

Efeito do meio Erd Schreiber no cultivo das microalgas *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii* e *Isochrysis galbana*

Nyamien Yahaut Sebastien^{1*} e Vera Lucia Mota Klein²

¹Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste), Rua da Faculdade, 645, 85903-000, Jardim La Salle, Toledo, Paraná, Brasil. ²Departamento de Engenharia de Pesca, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Av. Mister Hull, s/n, 60000-000, Pici, Fortaleza, Ceará, Brasil. *Autor para correspondência. e-mail: nysebastien@unioeste.br

RESUMO. As microalgas são utilizadas como fonte de alimento em aquicultura. Neste trabalho cultivaram-se *D. salina*, *T. chuii* e *I. galbana*. O objetivo do trabalho consistiu em determinar o efeito do meio Erd Schreiber sobre o seu crescimento. Iniciou-se o cultivo com a mistura de 200 mg de Na₂HPO₄·7H₂O, 100 mg de NaNO₃ e 50 mL de extrato de solo. No monitoramento, manteve-se a temperatura entre 24 - 28 °C, a salinidade a 34 ppt, à iluminação constante, a densidade celular com uma câmara de Neubauer e um microscópio binocular modelo ZEISS. Como resultado, *I. galbana*, *D. salina* e *T. chuii* atingiram 969 10⁴ cel/mL, 457 x 10⁴ cel/mL e 258,66 x 10⁴ cel/mL, respectivamente, e os coeficientes angulares b foram 3,76 x 10⁴ cel./mL/dia, 6,84 x 10⁴ cel./mL/dia e 2,08 x 10⁴ cel./mL/dia respectivamente, indicando bom desempenho de todas as microalgas no meio Erd Schreiber.

Palavras-chave: cultivo, microalgas, *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii*, *Isochrysis galbana*, Erd Schreiber.

ABSTRACT. Erd Schreiber medium effect in culture of microalgae *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii* and *Isochrysis galbana*. The microalgae is used as food source in aquiculture. In this work they had cultivated *D. salina*, *T. chuii* and *I. galbana*. The objective of the work is to determine the effect of Erd Schreiber's culture medium on the microalgae growth. The culture initiated mixing 200mg of Na₂HPO₄·7H₂O, 100 mg of NaNO₃ and 50 mL of soil extract. During the culture the temperature had varied between 24 and 28°C, the salinity was fixed on 34 ‰, and the illumination was maintained constant. The assessment of the culture was made by a chamber of Neubauer and a binocular microscope ZEISS model. As result *I. galbana*, *D. salina* and *T. chuii* reached 969 10⁴ cel/mL, 457 x 10⁴ cel/mL and 258,66 x 10⁴ cel/mL respectively and as angular coefficient 3,76 x 10⁴ cel/mL/dia, 6,84 x 10⁴ cel/mL/dia and 2,08 10⁴ x cel/mL/dia respectively, showing good answer of the microalgae to the effect of Erd Schreiber's medium.

Key words: culture, microalgae *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii*, *Isochrysis galbana*, Erd Schreiber.

Introdução

A aquicultura no século XXI deverá ser uma atividade promissora apresentando-se como um setor importante para o desenvolvimento ecológico, a preservação das espécies e a conservação dos ecossistemas aquáticos, litorâneos e de estuários. Para o seu desenvolvimento, não necessita de grandes áreas se a tecnologia for bem escolhida. No caso específico dos cultivos de camarões, lagostas e peixes, faz-se necessária uma fase de larvicultura, quando as larvas recebem cuidados especiais sob o ponto de vista da alimentação e das condições físicas e químicas e qualidade da água.

No caso da alimentação, devido às variações de

estágios e ao tamanho das larvas, é indispensável a manutenção de uma unidade de produção de microalgas por ser a principal fonte de alimento natural (Webb e Chu, 1982; Walne, 1984) das larvas sobretudo na fase de zoéa (Yamashita e Pinto, 1982), barateando a produção e fornecendo pós-larvas saudáveis para a fase de engorda.

Além de sua importância na aquicultura, as microalgas também constituem uma fonte de matéria prima para a indústria farmacêutica. Ultimamente a espécie *Dunaliella salina* encapsulada é usada como uma fonte de produção de β- caroteno, glicerol e de proteínas (Gibbs e Duffus, 1976; Bem-Amotz e Avron, 1978, 1980; Ben-Amotz *et al.*, 1982; Fábregas *et al.*, 1994) e como medicamento por seus efeitos anti-

cancerígenos (Mokady, 1992; Fujii *et al.*, 1993). Vários meios enriquecidos para microalga à base de nitrato, fosfato e metais têm sido descritos por Hoff e Snell (2001). Recentemente, Guillard's F/2 descreveram o meio enriquecido de substâncias inorgânicas como nitrato, fosfato, traços de metais e vitaminas. O meio de cultura fornece às microalgas todos os nutrientes requeridos para o rápido crescimento, similares às condições encontradas em meios eutrofizados (Hoff e Snell, 2001).

