A RESISTÊNCIA DA *Euglena gracilis* NA PRESENÇA DE UM HORMÔNIO NATURAL

MATHEUS BARBOSA HERBST DE OLIVEIRA[1], KEVIN SOUZA DO ESPÍRITO SANTO[1], MARCELO CHUEI MATSUDO[1]

[1]Universidade Federal do ABC, Santo André, Brasil (matheus.herbst@ufabc.edu.br)

Resumo: Avaliou-se o efeito inibitório do 17β-estradiol (E2) no crescimento da *Euglena gracilis* (UTEX 753) em meio TAP, testando-se concentrações de 0,5 a 50 mg.L^{-1}, ao longo de 11 dias. Resultados mostraram ausência de inibição, com aumento de biomassa e velocidade de crescimento ainda nas duas maiores concentrações de E2 (25 e 50 mg.L^{-1}) comparados ao controle. Conclui-se que a espécie é altamente resistente ao E2, com potencial para biorremediação em associação ao tratamento terciário de efluente.

Palavras-chave: Euglenophyceae; 17β-estradiol; Contaminante emergente; Desregulador endócrino; Ecotoxicologia.

INTRODUÇÃO

A dispersão de contaminantes emergentes, como o hormônio 17β-estradiol (E2), traz riscos ecotoxicológicos devido ao seu potencial de desregulação endócrina. A detecção constante deste estrogênio em efluentes tratados, como em Ternes et al. (1999) que detectou concentrações de 0,021 a 0,04 µg.L^{-1}, justifica a necessidade de avaliar a sensibilidade de microrganismos fotossintetizantes frente à sua persistência ambiental (Montagner et al., 2017). A microalga *Euglena gracilis* destaca-se por sua versatilidade metabólica (Pinto et al., 2014; Haig et al., 2016), porém, existem lacunas literárias sobre a resposta direta desta espécie ao estresse estrogênico, sendo frequentemente utilizada apenas como bioindicador de toxicidade em estudos comportamentais (Lihanová et al, 2023).

Essa carência de dados fundamenta a investigação de sua resistência fisiológica para fundamentar futuras aplicações em sistemas de tratamento terciário de efluentes (Rempel et al., 2021). Com isso, o objetivo deste estudo é realizar uma avaliação ecotoxicológica do estrogênio E2 sobre o crescimento da *E. gracilis*.

Formula-se a hipótese de que a microalga apresentará elevada tolerância ao contaminante, mantendo sua cinética de crescimento estável mesmo em altas dosagens, devido à sua robustez metabólica.

MATERIAL E MÉTODOS

A *Euglena gracilis* (cepa UTEX 753) foi cultivada em Meio TAP com suas culturas mantidas em frascos de Erlenmeyer sob iluminação artificial contínua de 60 µmol fótons·m^{-2}·s^{-1}, temperatura controlada de 25ºC, pH inicial igual a 7,0 e agitação constante de 130 r.p.m. (Bresaola et al., 2019). O monitoramento do crescimento foi realizado via densidade óptica (DO_{550nm}), correlacionada à biomassa seca (mg·L^{-1}) por meio de uma curva de calibração linear seguindo a metodologia de Nielsen e Hansen (2019).

Os ensaios foram conduzidos em sistema de batelada simples por um período de 11 dias utilizando frascos de Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de meio TAP, com delineamento experimental expondo a *E. gracilis* a concentrações crescentes de 17β-estradiol (E2) a partir de soluções concentradas desse hormônio em acetona (Liu et al., 2018). As concentrações testadas foram 0,5; 1,0; 5,0; 10; 25; e 50 mg·L^{-1}. Foram utilizados também controles sem suplementação (Controle TAP) e controles de solvente (Controle TAP + Acetona), todos em triplicata.

A velocidade específica de crescimento (µ) foi calculada de acordo com a equação (1):

$$\mu = \frac{lnX2 - lnX1}{t2 - t1} \quad (1)$$

Onde, X1 e X2 representam as concentrações de biomassa nos tempos t1 e t2, respectivamente (Šepič et al., 2003).

A normalidade e a homogeneidade dos dados foram analisadas, respectivamente, pelos testes de Ryan-Joiner (Similar ao Shapiro Wilk) e Teste de Igualdade de Variância (ANOVA) com intervalos de 95% de confiança Bonferroni para os Desvios Padrão e com Método de Bartlett para determinar o valor p. Considerando-se normalidade e homogeneidade dos dados, estes foram submetidos a análise de variância (ANOVA One-way), seguida do teste de Tukey, adotando-se o nível de confiança de 95%.

