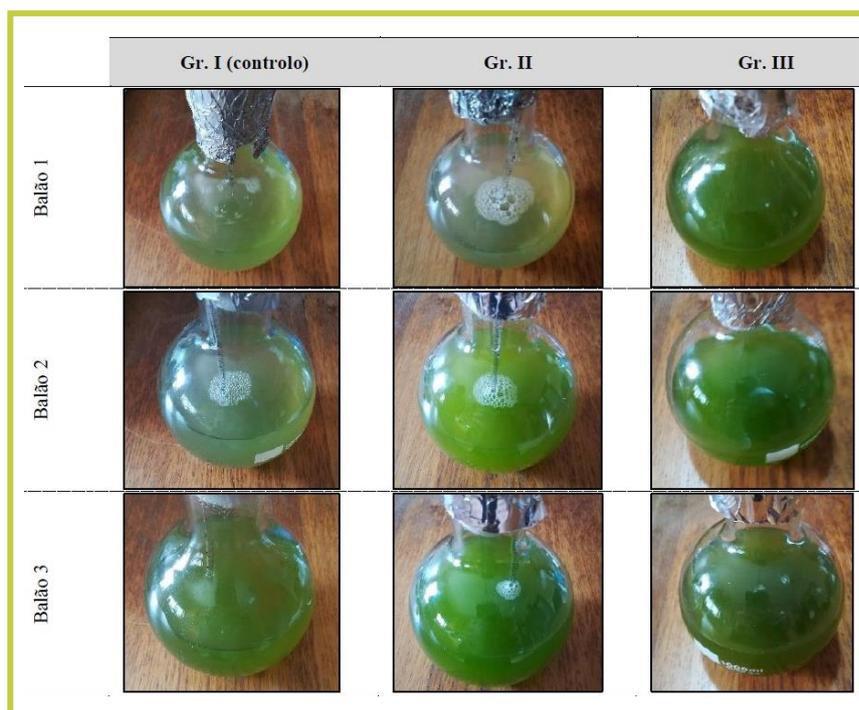


FIGURA 5. Registro fotográfico dos balões de crescimento antes do cálculo do peso seco (28.º dia de experiência).

<sup>5</sup> Coleção de análises estatísticas que estima quão significativa é a influência exercida sobre as variáveis dependentes atribuível às variáveis independentes a elas afetas.

o 23.º dia e o 28º dia da experiência, a observação microscópica de amostras das culturas permitiu identificar alguma contaminação (amebas, bactérias e outros microrganismos não identificados) os quais poderão ter comprometido de alguma forma o crescimento da população algal (por competição por recursos e ingestão de microalgas<sup>6</sup>).

Os resultados obtidos evidenciam um maior crescimento algal para culturas sujeitas a uma maior disponibilidade de Fe, correspondente a uma maior concentração de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  em solução (Figura 6). A variação registada é considerável e a análise estatística permitiu concluir que houve uma diferença estatisticamente significativa no crescimento entre o Grupo I (controlo) e o Grupo experimental III (ANOVA,  $p$ -value = 0,024003).

