

CULTIVO DA MICROALGA *Tetraselmis chuii* PRINGS EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA.¹

Vera L. M. Klein²
Agunstin A. Gonzalez W.³

RESUMO

Os autores sugerem meios de cultura alternativos para a microalga *Tetraselmis chuii*, usando-se água de matadouro, vinhoto e caldo de peixe, sendo utilizado o meio Erd-Schreiber como controle. O melhor resultado obtido, foi com o meio preparado com caldo de peixe na concentração de 5 ppm, que apresentou a densidade celular de 201×10^4 cel/ml; o meio preparado com água de matadouro, numa concentração de 50 ppm, apresentou uma densidade máxima de 122×10^4 cel/ml; o vinhoto, na concentração de 5 ppm, mostrou densidade de 152×10^4 cel/ml e o meio Erd-Schreiber, usado como controle, teve a densidade máxima de 126×10^4 cel/ml. Não foi evidenciado grandes diferenças entre os meios Erd-Schreiber, água de matadouro na concentração de 50 ppm e vinhoto a 5 ppm e os dois últimos entre si. Entretanto notou-se diferença marcante entre o meio caldo de peixe e os demais.

PALAVRAS-CHAVE - Microalgas, meios de cultura, cultivo de microalgas, *Tetraselmis chuii*.

CULTURE OF THE MICROALGAE *Tetraselmis chuii* PRINGS IN DIFFERENT CULTURE MEDIA.

SUMMARY

In this paper the authors suggest alternatives of cultura media for culture of *Tetraselmis chuii*, using cattle washed-gut water, sugar cane alcohol waste, fish extract and the Erd-Schreiber medium, used as control. The best results obtained was prepared with fish extract, in the concentration of 5 ppt it present a cellular density of 201×10^4 cel/ml; the medium prepared with cattle washed-gut water at 50 ppt, present a maximum density of 122×10^4 cel/ml; the sugar cane alcohol waste in the concentration of 5 ppt was maximum value 152×10^4 cel/ml, Erd-Schreiber medium used as control was a maximum

density of 126×10^4 cel/ml. There was not great difference among the Erd-Schreiber's medium, and the media prepared with cattle washed-gut water 50 ppt and with sugar cane alcohol waste 5 ppt and between the two last. Although there was difference between the medium prepared fish extract and others media.

KEY WORDS - Microalgae, culture media, culture of microalgae, *Tetraselmis chuii*

INTRODUÇÃO

A larvicultura é parte essencial para o sucesso de cultivos de espécies aquáticas, principalmente nos tipos intensivos e super-intensivo, chegando algumas vezes a atingir 10% ou mais dos custos totais do projeto. Um dos itens que mais encarecem a larvicultura é o alimento fornecido às larvas dos crustáceos, durante os seus diversos estágios de vida, devido a que, desde o final do estágio nauplius, aquelas são alimentadas com microalgas ou fitoflagelados mantidos em meios de cultura elaborados à base de produtos químicos, que irão fornecer nutrientes necessários ao seu desenvolvimento. Entretanto, quando se visa uma produção em larga escala, nos deparamos com o inconveniente dos altos custos.

A utilização de fertilizantes agrícolas, tais como uréia, sulfato de amônia, superfosfato triplo ou adubo foliar, constitui uma alternativa para baratear os custos e apresentaram resultados bastante satisfatórios quando testados por YAMASHITA & MAGALHÃES¹⁰.

Seguindo-se o princípio de baratear o custo de produção, descobriu-se que substâncias residuais como água de matadouro (pro-

¹Trabalho apresentado no II Congresso de Ciências del Mar, Havana - Cuba, 1990.

²Professora do Departamento de Engenharia de Pesca CCA/UFC e pesquisadora do CNPq.

³Engenheiro de Pesca.

veniente da lavagem do estômago do 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, apresentam como vantagem o fato de serem de fácil aquisição, sem representarem maiores gastos.

No presente estudo, testou-se o desenvolvimento de *Tetraselmis chuii*, espécie que é importante fonte de alimentação de bivalvos (WALNE⁹) e peneidos (HUDINAGA⁵; COOK & MURPHY² e MOCK & MURPHY⁶), citados por YAMASHITA & MAGALHÃES¹⁰, utilizando-se os meios residuais já referidos e tendo como meio de controle o Erd-Schreiber, meio convencional de fácil preparação e que tem dado bons resultados quando testado em laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste estudo foram utilizados cepas de *Tetraselmis chuii*, gentilmente cedidos pela Pesquisadora Dilma

Bezerra da EMPARN (Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte). As mesmas chegaram em tubos de ensaio de 10 ml, estando em meio de cultura NH₁₅, que é o utilizado pela EMPARN para a manutenção de pequenos volumes. As cepas foram deixadas por dois dias a uma temperatura de 24 ± 1°C, sob a iluminação de uma lâmpada fluorescente de 40 watts, a uma distância de 15 cm. Vale salientar que estas mesmas condições de temperatura e luminosidade foram mantidas durante todo o período da experiência.