E o crescimento da *E. gracilis* foi monitorado por meio de densidade óptica a 550nm, sendo estabelecida uma curva de calibração linear para a conversão em biomassa seca (mg.L^{-1}), representada pela equação (2) conforme ilustrado na Figura 1.

$$y = 421{,}18x - 8{,}5957 \quad (2)$$

Onde y representa concentração de biomassa (mg.L^{-1}) e x representa a absorbância (550nm)

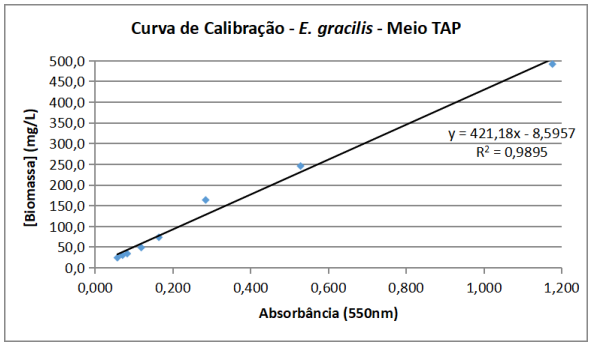


Figura 1. Gráfico da curva padrão de calibração para *Euglena gracilis* no meio TAP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O No teste de efeito inibitório conduzido em meio TAP durante 11 dias sob concentrações de 0,5 a 50,0 mg.L^{-1} de E2, o controle (meio TAP) registrou concentração média de biomassa (X_{11}) de 414,8±58,2 mg.L^{-1} e velocidade específica de crescimento (μ) de 0,158±0,0131 dia^{-1}. No controle suplementado com o solvente acetona, os valores foram de 529,4±56,2 mg.L^{-1} (X_{11}) e 0,181±0,0098 dia^{-1} (μ), conforme detalhado na Tabela 1.

Tabela 1. Média da Concentração de Biomassa no (X_{11}) e Velocidade Específica de Crescimento (μ) da *E. gracilis* no Teste de Efeito Inibitório com diferentes concentrações de E2 em comparação com controles (Meio TAP e Meio TAP + Acetona) - Todos em mg.L^{-1}.

Concentrações de E2 (mg.L^{-1})	**X_{11} (desv. Pad) (mg.L^{-1})**	**μ (desv. Pad) (dia^{-1})**
Controle (TAP)	414,8 ± 58,2^{BC}	0,158 ± 0,0131^{B}
Controle (TAP) + (Acetona)	529,4 ± 56,2^{ABC}	0,181 ± 0,0098^{AB}
0,5	399,3 ± 30,0^{C}	0,155 ± 0,0067^{B}
1,0	473,7 ± 49,1^{ABC}	0,171 ± 0,0094^{AB}
5,0	487,8 ± 72,8^{ABC}	0,173 ± 0,0131^{AB}
10	564,1 ± 60,1^{AB}	0,187 ± 0,0100^{A}
25	574,4 ± 30,3^{A}	0,188 ± 0,0047^{A}
50	582,3 ± 57,7^{A}	0,190 ± 0,0092^{A}

*Médias com letras iguais não diferem entre si estatisticamente, de acordo com teste de Tukey (95% de Confiança).

Nas unidades experimentais suplementadas com o hormônio, a concentração de biomassa final variou entre 564,1±60,1 mg.L^{-1} (10 mg.L^{-1}) e 582,3±57,7 mg.L^{-1} (50 mg.L^{-1}), enquanto a velocidade específica de crescimento situou-se na faixa de 0,187±0,0100 dia^{-1} a 0,190±0,0092 dia^{-1}. A aplicação do teste ANOVA One-way resultou em um valor p=0,003 para a média da concentração de biomassa, com o método de Tukey indicando diferença entre as duas maiores concentrações de E2 (25 e 50 mg.L^{-1}) e o controle TAP. Para μ, o valor de p foi de 0,002, indicando diferença entre as três maiores concentrações de E2 (10, 25 e 50 mg.L^{-1}) e o controle TAP.

As curvas de crescimento representadas no gráfico da Figura 2 demonstram a permanência da fase logarítmica de crescimento em todos os tratamentos. O aspecto visual das culturas no 11º dia confirma essa permanência de crescimento através da sua coloração esverdeada escura em todas as concentrações de E2 testadas, incluindo a dosagem máxima de 50 mg.L^{-1}, conforme apresentado na Figura 3.