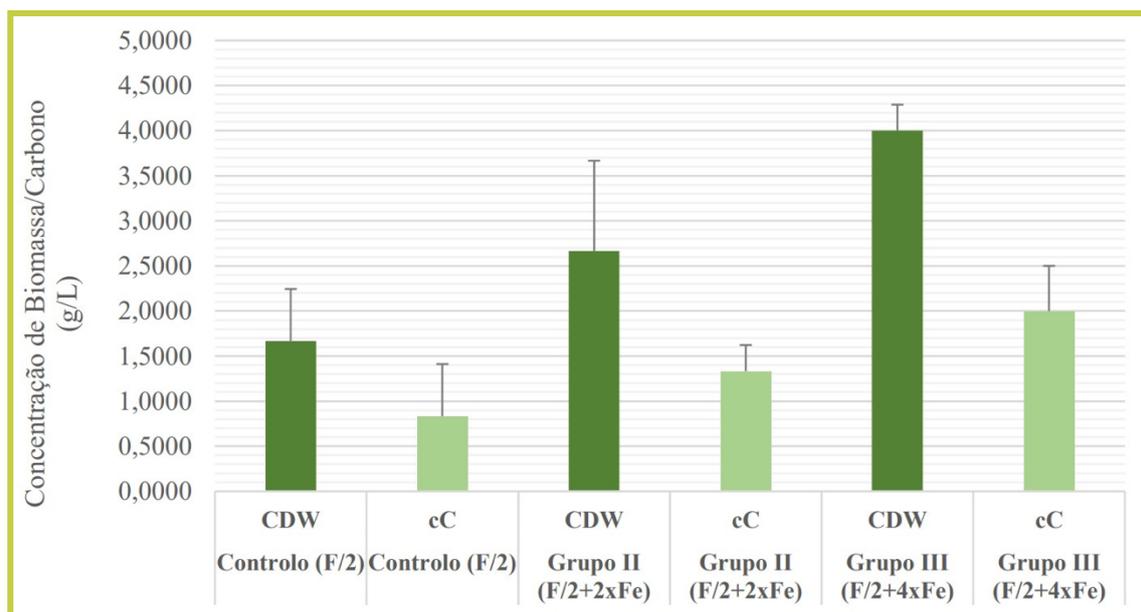


FIGURA 6: Conteúdo de biomassa (peso seco - DW) e de carbono (cC) de *Tetraselmis chuii* após 28 dias de crescimento. Valores relativos à média e desvio padrão em cada grupo experimental.

O controlo registou um valor final de biomassa  $1,7 \pm 0,58 \text{ g L}^{-1}$  (peso seco), enquanto no tratamento no qual se duplicou a quantidade de Fe registou uma quantidade de biomassa de  $2,6 \pm 0,58 \text{ g L}^{-1}$  (peso seco) (incremento de 52,94% em relação ao controlo) e o tratamento no qual se quadruplicou a quantidade de Fe registou uma quantidade de biomassa de  $4,0 \pm 1,0 \text{ g L}^{-1}$  (peso seco) (incremento de 135,29% em relação ao controlo). Quanto ao conteúdo em carbono, para o primeiro tratamento (controlo) obteve-se um valor de  $0,85 \pm 0,29 \text{ g}$  de C por litro de cultivo algal; para o segundo (Grupo II),  $1,3 \pm 0,29 \text{ g}$  de C por litro de cultivo algal; e, para o terceiro (Grupo III),  $2,0 \pm 0,5 \text{ g}$  de C por litro de cultivo algal.

A aplicação da análise estatística entre os grupos de estudo demonstrou, relativamente ao peso seco, que os resultados obtidos são estatisticamente significativos. Tal corrobora que os tratamentos aplicados demonstraram um efeito significativo sobre o crescimento de *T. chuii*, verificando que uma concentração crescente de Fe (em até 4 vezes aquela usada no controlo) possui efeitos favoráveis à produção de biomassa nesta espécie unicelular.

<sup>6</sup> O crescimento de organismos indesejáveis favoreceu a competição interespecífica por nutrientes, diminuindo a sua disponibilidade para o organismo de interesse e afetando a dinâmica da população estudada. Acresce que as amebas se tratam de protozoários predatórios que podem incluir na sua dieta microalgas como as estudadas.