No presente trabalho, foram desenvolvidos cultivos de *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii* e *Isochrysis galbana* com a finalidade de determinar o efeito do meio Erd Schreiber, que é amplamente utilizado sobre o seu desenvolvimento.

Material e métodos

Esta pesquisa foi realizada no Laboratório de Planctologia do Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, Estado do Ceará. Na execução deste trabalho, foram seguidas as seguintes etapas:

Preparação do meio de cultura

O meio de Erd Schreiber foi obtido, misturando-se um litro do meio A com 50 mL de meio B de extrato de solo.

Preparação do meio A

Foram pesados em balança analítica, 100 mg de NaNO_3 e 200 mg de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e dissolvidos em um litro de água do mar com salinidade de 34 ppt. A mistura sofreu uma esterilização durante 30 minutos em autoclave a uma temperatura de 121°C. Após o período, foi conservada em geladeira até o uso.

Preparação do meio B

A obtenção deste meio iniciou com a coleta de sedimento de mangue no estuário do rio Cocó, localizado em Fortaleza, Estado de Ceará. Pesou-se um quilograma em uma balança mecânica e misturou-se a um litro de água destilada. A mistura sofreu uma primeira autoclavagem a 121°C durante 20 minutos. A solução obtida foi deixada em repouso durante quatro dias na geladeira para a decantação. Após esse período, formou-se uma parte sobrenadante que foi separada e autoclavada novamente a 121°C durante 60 minutos. Depois desse processo de esterilização, esse extrato foi deixado em repouso na geladeira durante três dias antes de ser utilizado.

Inoculação e manutenção dos cultivos

Os cultivos foram iniciados com o volume de 20 mL o qual foi aumentado a cada sete dias até atingir

15000 mL. Os bioensaios foram colocados sobre prateleiras com lâmpadas fluorescentes de 40 W, luz do dia, sem fotoperíodo. A temperatura da sala oscilou entre 24 - 28°C. A partir do volume de 750 mL, os cultivos sofreram aeração constante. O monitoramento da cultura foi feito por contagens de células com uma câmara de Neubauer, sendo previamente fixado com solução Formol 4%. As observações foram feitas em microscópio binocular ZEISS com aumento de 100 X.

As médias de concentrações foram relativas às duas últimas repetições, pois apresentaram resultados compatíveis. Os dados da primeira repetição foram desprezados porque apresentaram valores discrepantes, denotando vício amostral. Os dados obtidos foram analisados e ajustados segundo o modelo de Von Bertalanffy (1938), o qual é baseado no uso dos Mínimos Quadrados, cuja equação de reta é:

$$Y = a + bX,$$

em que X representa a variável independente, Y a variável dependente, b o coeficiente angular ou inclinação e a o coeficiente linear, que é o ponto de interseção da reta geral de crescimento das algas $Y = a + bX$ com o eixo das ordenadas.

$$b = \frac{\sum x \cdot \sum y - n \sum xy}{(\sum x)^2 - n \sum x^2} \quad a = \frac{\sum x \cdot y \cdot \sum x - \sum y \cdot \sum x^2}{(\sum x)^2 - n \sum x^2}$$

Resultados

Os resultados do experimento encontram-se na Tabela 1 e Figura 1.

Tabela 1. Valores médios obtidos do número de células por mililitro das espécies cultivadas em meio Erd-Schreiber.

Espécies Cultivadas	Número de células por mL $\times 10^4$						
	Dias de cultivo						
	7	14	21	28	35	42	49
<i>D. salina</i>	49,62	46,25	163	287,3	318	457,55	171
<i>T. chuii</i>	51,12	64,25	120,75	238,66	258	106,5	113,33
<i>I. galbana</i>	320,2	650,5	696	854,5	500	969	419

Da observação e análise do desenvolvimento dos cultivos, verificou-se que a espécie *Isochrysis galbana* obteve uma melhor adaptação, atingindo seu pico no 28.º dia de cultivo com uma concentração de 854,5 $\times 10^4$ cél./mL, seguido da *Dunaliella salina*, com a concentração máxima de 457,55 $\times 10^4$ cél./mL, no 42.º dia de cultivo. e de *Tetraselmis chuii*, com 258 $\times 10^4$ cél./mL, no 35.º dia de cultivo. A observação e análise da Figura 1 mostra a curva de desenvolvimento das três espécies.