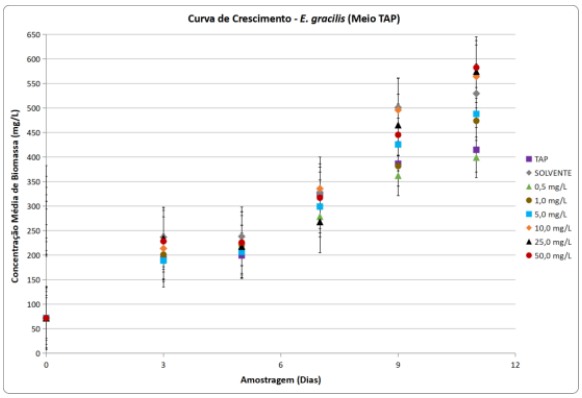


Figura 2. Gráfico da taxa máxima de crescimento da *E. gracilis* em meio TAP no Teste de Efeito Inibitório do E2 sobre esta microalga.

O aumento da absorbância no terceiro dia do ensaio é justificado pela presença de bactérias em cultivo não axênico. Sedo que, a interação simbiótica entre a microalga e a microbiota bacteriana não impede o desenvolvimento celular, conforme discutido em Toyama et al. (2018) e Toyama et al. (2019). Esse fenômeno é esperado uma vez que cultura de *Euglena gracilis* não é axênica.

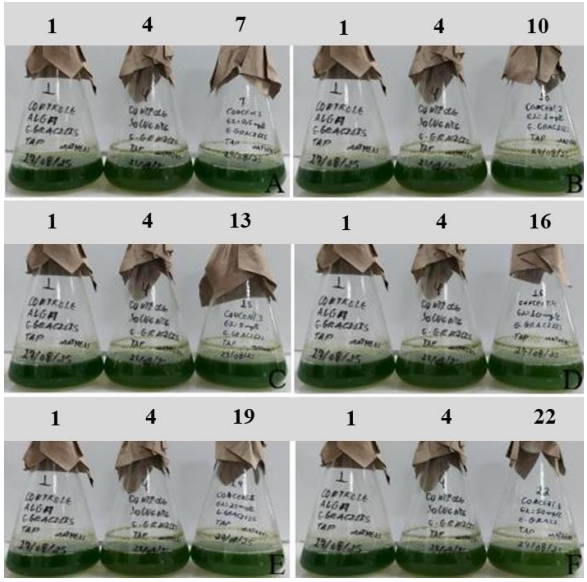


Figura 3. A até F= Aspecto visual no 11º dia do Teste de Efeito Inibitório do E2 sobre a *E. gracilis* em meio TAP com diferentes concentrações do contaminante. Frasco[1] = Controle (TAP); Frasco[4] = Controle (TAP) + Acetona. Frasco[7] = 0,5 mg·L^{-1}; Frasco[10] = 1 mg·L^{-1}; Frasco[13] = 5 mg·L^{-1}; Frasco [16] = 10 mg·L^{-1}; Frasco[19] = 25 mg·L^{-1}; Frasco[22] = 50 mg·L^{-1}.

A Comparando estes resultados com dados da literatura, é possível observar uma divergência em relação ao comportamento de microalgas verdes do grupo Chlorophyta, já que em Huang et al. (2019), por exemplo, foi registrado que em concentrações de E2 entre 1,0 e 2,0 mg.L^{-1} já ocorre a inibição do crescimento da Chlorella sp.

Possíveis efeitos de E2 que podem inibir crescimento de microalgas estão relacionados ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) em suas células, como por exemplo o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete ($^1O_2$) (Czarny et al., 2019).

E segundo Haig et al. (2016), houve inibição do crescimento da *E. gracilis* em concentrações de 101 ng.L^{-1} de estrogênio, onde 12 ng.L^{-1} dessa concentração eram de E2. Em consequência disso, era esperado algum efeito inibitório a partir das concentrações intermediárias do teste de efeito inibitório realizado no presente estudo.

Pinto et al. (2014) por sua vez, em concentrações bem maiores (5,0 g.L^{-1}) de E2, verificou que este hormônio afetou a locomoção celular da microalga até a superfície do meio em ~45–50%. em apenas 24h e ~60–65% em 7 dias.

Diferente dos efeitos inibitórios por espécies reativas de oxigênio descritos por Czarny et al. (2019) e apesar dos resultados apresentados por Haig et al. (2016), o gráfico da Figura 2 demonstra a manutenção da biomassa por 11 dias. Estes dados confirmam a tolerância fisiológica e a resistência da espécie à exposição prolongada do hormônio.

Uma avaliação ecotoxicológica que este trabalho permite fazer quanto ao E2 sobre a *E. gracilis* é que este microrganismo aparentemente possui elevada resistência a este hormônio, cumprindo o objetivo de verificar sua sensibilidade para dosagens crescentes.

E em um contexto amplo do tema, esses resultados conferem à *E. gracilis* um papel importante como organismo tolerante para aplicações em sistemas de biorremediação, uma vez que sua estabilidade fisiológica é preservada em concentrações muito superiores às ambientalmente detectadas em efluentes.

