

Nyamien Yahaut Sebastien¹
Rafael Pereira Granja²

**CULTIVO DE SCENEDESMUS: ALIMENTO
VIVO PARA A MANUTENÇÃO DE
ORGANISMOS PLANCTÔNICOS E
IMPLEMENTAÇÃO NA DIETA HUMANA**

RESUMO: O presente trabalho teve como objetivo isolar a *Scenedesmus*, espécie de alto teor protéico e muito utilizada em varias áreas de conhecimento, para serem cultivados em laboratório e utilizar posteriormente como suplemento alimentar. As coletas foram feitas no meio natural em viveiro de piscicultura. Para o isolamento empregou-se o método em meio sólido sugerido por Guerrero III e Villegas. Como resultado desta primeira fase, conseguiu-se isolar as espécies *Scenedesmus calyptratus*, *Scenedesmus acuminatus* e *Scenedesmus obliquus*. Em seguida foi feito um cultivo piloto para determinar a espécie que melhor se desenvolve nas condições de laboratório. Para a consecução desta fase, foi realizado um teste com o meio CHU10 modificado em três repetições, determinando-se a curva de crescimento e de produção. Da curva de crescimento observou-se que o gênero *Scenedesmus* não desenvolve um estágio estacionário e que as repicagens em cultivo devem ser feitas com intervalo de 6 dias. Com relação ao cultivo, as repetições R1 e R2 obtiveram R2 de 79,26 e 77,59, respectivamente, mostrando que as microalgas tiveram um bom desempenho no meio empregado. A *Scenedesmus* é a primeira alga isolada para este banco.

PALAVRAS-CHAVE: *Scenedesmus*; Cultivo; Meio de cultura.

SUMMARY: The present paper reports an experiment whose objective was to segregate, from the environment, the *microalgae scenedesmus*, which has a high proteic content and is used in many areas of knowledge. The purpose of the segregation was to grow this species in laboratory for using it as a food supplement. The samples were collected from fish hatcheries and separated by the solid medium method suggested by Guerrero & Villegas. In the first

Data de recebimento: 22/09/05. Data de aceite para publicação: 26/03/06.

¹ Professor Adjunto do Curso de Engenharia de Pesca. Centro de Engenharias e Ciências Exatas. Universidade Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste – Campus de Toledo (PR). Endereço eletrônico: nysebastien@unioeste.br.

² Acadêmico do Curso de Engenharia de Pesca. Centro de Engenharias e Ciências Exatas. Univ. Estadual do Oeste do Paraná – Unioeste – Campus de Toledo (PR).

stage, it was possible to isolate the species *Scenedesmus calyptratus*, *Scenedesmus acuminatus* and *Scenedesmus obliquus*. In the second stage, a pilot culture was established in order to determine which species develops best in laboratory conditions. For this, a test was done using the CHU10 modified medium in three repetitions, determining the growth and the production curves. From the growth curve, it was observed that the species *Scenedesmus* does not develop a stationary stage and that the transplant must be done at six-day interval. Regarding the culture, the repetitions R1 and R2 obtained R2 of 79,26 and 77,59 %, respectively, showing that the microalgae presented good performance in the used medium. *Scenedesmus* is the first algae segregated for this bank.

KEYWORDS: *Scenedesmus*; Culture; Culture medium.

1. INTRODUÇÃO

Um dos problemas mais freqüentes na área de aqüicultura é o fornecimento de microalgas para o cultivo de moluscos em laboratório (MARTINEZ et al, 1988). Apesar do tamanho microscópico das microalgas, elas têm importância em diferentes áreas de conhecimento, tais como a biologia, a química, e em áreas específicas da bioquímica, da engenharia ambiental (PEDRAZA, 1989) e da oceanografia, da ciência da saúde, da indústria e até da construção de naves espaciais. Segundo Mourente et al. (1995) e Nanton e Castell (1998), o pequeno tamanho da boca dos organismos aquáticos exige o cultivo de organismos vivos apropriados para o estabelecimento de uma cadeia alimentar artificial. As microalgas constituem a base da cadeia alimentar em que servem de alimento para a maioria das espécies aquáticas, transformando os minerais como amônia, nitrito, nitrato e fosfato oriundo das atividades dos outros seres vivos em matéria orgânica (Buri, 1978). Atualmente a viabilidade técnica em projeto de camarão e a disponibilidade de pós-larva estão intimamente relacionadas ao estoque de alimento vivo que são as microalgas (ROCHA & MAIA, 1998).