## DISCUSSÃO

O efeito do aumento da disponibilidade de Fe na sequestração de carbono pela microalga marinha *Tetraselmis chuii* foi analisado através da análise do conteúdo de carbono em amostras triplicadas de tratamentos com concentrações crescentes de Fe, após um período de incubação de 28 dias. Esta extrapolação é válida pelo facto de que as microalgas possuem mecanismos ativos de captura e armazenamento de bicarbonatos a nível celular, por sua vez resultantes da dissolução de dióxido de carbono atmosférico em água. Os bicarbonatos são subseqüentemente desidratados, ora espontaneamente ora por anidrase carbónica, resultando em CO<sub>2</sub> que é capturado através da atividade do ciclo de Calvin, ultimamente resultando na formação de biomassa algal (Sayre, 2013). O ferro participará neste processo ao ser incorporado em vários catalisadores proteicos, alguns dos quais participantes da cadeia transportadora de eletrões da fotossíntese. Segundo Herzog & Golomb (2004), por cada grama de biomassa algal produzida, são capturados entre 1,6 a 2,0 g de CO<sub>2</sub>. Assim, o cálculo do peso seco e do conteúdo de carbono em amostras de culturas algais revela-se uma medida indireta da capacidade de sequestração de CO<sub>2</sub> atmosférico.

Os resultados obtidos permitem relacionar o aumento da disponibilidade de ferro a um aumento da capacidade de sequestração de carbono por culturas algais, tal como corroborado pelo aumento da biomassa que acompanhou o aumento da disponibilidade de Fe. Este resultado permite concluir que o crescimento populacional das culturas foi potenciado durante o período de incubação para as amostras com maior disponibilidade daquele metal, o que resultou numa maior concentração algal e, por conseguinte, numa maior taxa de sequestração de carbono em solução.

Efetivamente, enzimas como a ferredoxina exibem ferro na sua constituição e estão diretamente envolvidas na fotofosforilação, portanto na fotossíntese, responsável pela produção de compostos orgânicos pela alga. Ora, uma maior concentração de ferro permitirá uma síntese mais intensa daquelas enzimas, aumentando a sua concentração e, portanto, a eficácia da fotossíntese, conduzindo a uma maior produção de compostos de carbono e maior sequestração de carbono inorgânico. O facto do tratamento contendo o quádruplo de Fe ter evidenciado uma concentração elevada de biomassa, muito superior ao tratamento no qual se duplicou a quantidade de Fe, permite, efetivamente, comprovar que este micronutriente é fundamental para potenciar a fotossíntese e, portanto, a sequestração de C inorgânico.

No entanto, a exatidão dos resultados obtidos e, por conseguinte, das conclusões passíveis de serem retiradas a partir dos mesmos poderá ter sido afetada por fatores vários.

A metodologia inicialmente prevista para a obtenção de uma medida indireta da sequestração de dióxido de carbono seria o recurso a um fator de conversão presente em algoritmos descritivos de uma correlação matemática entre o conteúdo em carbono orgânico e o biovolume, o qual seria calculado a partir de dimensões lineares medidas microscopicamente (tal como referido por Steinman *et. al.*, 1991; Snoeijs, 1994; Sommer, 1994, 1995; Hillebrand & Sommer, 1997), convertidas, por sua vez, em unidades de volume a partir de figuras geométricas simples - no caso de *Tetraselmis chuii*, uma esferoide prolata. Esta metodologia, comumente usada para realizar uma estimativa da quantidade de biomassa em microalgas, permitiria estimar mais rigorosamente a biomassa de fitoplâncton, tal como corroborado pelos trabalhos de Booth *et. al.* (1988) ou Sieracki *et. al.* (1992). No entanto, as restrições que advieram da pandemia de

Covid-19 impossibilitaram o recurso a esta metodologia, tendo sido em alternativa calculado o peso seco, método menos rigoroso.

Por outro lado, a fonte de ferro utilizada poderá não ter sido a mais adequada. Tal deve-se ao facto de o EDTA férrico ser referido como a melhor espécie química fornecedora de iões ferro (Anderson & Morel, 1982; Shaked *et. al.*, 2005; Shaked & Lis, 2012), isto porque a água marinha possui elevadas quantidades de iões  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , os quais competem com as espécies de Fe pela maioria dos seus ligantes putativos, daí surgindo a problemática da insolubilidade do ferro se agudizar em meio anaeróbico em água do mar (Botebol *et. al.*, 2013). Assim, uma vez que o propósito deste trabalho estava intimamente relacionado com a hipótese de utilização em larga escala de ferro para o cancelamento massivo de dióxido de carbono atmosférico, e como tal estaria dependente de um fornecimento alargado de ferro por técnicas de geoengenharia sobre extensas áreas de oceano aberto, as condições estudadas e os reagentes usados deveriam ser os mais próximos possíveis dos encontrados e usados nos estudos em macro-escala.