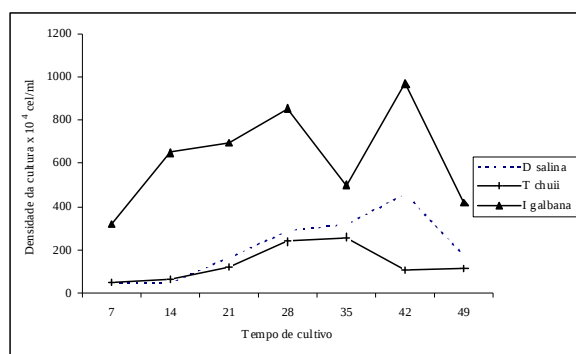


Figura 1. Evolução da densidade média das espécies cultivadas *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii* e *Isochrysis galbana* no meio Erd Schreiber em função do tempo de cultivo.

A Figura mostra a curva da *D. salina*, que teve um aumento contínuo até o 42.º dia de cultivo, em que ela atingiu uma concentração de $457,55 \times 10^4$ cél/mL antes de sofrer um declínio. Essa fase corresponde aos períodos de adaptação e de crescimento exponencial e senescência. A queda observada resultou do aparecimento de contaminação por ciliados e nematódeos. A reta Y_D teve um coeficiente angular $b = 47,92 \times 10^4$ cél/mL/dia (Figura 2). A *T. chuii* apresentou-se contínua e crescente até o 35.º dia de cultivo, quando a concentração foi de 258×10^4 cél/mL. A partir desse ponto máximo, houve uma queda da concentração de células. *D. salina*, e *T. chuii* apresentaram um comportamento padrão observando as fases de adaptação, crescimento exponencial e declínio. A reta Y_T da *T. chuii* teve um coeficiente angular de $b = 14,58$ cél/mL/dia (Figura 2).

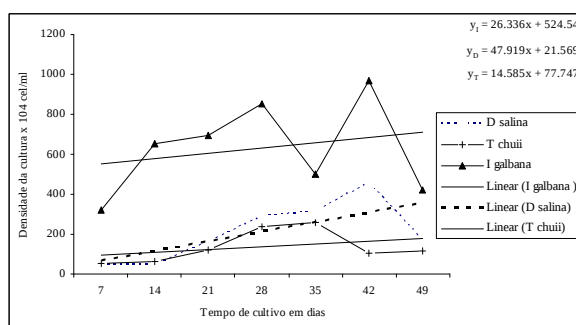


Figura 2. Equações e retas dos ajustes de curva repostas do desenvolvimento das três microalgas *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii* e *Isochrysis galbana*.

O crescimento de *I. galbana*, expresso pela curva mostrou uma irregularidade com dois máximos em $854,5$ e 969×10^4 cél/mL e a reta Y_I teve um coeficiente angular $b = 26,33$ cél/mL/dia (Figura 2). *I. galbana* teve comportamento diferente; não foi observada a fase de adaptação e de declínio. As quedas nos dias 35 e 49 são decorrentes de

contaminação por zooplânctons ciliados.

A *Isochrysis*, ao contrário dos outros, não apresentou fase de adaptação. Observaram-se as fases de crescimento exponencial e a de redução de crescimento até o 28.º dia. A queda caracterizou a fase de senescência. As equações de ajuste foram:

$$Y_I = 524,54 + 26,33X \text{ para } Isochrysis \text{ galbana};$$

$$Y_D = 21,56 + 47,92X \text{ para } Dunaliella \text{ salina}$$

$$\text{e } Y_T = 77,74 + 14,58X \text{ para } Tetraselmis \text{ chuii}$$

Discussão

Neste estudo, as espécies *D. salina* e *T. chuii* tiveram comportamentos semelhantes, ligados à fisiologia celular e as duas espécies são pertencentes ao grupo de clorofíceas e móveis. A reprodução das duas espécies ocorre por união das células de forma sexuada. Desse processo, geraram duas células. A temperatura e a composição do meio de cultura têm contribuído para esse crescimento (Hoff e Snell, 2001). *I. galbana*, ao contrário, é imóvel e de diâmetro menor, com reprodução por simples divisão celular, facilitando a sua adaptação ao meio. Essa forma de reprodução pode ocorrer várias vezes ao dia, em boas condições, fornecendo até 16 células a partir da única célula inicial. Processo bastante rápido tem favorecido a superação de *I. galbana*. Klein e Gonzalez (1993) mostraram valores inferiores a esses, utilizando o mesmo meio de cultivo para *T. chuii*, entretanto o pico do cultivo se deu em menor período de dias, na ordem de 172×10^4 cél/mL no 14.º dia de cultivo. Oliveira e Koenig (1984), em cultivo de *T. chuii*, usando fertilizantes orgânicos, obtiveram uma densidade populacional muito menor com $403,75 \times 10^3$ cél/mL no 9.º dia de cultivo. Afonso e Martinez (1988) obtiveram valores próximos aos aqui encontrados para *T. chuii* com meios Miguel-Matue e o meio A-M, preparado com fertilizantes inorgânicos.