De acordo com a exigência estrutural determinada pelo menor tamanho de boca (Buri, 1978), as exigências funcionais em aminoácido essenciais, como EPA, ácido graxos essenciais (22:6n-3) e Omega 3 (Monrente et al., 1995; Nanton & Castell, 1998), a nova tecnologia e os conhecimentos não podem produzir um alimento artificial peletizado bem estabilizado com tamanho minúsculo que não dissolva imediatamente ao contato com a água e digerível pelas larvas. Em cultivo extensivo, Meske & Pfeffer (1978) alimentaram com sucesso

carpa comum (*Cyprinus carpio*) e carpa capim (*Ctenopharyngodon*) com uma dieta composta de 80% e 50%, respectivamente, de microalga *Scenedesmus obliquus*. Becker (1994) e Fox (1996) introduziram, na dieta dos desnutridos crônicos, através de projetos integrados junto às comunidades de países como Senegal, Togo, Chade e Peru, as microalgas *Spirulina*, *Scenedesmus* e *Chlorella*. Em país desenvolvido como Japão, a *Spirulina máxima* é utilizada em alimentação humana para suprir a deficiência de proteína. Entretanto sua produção é feita em sistema de alto nível tecnológico e custoso (SHELEF e SOEBER, 1980). O valor terapêutico das microalgas tem sido reconhecido há muito tempo. Dentre as propriedades terapêuticas das algas, pode-se mencionar anti-vômito, anti-hipertensivo, anticoagulante, reduz a taxa de colesterol, e fonte de vitaminas Richmond (1996); Pedraza (1989).

Recentes estudos epidemiológicos e oncológicos sugerem que o alto nível de β caroteno produzido pela *Dunaliella salina* pode proteger contra o desenvolvimento do câncer (BEN AMOTZ, et al., 1991). Segundo Richmond (1986), estudos estão sendo feitos no Instituto Nacional do Câncer nos Estados Unidos para mostrar que o uso diário de β caroteno extraído das microalgas pode reduzir a ocorrência do câncer nos seres humanos. O desenvolvimento de sistema de cultivo para microalgas com baixas condições tecnológicas e com finalidade a produção a baixo custo e em larga escala são alternativas apropriadas aos pequenos produtoras (MARTINEZ et al., 1988).

Seguindo o princípio de baratear o custo de produção, Klein e Gonzalez (1993) afirmaram que substâncias residuais, como água de matadouro (proveniente da lavagem do estômago de boi), vinhoto (resíduo do processamento de cana de açúcar) e caldo de peixe (maceração de restos de vísceras de peixes) poderiam dar resultados tão satisfatórios quanto os meios convencionais, e apresentam como vantagem o fato de serem de fácil aquisição sem representarem maiores gastos. O presente estudo pretende isolar do ambiente natural as espécies do gênero *Scenedesmus*, de ocorrência na região, para serem cultivadas e implementadas na dieta humana e sua aplicação em outras áreas, como aqüicultura, farmacêutica e ciências da saúde.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido em várias etapas no Laboratório de Limnologia Ecotecnologia e Biomanipulação do Curso de Engenharia de Pesca, localizado no Centro de Pesquisa em Aqüicultura Ambiental (CPAA).

a) Coleta:

As coletas foram realizadas em viveiro de piscicultura com uma rede de plâncton de 10 micrômetros de abertura de malha. As amostras foram acondicionadas em garrafas plásticas de água mineral tipo pet e levadas ao laboratório onde foram feitas filtrações sucessivas, separando os fitoplânctons dos zooplânctons. A amostra de fitoplâncton foi enriquecida e deixada em luz contínua durante uma semana com a finalidade de aumento da concentração dos fitoplânctons presentes na água coletada.

b) Isolamento:

Após uma semana, ao atingir uma densidade de 25×10^4 cel/ml, procedeu-se ao processo de isolamento das espécies. Foi escolhida a técnica do isolamento em placa (GUERRERO III & VILLEGAS, 1982). Esta técnica consiste em preparar o ágar-ágar na concentração de 1,5%. Em seguida, o Ágar é aquecido, para que seja dissolvido, e colocado em placas de petri, até que ocorra a solidificação após o esfriamento. Uma gota da água contendo os fitoplânctons é colocada na placa, espalhada sobre a superfície do meio com um bastão de vidro. Incubaram-se as placas no laboratório de plâncton no ambiente natural sem fotoperíodo. Após quatro semanas apareceram as colônias mono-específico, retirou-se e colocou se uma colônia em cada tubo de ensaio contendo o meio de cultura. A avaliação do material em crescimento foi feita com o auxílio de um microscópio ótico modelo Olympus.

c) Cultivo de *Scenedesmus*

Com o material oriundo do isolamento foram feitos os cultivos das diferentes espécies obtidas para avaliar os seus desempenhos. Empregou-se o método de avaliação da densidade celular do meio com auxílio de uma câmara de Neubauer e foi utilizado no meio CHU₁₀ modificado a seguir.

TABELA 1 - Meio de cultura CH₁₀ modificado

Reagente	Quantidade (g)
Ca(NO ₃) ²	0,04
K ₂ HPO ₄	0,01
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,025
Na ₂ CO ₃	0,02
Na ₂ SO ₃	0,025
FeCl ₃	0,0008

O monitoramento foi feito a cada dois dias no caso da curva de crescimento e semanalmente para o estudo da produção de biomassa de *Scenedesmus*. Nos dois casos, foi montado um experimento com três repetições cada e de forma totalmente aleatória. Os bio-ensaios foram acomodados sobre uma estante e expostos à luz fluorescente de 40 watts. O cultivo foi feito sem fotoperíodo. Para a análise, determinou-se o coeficiente de determinação e os ajustes de curva resposta no caso da curva de crescimento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O processo de isolamento mostrou a presença das seguintes microalgas, *Scenedesmus calyptratus*, *Scenedesmus acuminatus*, *Scenedesmus obliquus*. Durante os cultivos somente se desenvolveu a espécie *Scenedesmus acuminatus*. Os resultados dos cultivos estão representados nas Figuras 1 e 2.

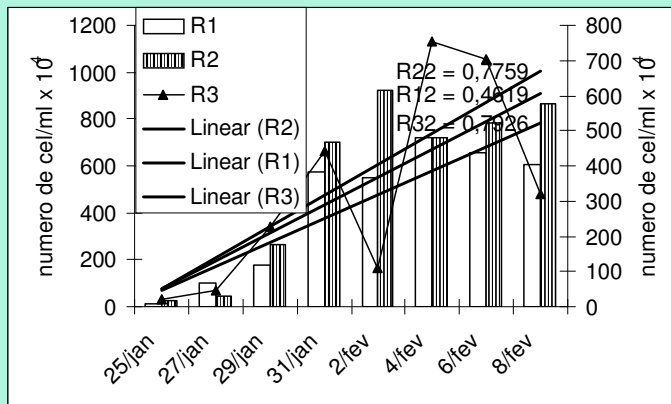


FIGURA 1 - Curva de crescimento de *Scenedesmus acuminatus* apresentando as três repetições e suas respectivas retas de ajuste durante o período de cultivo.

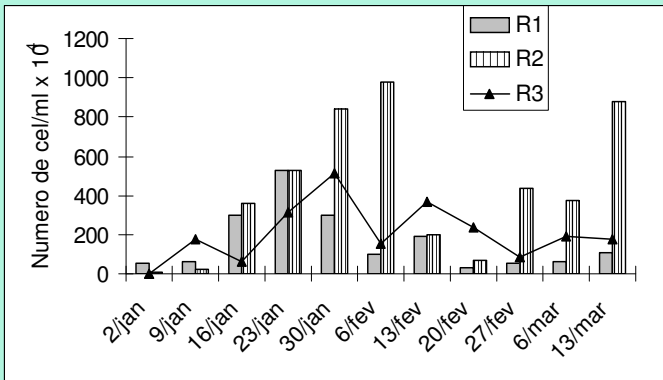


FIGURA 2 - Evolução do cultivo de *Scenedesmus acuminatus* apresentando as três repetições.