Após o período de adaptação, fez-se repicagem para tubos de ensaio de 10 ml, contendo o meio Erd-Schreiber, cuja composição consta na Tabela 1, sendo 8 ml do meio e 2 ml de inóculo. Manteve-se os tubos sob iluminação constante, sendo periodicamente agitados a fim de promover o arejamento do meio, 6 dias depois, foram colocados 20 ml do inóculo em 150 ml do meio Erd-Schreiber e, após 5 dias, foram inoculados em um volume de 1.000 ml do meio.

Tabela 1 - Composição dos Meios de Cultura no Cultivo de *Tetraselmis chuii*.

Componente Básico	Meio E-S (Erd-Schreiber)	Meio C-P (Caldo de Peixe)	Meio A-M (Água de matadouro)	Meio com Vinhoto
NaNO ₃	100 mg	-	-	-
Na ₂ HPO ₄ H ₂ O	200 mg	-	-	-
água do mar	1.000 ml	1.000 ml	1.000 ml	1.000 ml
Extrato do solo	50 ml			
Extrato de peixe	-	5 ml		
Água de lavagem de vísceras		-	50 ml	
Vinhoto				5 ml

A partir de 1.000 ml. é que passou-se a testar as diversas concentrações de cada uma das substâncias residuais, tendo como meio de controle o Erd-Schreiber, considerando o meio convencional.

As matérias primas utilizadas como fertilizantes em cada um dos meios testados foram as seguintes:

- **Água de matadouro** - coletada nas instalações do Frigorífico Industrial de Fortaleza (FRIFORT) durante a lavagem do estômago do gado bovino, ao se remover o sólido semi-

digerido com água potável. Ocorre o escorrimto daquela água de cor esverdeada e utilizada como fonte de nutrientes. Experiência similar foi realizada por BARTOLOMEU et alii¹, com a diferença que a água residual que serviu como matéria prima era proveniente da lavagem da carcaça do boi. Deixou-se que a água coletada decantasse, sendo em seguida filtrada em papel filtro. O material filtrado foi autoclavado e adicionado na concentração de 50, 100 e 150 ml do mesmo para cada litro de água do mar filtrada e autoclavada.

- **Vinhoto** - resíduo da destilação da cana-de-açúcar isento de álcool e que foi coletado a partir das piscinas de repouso. Formado pelo acúmulo de vinhoto das instalações da Ypióca Agroindustrial, em Maranguape - Ceará. De igual maneira o material foi submetido a decantação e posterior esterilização em autoclave, sendo adicionado nas concentrações de 5, 10 e 20 ml para cada litro de água do mar filtrada e autoclavada.

- **Caldo de peixe** - preparado misturando-se 500 g de peixe (vísceras ou resíduos do mesmo) com 2 litros de água estuarina, autoclavando-o para depois, retirar-se o líquido sobrenadante, adicionando-o na proporção de 5 ml por litro de água do mar filtrada e autoclavada.

A partir do volume de 1.000 ml, os bioensaios tiveram aeração constante.

As contagens foram realizadas seis vezes por semana, sendo as amostragens fixadas em formol a 4%, utilizando-se a câmara de Neubauer.

De um modo geral, para cada experimento utilizou-se pelo menos uma repetição, e aqueles que apresentaram melhores performances tiveram uma segunda repetição, a fim de se determinar a concentração ideal de cada componente.

A composição dos nutrientes dos diferentes meios de cultura pode ser observada na Tabela 2.

Tabela 2 - Análise de Nutrientes dos Meios de Cultura Residuais Utilizados nos Experimentos.

NUTRIENTE (mg/l)	Meio C-P (1)	A-M (2)	COM VINHOTO
NO ₃	0,48	70,	
NO ₂	10,60	0,0	6,60
PO ₄	48,20	100,0	250,0
PH	-	-	3,4

(1) Segundo OLIVEIRA & KOENING⁷.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O meio Erd-Schreiber, que foi utilizado neste trabalho como padrão, apresentou um desenvolvimento homogêneo em todo o período do experimento, sendo sua maior densidade alcançada no 14º. dia de cultivo, na ordem de 172×10^4 cel/ml, confirmando as

afirmações de GRIFFITH et alii⁴, citado por OLIVEIRA e KOENING⁷, no sentido de ser possível a obtenção de mais de 100×10^4 cel/ml, utilizando-se meio artificial (Figuras 1, 2 e 7 e Tabela 3).

Tabela 3 - Densidade Celular de *Tetraselmis chuii* em Meios Erd-Schreiber e Caldo de Peixe com Repetições.

DIA DE CULTIVO	Numero de Celulas/ml x 10 ⁴			
	Meio Erd-Schreiber		Meio Caldo de Peixe	
	Inicial	Repetição	Inicial	Repetição
Inoculo	18	36	87	56
1º	-	12	-	90
2º	35	12	-	98
3º	43	92	39	60
4º	86	27	-	156
5º	88	26	109	144
6º	41	120	102	70
7º	24	110	177	63
8º	30	115	-	-
9º	52	126	58	2
	54	84	-	-
	79	50	201	-
	68	82	108	-
	109	57	85	-
14º	122	55	-	-

O caldo de peixe, que é considerado um meio de cultura com fertilização orgânica, apresentou bons resultados nos dois experimentos (inicial e repetição), chegando a atingir 201×10^4 cel/ml no experimento inicial e 156×10^4 cel/ml na repetição. Ambos foram bastante superiores àqueles obtidos por OLIVEIRA e KOENING⁷ em diluição de 2,5 e 1,25 ppm de caldo de peixe, resultando $40,38$ e $18,88 \times 10^4$ cel/ml, respectivamente (Figuras 3 e 4 e Tabelas 3 e 6).