Com isso, a utilização da *E. gracilis* em sistemas de tratamento terciário de efluentes apresenta elevado potencial como estratégia complementar de biorremediação, atuando simultaneamente na remoção de contaminantes emergentes e na etapa de desinfecção biológica do efluente (Haig et al., 2016). Adicionalmente, seu cultivo pode promover a assimilação de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, contribuindo para a mitigação de processos de eutrofização e para a geração de biomassa de valor agregado, em consonância com os princípios da economia circular e sustentabilidade (Brandão et al., 2023).

CONCLUSÃO

Neste trabalho, avaliou-se a ação inibitória do 17β-estradiol (E2) sobre a *Euglena gracilis*, confirmando que o organismo possui elevada resistência fisiológica quanto ao contaminante. Confirmou-se a ausência de inibição mesmo na concentração de 50 mg.L^{-1}, sendo esta uma concentração muito superior aos detectados em efluentes reais, com manutenção da fase logarítmica de crescimento, mesmo nas maiores concentrações de E2 (25 e 50 mg.L^{-1}), o que abre uma margem otimista para sua aplicação em trabalhos de biorremediação e uma possível futura aplicação em tratamentos terciários de efluentes.

AGRADECIMENTOS

A Agradeço à Universidade Federal do ABC (UFABC) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnociência (PPG-BTC), pelo suporte institucional e pela infraestrutura concedida para a realização desta pesquisa. E agradeço também à comissão organizadora do VII Congresso Brasileiro Interdisciplinar em Ciência e Tecnologia (VII CoBICET). Este projeto conta com financiamento da

FAPESP (processos nº 2023/04170-0 e 2024/08678-8).

REFERÊNCIAS

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências. Química Nova, v. 30, n. 3, p. 651–666, 2007.

BRESAOLA, M. D. et al. Semi-continuous process as a promising technique in Ankistrodesmus braunii cultivation in photobioreactor. Journal of Applied Phycology, v. 31, p. 2197–2205, 2019.

CZARNY, K. et al. Toxic effects of single animal hormones and their mixtures. Chemosphere, v. 220, p. 239–247, 2019.

HAIG, S. J. et al. Bioaugmentation mitigates the impact of estrogen on coliform-grazing protozoa in slow sand filters. Environmental Science & Technology, v. 50, n. 6, p. 3101–3110, 2016.

HUANG, B. et al. Ecotoxicological effects and removal of 17β-estradiol in Chlorella algae. Environmental Science and Pollution Research, v. 26, n. 2, p. 1616–1625, 2019.

LIHANOVÁ, D. et al. Versatile biotechnological applications of *Euglena gracilis*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v. 39, n. 5, p. 133, 2023.

LIU, W. et al. Removal and biodegradation of 17β-estradiol and diethylstilbestrol by the freshwater microalgae Raphidocelis subcapitata. International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 15, n. 3, p. 452, 2018.

MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R.

D. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil. Química Nova, v. 40, n. 9, p. 1094–1110, 2017.

NIELSEN, S. L.; HANSEN, B. W. Evaluation of the robustness of optical density as a tool for estimation of biomass in microalgal cultivation. Aquaculture Research, v. 50, n. 9, p. 2698–2706, 2019.

PINTO, L. H. et al. Avaliação do risco de potencial ecotoxicológico de resíduos de 17β-estradiol. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 35, n. 3, 2014.

REMPEL, A. et al. Current advances in microalgae-based bioremediation and other technologies for emerging contaminants treatment. Science of the Total Environment, v. 772, p. 144918, 2021.

ŠEPIČ, Ester; BRICELJ, Mihael; LESKOVŠEK, Hermina. Toxicity of fluoranthene and its biodegradation metabolites to aquatic organisms. Chemosphere, v. 52, n. 7, p. 1125-1133, 2003. DOI: 10.1016/S0045-6535(03)00321-7.

TERNES, T. A. et al. Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants. Science of the Total Environment, v. 225, n. 1–2, p. 81–90, 1999.

TOYAMA, T. et al. Growth promotion of three microalgae, Chlamydomonas reinhardtii, Chlorella vulgaris and *Euglena gracilis*, by in situ indigenous bacteria in wastewater effluent. Biotechnology for Biofuels, v. 11, art. 176, 2018.

TOYAMA, T. et al. Enhanced production of biomass and lipids by *Euglena gracilis* via co-culturing with a microalga growth-promoting bacterium, Emticicia sp. EG3. Biotechnology for Biofuels, v. 12, p. 205, 2019.

UTEX – THE CULTURE COLLECTION OF ALGAE. Bold 1NV Medium. Austin: University of Texas at Austin, 2011.