As curvas de crescimento apresentaram-se crescentes. Do primeiro dia ao terceiro dia, elas ficaram quase constantes, correspondendo à fase de indução. Esta fase de acordo com Gomes (1989), corresponde à fase jovem fisiológica que caracteriza o início do crescimento, em que há divisão celular e as microalgas se encontram em adaptação ao meio, permanecendo com um número quase constante de células. Sua duração depende de fatores tais como idade, concentração inicial do meio de cultura e condições físico-químicas do meio. Do terceiro ao oitavo dia, observou-se um crescimento rápido, correspondendo à fase de crescimento exponencial.

Nesta fase, as microalgas, após adaptação, iniciaram as divisões celulares. O número de microalgas aumentou em progressão geométrica. Acredita-se que este crescimento rápido deve-se, num primeiro tempo, à concentração do meio de cultura utilizado (PEDRAZA, 1989) e, em segundo momento, à estrutura da microalga *Scenedesmus*, que se caracteriza por uma colônia de duas a quatro células cada. O processo de reprodução ocorre por isolamento das células individuais e em seguida divisão celular podendo resultar a formação de 4 a 16 células filhas. Para o uso em alimentação, extração de proteína e outros fins, retiram-se as amostras oriundas desta fase por serem compostas de células jovens. Do nono ao décimo primeiro dia, houve um crescimento lento na repetição 2 e um declínio nas repetições 1 e 3 (Figura 2). É a fase de redução de crescimento. Ela se traduz pela redução da velocidade de crescimento e pela diminuição do ângulo da curva de reajuste.

Esta mudança na curva é atribuída ao início da escassez de alguns nutrientes tornando o meio desfavorável ao desenvolvimento. A redução, nas repetições 1 e 3, foi causada pela contaminação por zooplâncton do grupo dos protozoários ciliados. A espécie de microalga apresenta-se como alimento preferido do zooplâncton, tornando-se vulnerável à contaminação quando os cuidados especiais não foram tomados. Do décimo segundo ao décimo quarto dia, observaram-se curvas decrescentes, correspondendo à fase de morte da cultura. A repetição 2 atingiu uma densidade máxima de $976,25 \times 10^4$ cel/ml na quinta semana do cultivo. Após este período, todas as repetições apresentaram uma redução significativa, devido à contaminação por protozoários ciliados e um esgotamento dos nutrientes.

Os resultados foram superiores aos obtidos por MARTINEZ et al. (1988) e KLEIN & GONZALEZ (1993) com as espécies *Tratraselmis suecica* (440×10^4 cel/ml) e *Tetraselmis chuii* (158×10^4 cel/ml), respectivamente. Entretanto, ficaram muito abaixo dos resultados de Sebastien (1999) com as espécies *Dunaliella salina*, *Isochrysis galbana*, tendo obtido 1258×10^4 cel/ml e $1318,25 \times 10^4$ cel/ml em meios compostos por uma mistura de água de matadouro e fertilizante agrícola, respectivamente. As contaminações são freqüentes em cultivo em larga escala com baixo nível tecnológico em decorrência das condições rudimentares caracterizadas pela insuficiência de material, como vidrarias e espaço físico, que não permite o desenvolvimento de culturas em condições assépticas (MARTINEZ ET AL., 1988). As condições nutricionais do meio tornaram-se tão desfavoráveis que a morte e a lise das células predominam sobre o crescimento. De acordo com Gomes (1989), esta fase traduz o esgotamento de todos os nutrientes. A análise da regressão mostrou os seguintes valores: $R^2_1 = 0,7926$; $R^2_2 = 0,7759$; $R^2_3 = 0,4619$, indicando que o desenvolvimento das algas nas repetições 1 e 2 foi causado em 80% pelo meio utilizado. A retomada do crescimento em R_2 é devida a uma filtragem do cultivo com uma peneira de 10 mm e um acréscimo de nutrientes ao meio.