A maior densidade alcançada em meio fertilizado, organicamente, com água de matadouro foi na diluição de 50 ppm, isto é, a de menor concentração das três que foram testadas. Seu melhor desempenho corresponde a 130×10^4 cel/ml, alcançado no 4º. dia de cultivo em um volume de 1.000 ml (Figura 6 e Tabela 5).

As outras concentrações da água de matadouro (100 e 150 ppm), apresentaram resultados inferiores à de 50 ppm, parecendo que a elevada concentração de água fertilizada dificultou o desenvolvimento da cultura, ao impedir a passagem de luz, impedindo, em última análise, a fotossíntese e por apresentar, também, sedimentação de partículas da água de lavagem, o que promove o crescimento de outros microorganismos alheios à cultura, sendo fonte de contaminação da mesma (Figuras 1 e 2 e Tabelas 4, 5 e 6).

Tabela 4 - Densidade Celular de *Tetraselmis chuii* Utilizando-se Meios de Cultura Água de Matadouro e Vinhoto em Diferentes Concentrações.

DIA DE CULTIVO	Número de células/ml x 10 ⁴											
	Água de matadouro						Vinhoto					
	50 PPM		100 PPM		150 PPM		20 PPM		10 PPM		5 PPM	
	Inic.	Rep.	Inic.	Rep.	Inic.	Rep.	Inic.	Rep.	Inic.	Rep.	Inic.	Rep.
Inóculo	14	41	15	22	18	61	47	7	48	7	51	7
1 ^o		10	-	30	-	22	32	3	45	4	58	3
2 ^o	39	33	23	12	12	11	8	-	5	-	12	-
3 ^o	112	17	13	7	4	32	22	5	7	9	11	16
4 ^o	130		68	5	6	21	13	10	20	10	57	8
5 ^o	122	22	75	18	25	20	36	8	18	14	93	24
6 ^o	103	18	76	11	17	25	36	24	17	22	77	11
7 ^o	33	15	28				22		22	-	152	
8 ^o	22	24	6	12			8	12	12	20	20	58
9 ^o	51	7	4	5			2	1	3	3	6	1
10 ^o	22		3	7								
11 ^o	54	82	3	4			2	1	10	2	16	2
12 ^o	35	65	3	8			5	0	5	7	38	4
13 ^o	27	21	5	7			47	3	18	11	21	2
14 ^o	23	21	3	6			10	0	21		89	6

Obs.: Inic. = inicial; Rep. = Repetição

Tabela 5 - Densidade Celular de *Tetraselmis chuii* Obtida em Três Bioensaios, Utilizando-se Água de Matadouro a 50 ppm e Vinhoto a 5 ppm com meios de Cultura.

DIAS DE CULTIVO	Número de células/ml x 10 ⁴					
	Água de Matadouro a 50 ppm			Vinhoto a 5 ppm		
	1 ^o Bioensaio	2 ^o Bioensaio	3 ^o Bioensaio	1 ^o Bioensaio	2 ^o Bioensaio	3 ^o Bioensaio
Inóculo	14	41	61	51	7	
1 ^o		10	52	38	3	
2 ^o	38	33	12	12	-	
3 ^o	112	17	7	11	16	
4 ^o	130		10	57	8	
5 ^o	122	22	9	93	24	
6 ^o	103	18	8	77	11	
7 ^o	33	15		152		4
8 ^o	22	24	13	20	58	6
9 ^o	51	7	26	6	1	5
10 ^o	22		36		0	
11 ^o	54	82	18	16	2	18
12 ^o	35	65	20	38	4	10
13 ^o	24	21	38	21	2	5
14 ^o	23	21	9	89	6	2

Tabela 6 - Melhores Resultados Obtidos de *Tetraselmis chuii* em Diferentes Meios de Cultura.

DIA DE CULTIVO	MEIOS DE CULTURA			
	Carido de peixe a 5 ppm	Vinhoto a 5 ppm	Água de matadouro a 50 ppm	Erd-Schreib
	n ^o cel x 10 ⁴	n ^o cel x 10 ⁴	n ^o cel x 10 ⁴	n ^o cel x 10 ⁴
Inóculo	87	51	14	36
1 ^o	-	38	-	12
2 ^o	98	12	36	12
3 ^o	39	11	112	92
4 ^o	60	57	130	27
5 ^o	109	93	122	26
6 ^o	102	77	103	120
7 ^o	177	152	33	110
8 ^o	-	20	22	115
9 ^o	58	06	51	126
10 ^o	-	-	22	84
11 ^o	201	16	54	50
12 ^o	108	38	35	82
13 ^o	85	21	24	57
14 ^o	172	89	23	56

Vale ressaltar que a água de matadouro é uma matéria-prima cuja concentração pode variar muito, dependendo da ocasião da coleta, podendo ser mais ou menos diluída.