Finalmente, o comportamento das culturas após inoculação pode ser explicado pela introdução abrupta de quantidades elevadas de ferro em solução. Apesar de este micronutriente ser essencial para as algas, é também altamente reativo e potencialmente tóxico devido à ocorrência da reação de Fenton e à consequente produção de radicais hidroxilo (Halliwell & Gutteridge, 1992), o que poderá resultar em taxas de crescimento reduzidas nos primeiros dias, à sedimentação da cultura algal e, mesmo, a alguma morte celular. Mais ainda, indivíduos de *T. chuii* possuem a capacidade de, passadas duas semanas em cultura ou em condições desfavoráveis, formarem quistos, células de resistência que se formam em períodos de *stress*, rodeados por uma parede celular espessa e estratificada, formando anéis concêntricos com inúmeros grânulos de pequenas dimensões: papilas apicais (Butcher, 1959). Tal explica a formação de mucilagens e precipitados celulares nos dias que subseguiram às operações de inoculação de microalgas, pois tal foi sempre acompanhado de um fornecimento adicional em nutrientes, incluindo  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . A possibilidade dos cultivos poderem rejuvenescer e adquirir mobilidade novamente em condições favoráveis (Arora *et. al.*, 2013) justificam as variações registadas nas populações de algas nos referidos dias subsequentes – inicialmente decaindo e readquirindo, após esse período, as suas características visualmente observáveis.



## APLICAÇÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Os trabalhos desenvolvidos corroboram a hipótese de que o ferro poderá potenciar a sequestração de carbono a partir de experiências de “fertilização” artificial. Apesar do espectro do bioensaio realizado não possibilitar a extrapolação de conclusões que permitam entender se o fornecimento artificial deste metal sobre extensas áreas do oceano aberto seria viável, sustentável ou seguro, traz, com certeza, resultados favoráveis a esta hipótese, reafirmando resultados obtidos por experiências semelhantes já realizadas no passado e confirmando a atratividade que a questão tratada encerra.

Doravante, a continuidade da realização de estudos de macro-escala e de bioensaios, que procurem compreender, nomeadamente, a influência da prática de “fertilização” em Fe na frequência da ocorrência de florescências algais com potencial tóxico (*harmful algal blooms*, HBAs), será fulcral à magnificação da

literatura subordinada à temática, o que poderá, ultimamente, culminar com o desenvolvimento de inovação técnica que permita uma sequestração eficiente de carbono atmosférico baseada nos mecanismos associados à “fertilização” em ferro.