A partir da análise do coeficiente de variação foram obtidos os seguintes valores de coeficientes de variação: $CV_1 = 27.44\%$, $CV_2 = 36.87\%$, $CV_3 = 44.88\%$. Estes valores são considerados pouco elevados em se tratando de organismos microscópicos, pois, nos tratamentos estatísticos, os organismos microscópicos, tais como bactérias e vírus, apresentam sempre valores elevados de densidade e de coeficientes de variação.

4. CONCLUSÕES

1- A *Scenedesmus acuminatus* encontrada no meio natural constitui a primeira microalga isolada com sucesso para o banco de microalga do laboratório de planctologia.

2- O seu cultivo pode ser feito com o meio CHU₁₀ modificado e as repicagens, no caso de cultivo em larga escala, podem ser feitas em todos os 6 ou 7 dias.

3- A *scenedesmus acuminatus* neste meio não apresentou fase estacionária.

5. AGRADECIMENTOS

Convênio Unioeste-IAP/CPAA.

6. REFERÊNCIAS

BECKER, E. W. *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1994, 293 p.

BEN-AMOTZ, A.; SHAISH, A.; AVRON, M. *The biotechnology of cultivating Dunaliella for production of b carotene Rich Algae . Bioresource Technology*. Great Britain, v. 38, n. 2/3, p 233-235, 1991.

BURI, P. *The potencial of algal culture in aquacultural enterprises. Arch Hydrobiol*. Stuttgart. 1978, v.11, p. 121-126.

FOX, R. D. *Spirulina production& potencial*. Aix-em-Provence: Edisud, 1996, 231 p.

GOMES, L. A. O. Cultivo de crustáceos e moluscos. São Paulo: Nobel, 1989, p 226.

GUERRERO III, R. D.; VILLEGAS, C. T. *Report of the training course on growing food organism for fish hatcheries*. Phillippines, South China Sea Fisheries Development/ Coordinating Program. 1982.

KLEIN, V. L. M.; GONZALEZ, A. A. W. Cultivo da microalga Tetraselmis chuii Prings em diferentes meios de cultura. Ver Ciência Agronômica. Fortaleza, 24 (1/2) p. 91-100, 1993.

MARTINEZ, C. C.; MUÑOZ, A. A.; SALAS, L. M.; SIERRA, C. P.; LEYVA, G. *Cultivo semi continuo de la microalga Tetraselmis suecica k. Anales del Instituto de Ciencias Del Mar y Limnologia*. México (1988). 7 p.

- MESKE, C.; PFEFFER, E. *Both experiments with carp and grass carp*. *Arch Hydrobiol Stuttgart.*, 1978, v. 11, p. 98-107.
- MOURENTE, D. A.; MEDINA, A.; GONZALEZ, A. *Variations in lipid content and nutritional status during larval development of the marine shrimp Penaeus kerathurus*. *Aquaculture*, 1995, v. 130, p 187-199.
- NANTON, D. A.; CASTELL, J. D. *The effects of dietary fatty acids on the fatty acid composition of the harpacticoid copepod, Tisbe sp., for use as a live food for marine fish larvae*. *Aquaculture*, 1998, v. 163, p. 251-261.
- PEDRAZA, G. X. *Cultivo de Spirulina maxima para suplementación proteica*. *Livestock Research for Rural Development*. Cali: Columbia, 1989, Vol 1 No1, 7p.
- RICHMOND, A. *Out door mass culture of microalgae*. In: RICHMOND, A. *Handbook of Microalgal Mass culture*. Florida; CRC, 1996, 526 p. p. 285-329.
- SEBASTIEN, N. Y. *Biotecnologia de cultivo de microalga: pré-requisito para um desenvolvimento sustentável*. 1999, 110 p. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) Universidade Federal do Ceará – Fortaleza.
- SHELEF G.; SOEBER C. J. *Algal biomass Biomedical*. Press: Holland, 1980, 600 p.

Unioeste
Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
— www.unioeste.br —

REVISTA VARIA SCIENTIA
Versão eletrônica disponível na internet:
www.unioeste.br/saber

V A R I A
S C I E N T I A