No meio fertilizado com vinhoto, o melhor desempenho foi da ordem de 142 x 10⁴ cel/ml, atingida no 7^o dia de cultivo, em volume de 1.000 ml, sendo bastante superior àqueles alcançados por PADILLA⁸, utilizando extrato de solo, e GRIFFITH et alii⁴ usando fertilizante orgânico, citado por OLIVEIRA e KOENING⁷ (Figuras 5 e 7).

Com respeito ao vinhoto, a maior diluição (5 ppm) revelou-se como sendo mais

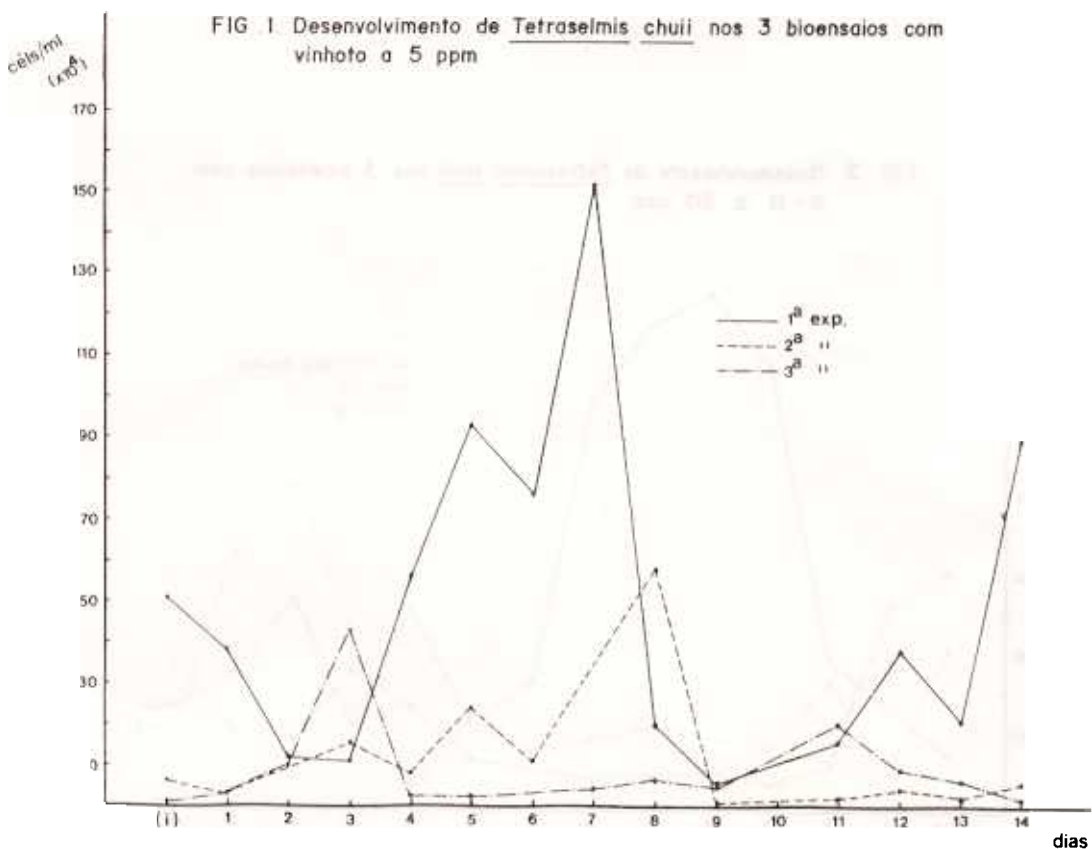
indicada entre as três testadas (5, 10 e 20 ppm) e o resultado mais satisfatório corresponde a 152×10^4 cel/ml, atingido no 5º. dia, isto no primeiro bioensaio, já que no segundo a maior densidade foi de 58×10^4 cel/ml no 8º. dia em 1.000 ml, não repetindo esta eficiência na repicagem posterior. Acredita-se que isto deveu-se à contaminação verificada pela presença e crescimento de outros flagelados, que tiveram uma melhor assimilação de nutrientes que a *Tetraselmis*.