**agradecimentos** • Este trabalho contou com o apoio da Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar do Instituto Politécnico de Leiria (ESTM-IPLeia) e da empresa Normax – Fábrica de Vidros Científicos, Lda. Agradecimento especial ao nosso Professor Rui José Bernardo Lucas Pinto Fernandes, Grupo Disciplinar 520, por todo o apoio dado na concretização do projeto; à Dr.<sup>a</sup> Cátia Figueiredo, pelos seus conselhos e fornecimento das culturas algais; e à Professora Dr.<sup>a</sup> Teresa Mouga, pela orientação deste projeto.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Ghelani HM, Alkindi AYA, Al-Akhzami YK (2005). Harmful Algal Blooms: Physiology, Behaviour, Population Dynamics and Global Impacts - A Review. *Journal for Science* 10: 1-30.
- Anderson RA, Berges JA, Harrison PJ, Watanabe MM (2005). Recipes for freshwater and seawater media. In: RA Anderson (ed.), *Algal culturing techniques*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, pp. 429-538.
- Aumont O, Bopp L (2006). Globalizing results from ocean in situ iron fertilization studies. *Global Biogeochem. Cycles* 20: 1-15.
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2014). *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. 2nd edition. CRC press. Boca Raton.
- Borowitzka MA, Beardall J, Raven JA (2016). Algal physiology and Large-Scale Outdoor Cultures of Microalgae. In: Borowitzka MA, Beardall J, Raven JA (eds.), *The physiology of microalgae*. Springer International Publishing, Switzerland, p. 625.
- Botbol H et al. (2013) Different iron sources to study the physiology and biochemistry of iron metabolism in marine micro-algae. *Biology of Metals* 27(1).
- Boyd PW et al. (2004). The decline and fate of an iron-induced subarctic phytoplankton bloom. *Nature* 428: 549-553.
- Buesseler KO, Boyd PW (2003). Will ocean fertilization work? *Science* 300: 67-68.
- Coale KH et al. (1996). A massive phytoplankton bloom induced by ecosystem-scale iron fertilization experiment in the equatorial Pacific Ocean. *Nature* 383: 495-501.
- Coale KH. et al. (2004). Southern Ocean Iron Enrichment Experiment: Carbon cycling in high- and low-Si water. *Science* 304: 408-414.
- Crisholm SW et al. (2001). Dis-crediting ocean fertilization. *Science* 294: 309-310.
- Geider RJ, La Roche J (1994). The role of iron in phytoplankton photosynthesis, and the potential for iron-limitation of primary productivity in the sea. *Photosynthesis Res.* 39: 275-301.
- Gervais F et al. (2002). Changes in primary productivity and chlorophyll a in response to iron fertilization in the Southern Polar Frontal Zone. *Limnol. Oceanogr.* 47:1324-1335.
- Gnanadesikan A et al. (2003). Effects of patchy ocean fertilization on atmospheric carbon dioxide and biological production. *Global Biogeochem. Cycles* 17(2):1050.
- Gribbin J (1998). Any old iron? *Nature* 331:570.
- Guillard RRL (1975). *Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates*. In: Smith WL, Chanley MH (eds.), *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press, New York, pp. 26-60.
- Guillard RRL, Ryther JH (1962). Studies of marine planktonic diatoms - *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* 8:229-239.
- Herzog H, Golomb D (2004). Carbon capture and storage from fossil fuel use. *Encyclopedia of Energy* 1:1–11.
- Jin X, Gruber N (2003). Offsetting the radiative benefit of ocean iron fertilization by enhancing N<sub>2</sub>O emissions. *Geophys. Res. Lett.* 30(24): 224.

- Kadar E *et. al.* (2012). The effect of engineered iron nanoparticles on growth and metabolic status of marine microalgae cultures. *Science of The Environment* 439:8-17.
- Martin JH *et. al.* (1994). Testing the iron hypothesis in ecosystems of the equatorial Pacific Ocean. *Nature* 371:123-129.
- Martin JH *et. al.* (1990). Iron deficiency limits phytoplankton growth in Antarctic water. *Global Biogeochem. Cycles* 4:5-12.
- Richmond A (2004). Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 97-115.
- Rukminasari, N. *et. al.* (2019). Effects of increasing temperature and nitrate concentration on cellabundance, growth rate, biomass and free fatty acid of *Tetraselmis* sp. *IOP Conf., Ser.: Earth Environ. Sci.* 370 012059.
- Sarmiento JL, Orr JC (1991). Three-dimensional simulations of the impact of Southern Ocean nutrient depletion on atmospheric CO<sub>2</sub> and ocean chemistry. *Limnol. Oceanogr.* 36:1928-1950.
- Sayre R (2013). The Potential for Carbon Capture. *BioScience* 60(9):722-727.
- Tsuda A *et. al.* (2003). A mesoscale iron enrichment in the western subarctic Pacific induces a large centric diatom bloom. *Science* 300:958-961.
- UTEX, (2021). Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin, acedido a 10 março 2012, em <https://utex.org/products/utex-lb-0232?variant=30992157179994>.