De acordo com o modelo de Von Bertalanffy (1938), as equações mostraram o crescimento diferenciado para cada espécie.

Os coeficientes angulares que mostram a rapidez do crescimento foram $47,92 \times 10^4$ cél/mL/dia de *D. salina*, $14,58 \times 10^4$ cél/mL/dia de *T. chuii* e $26,33 \times 10^4$ cél/mL/dia de *I. galbana*. A comparação dos coeficientes angulares revela que a *D. salina* apresentou melhor desempenho, seguido de *I. galbana* e, finalmente, de *T. chuii*.

Conclusão

Conclui-se que as três espécies (*Dunaliella salina*,

Tetraselmis chuii e *Isochrysis galbana*) apresentaram resultados satisfatórios atingindo os máximos com $457,55 \times 10^4$ cél/mL, no 42.º dia, 258×10^4 cél/mL, no 35.º dia, e 969×10^4 cél/mL, no 42.º dia, respectivamente. Em termos de produção, no entanto, *Isochrysis* superou, devido a sua modalidade de reprodução e, em termos de produtividade, a *Dunaliella* apresentou melhor resultado.

Referências

- AFONSO, A.; MARTÍNEZ, L. Comparación del volumen celular y del crecimiento de *Tetraselmis* spp. Com diferentes fertilizantes. *Rev. Investig. Mar.*, v. 8, n. 3, 1988.
- BEN-AMOTZ, A.; AVRON, M. On the mechanism of *Dunaliella* osmoregulation. In: KAPLAN; GINZBURG, M. (Ed.). *Energics and structure of halophilic microorganisms*. Amsterdam: Elsevier/North Holland/Biomedical Press, 1978. p. 529-541.
- BEN-AMOTZ, A.; AVRON, M. Glycerol, β -carotene and dry algal meal production by commercial cultivation of *Dunaliella*. In: SHELEF, G.; SOEDER, C.J. (Ed.). *Algae Biomass: production and use*. Amsterdam: Elsevier/North Holland/Biomedical Press, 1980. p. 63-100.
- BEN-AMOTZ, A. *et al.* Glycerol production by *Dunaliella*. *Experientia*, Basel, v. 38, p. 49-52, 1982.
- BERTALANFFY, L. Von. A quantitative theory of organic growth. *Human Biol.*, Detroit, v. 10, n. 2, p. 181-213, 1938.
- FÁBREGAS, J. *et al.* Improvment of growth rate and cell productivity by aeration rate. In: FÁBREGAS, J. *et al.* (Ed.). *Culture of the marine microalgae Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technol.*, Santiago, Spain, v. 48, p. 107- 111, 1994.
- FUJII, Y. *et al.* Effect of beta-carotene rich algae *Dunaliella bardawil* on dynamic changes of normal and neoplastic mammary cells and general metabolism in mice. *Anticancer Rev.*, v. 13, n. 2, p. 389-393, 1993.
- GIBBS, N.; DUFFUS, C.N. Natural protoplast *Dunaliella* as source of protein. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, D.C., v. 31, p. 602-604, 1976.
- HOFF, F.H.; SNELL, T.W. *Plankton culture manual fifth edition*. Florida Aqua Farms, Inc, 2001.
- MOKADY, S. Nutritional, toxicological and therapeutic aspects. In: AVRON M.; BEM-AMOTZ, A. (Ed.). *Dunaliella: physiology, biochemistry and biotechnology*, Boca Raton: Ed. CRC Press, 1992. p. 217.
- KLEIN, V.L.M.; GONZALEZ A. A Cultivo da microalga *Tetraselmis chuii* Prings em diferentes meios de cultura. *Ciê. Agron.*, Fortaleza, v. 24, n. 1/2, p. 91-100, 1993.
- OLIVEIRA, A.A.G.; KOENING, M.L. Crescimento exponencial de *Tetraselmis chuii* com fertilizante orgânico.. *Arq. Biol. Tecnol.*, Jabotão, v. 27, n. 3, 1984.
- YAMASHITA, C.; PINTO, M.F.C.M. Uso de diferentes espécies de algas na alimentação de camarão *Penaeus brasiliensis* no estágio de zoéa. *Emparn Bol. Pesq.* n. 9, 1982.
- WALNE, P.R. *In culture of bivalve molluscs*. 50 years experience at Conwy. Surrey, UK: Fishing News (Book) Ltd, p. 173, 1984.
- WEBB, K.L.; CHU, F.L.E. Phytoplankton as a food for bivalve larvae. In: PRUDER, G.D. *et al.* (Ed.). *Aquaculture nutrition: biochemical and physiological approaches to shellfish nutrition*, Baton Rouge: Ed. Louisiana State University Press, 1982. p. 272-291.

Received on September 29, 2005.

Accepted on April 20, 2006.