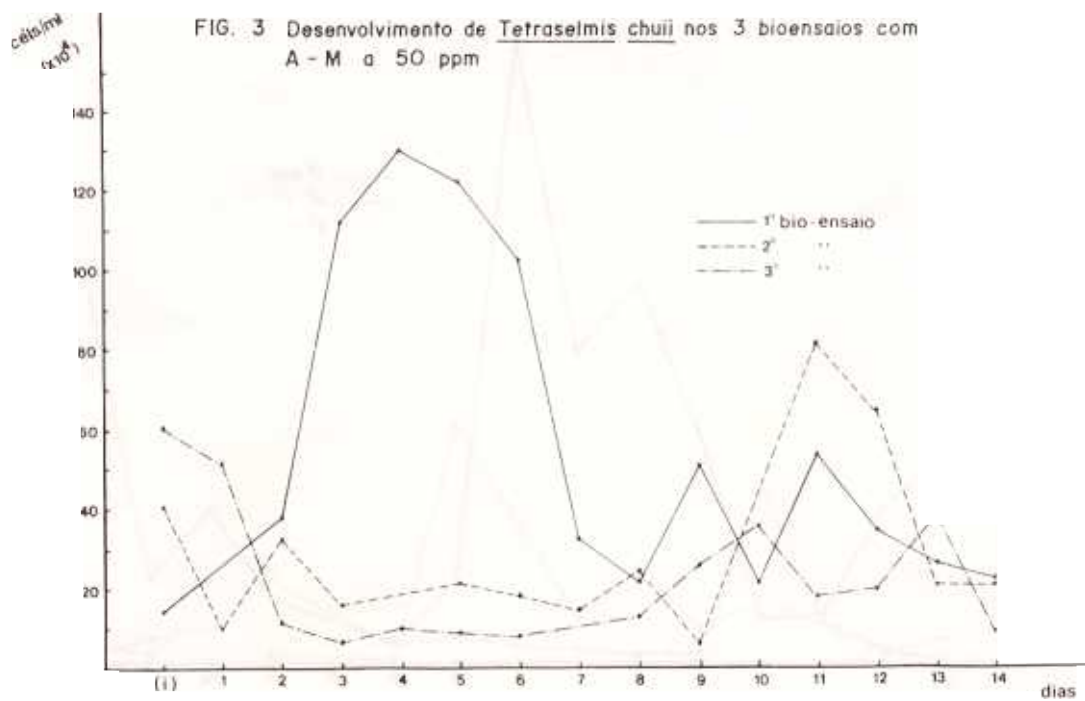
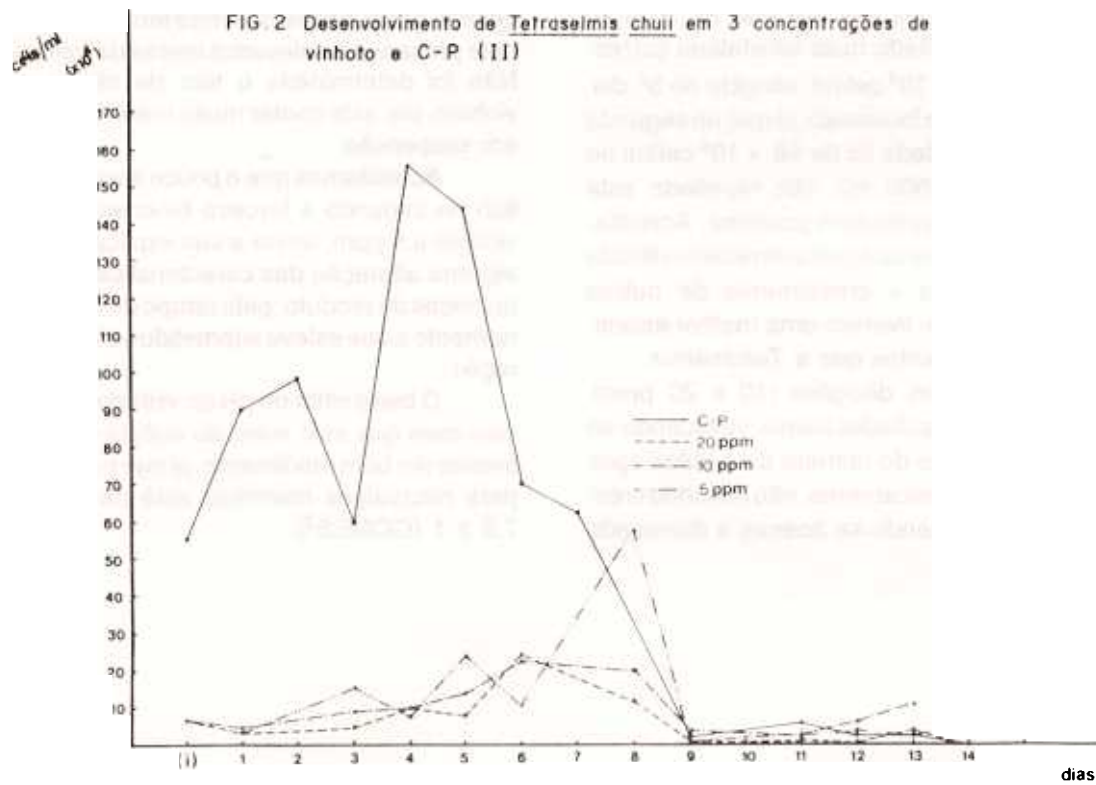
As outras diluições (10 e 20 ppm), alcançaram resultados baixos, verificando-se um decréscimo do número de células após o inóculo, e, praticamente, não havendo crescimento, mantendo-se apenas a densidade

celular, o que, em parte, talvez tenha ocorrido pela presença de elevados teores de fosfato. Não foi determinado o teor de nitrato de vinhoto, por este conter muito material sólido em suspensão.

Acreditamos que o pouco sucesso obtido no segundo e terceiro bioensaios com vinhoto a 5 ppm, tenha a sua explicação em alguma alteração das características físico-químicas do produto, pelo tempo de armazenamento a que esteve submetido sob refrigeração.

O baixo valor do pH do vinhoto influenciou para que este meio de cultura não obtivesse um bom rendimento, já que o pH ideal para microalgas marinhas está na faixa de $7,6 \pm 1$ (GOMES³).





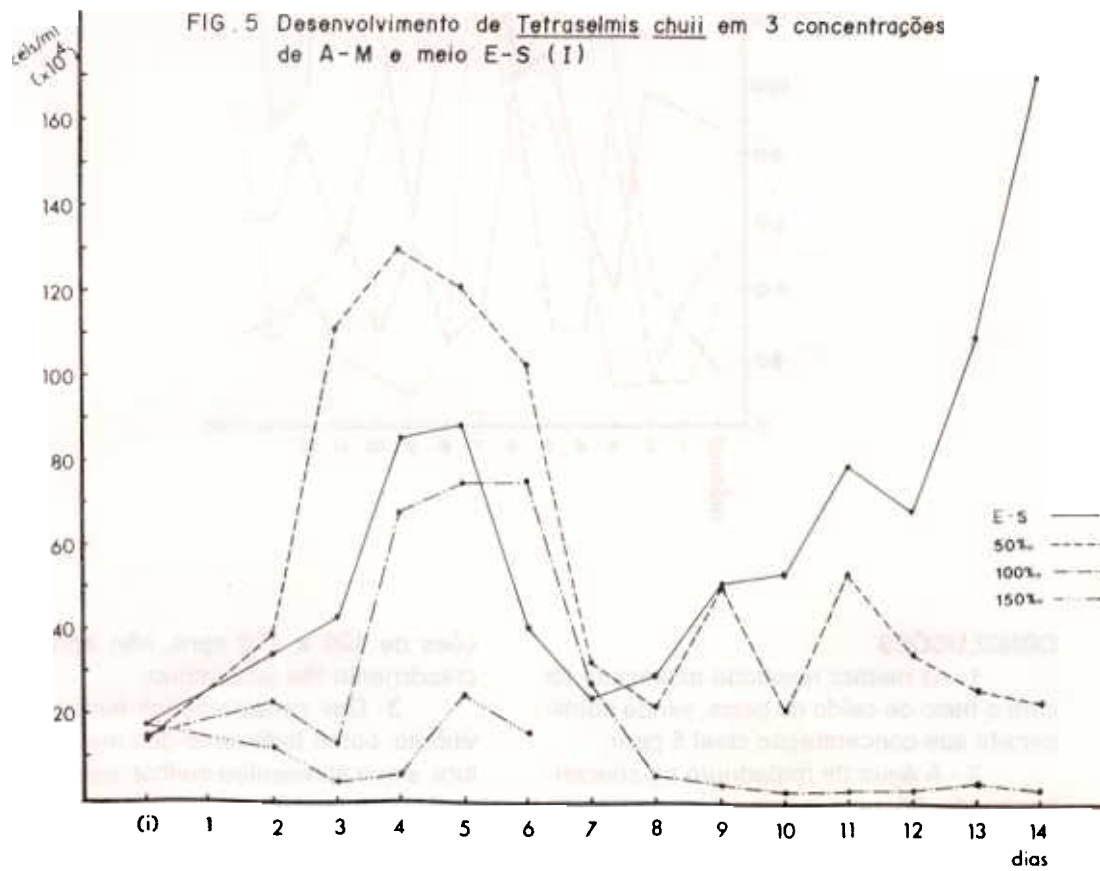
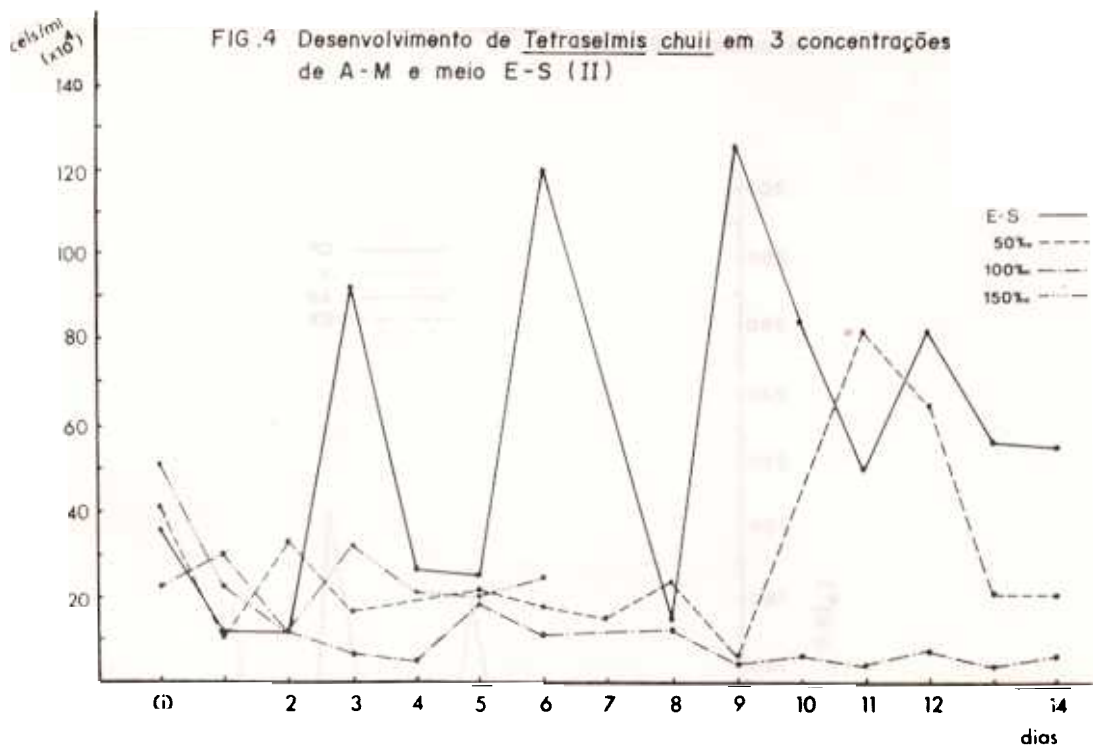
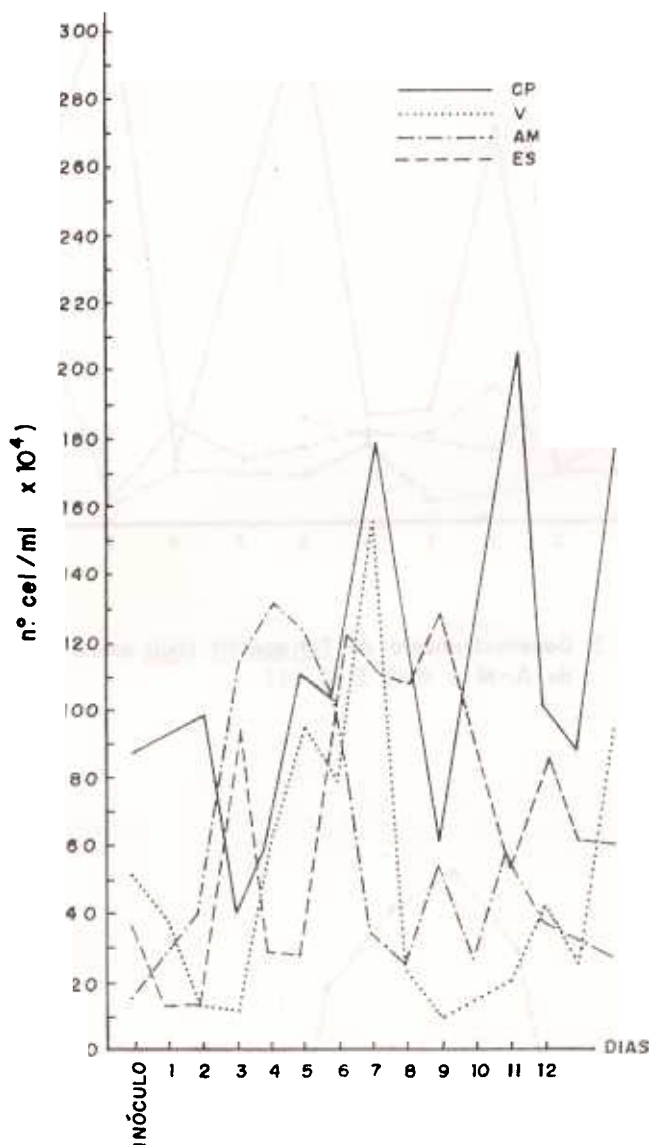


FIG. 6 Desenvolvimento de Tetraselmis chuii, nos diferentes meios de cultura utilizados.



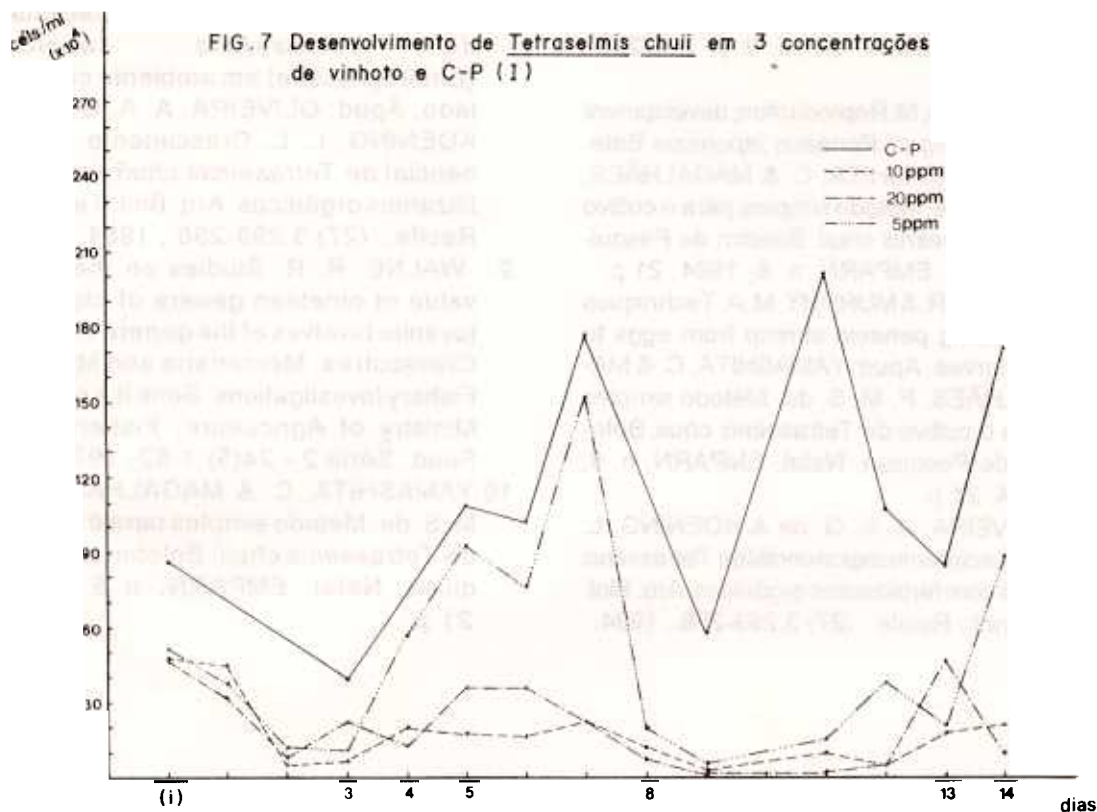
CONCLUSÕES

1 - O melhor resultado alcançado foi com o meio de caldo de peixe, sendo considerada sua concentração ideal 5 ppm;

2 - A água de matadouro na concentração de 50 ppm apresentou densidade máxima de 122×10^4 cel/ml. Nas concentra-

ções de 100 e 150 ppm, não apresentou crescimento tão satisfatório;

3- Das considerações testadas com vinhoto, como fertilizante dos meios de cultura, a que apresentou melhor resultado foi a de 5 ppm, com 158×10^4 cel/ml de densidade celular no primeiro bioensaio. Em concentra-



ções superiores a densidade celular diminuía à medida que a concentração do meio aumentava;

4 - Não evidenciou-se grandes diferenças entre o meio Erd-Schreiber (meio controle) e os meios fertilizados com água de matadouro (50 ppm) e com vinhoto (5 ppm), não existindo diferenças entre os dois últimos entre si. Entretanto, mostrou-se diferentes o meio de caldo de peixe com os meios anteriormente referidos, nas concentrações de 50 ppm para água de matadouro e 5 ppm para vinhoto, e

5 - Os bons resultados alcançados nas concentrações consideradas ideais para cada um dos meios em estudo revelam a possibilidade de serem utilizados em larga escala, substituindo parcial ou totalmente os meios de cultura convencionais, reduzindo-se assim os custos de produção do organismo a ser cultivado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARTOLOMEU, C. C. et alii. Emprego de água de matadouro no cultivo da microalga *Tetraselmis tetraathele*. In: 41ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA. Anais. Fortaleza, 1989.
2. COOK, H. L. & MURPHY, M. A. Rearing penaeid shrimp from eggs to post-larvae. Apud: YAMASHITA, C. & MAGALHÃES, P. M. S. de. Método simples para o cultivo de *Tetraselmis chuii*. Boletim de Pesquisa. Natal. EMPARN, n. 8, 1984. 21 p.
3. GOMES, L. A. de O. Cultivo de crustáceo e moluscos. São Paulo, Nobel, 1986. 226 p.
4. GRIFFITH, G. W. et alii. A mass culture method for *Tetraselmis* sp: a promising food larval crustaceans. Apud: OLIVEIRA, A. A. G. de & KOENING, M. L. Crescimento exponencial de *Tetraselmis chuii* com fertilizantes orgânicos. Arq. Biol. Tecnol.,

- Recife, Univ. Fed. Pernambuco. Dep. Oceanografia, v. 27, n. 3 p. 293-298., 1973.
5. HUDINAGA, M. Reproduction, development and rearing of *Penaeus japonicus* Bate. Apud: YAMASHITA, C. & MAGALHÃES, P. M. S. de. Método simples para o cultivo de *Tetraselmis chuii*. Boletim de Pesquisa. Natal. EMPARN, n. 8, 1984. 21 p.
 6. MOCK, C. R. & MURPHY, M. A. Techniques for raising penaeid shrimp from eggs to postlarvae. Apud: YAMASHITA, C. & MAGALHÃES, P. M. S. de. Método simples para o cultivo de *Tetraselmis chuii*. Boletim de Pesquisa. Natal. EMPARN, n. 8, 1984. 21 p.
 7. OLIVEIRA, A. A. G. de & KOENING, L. L. Crescimento exponencial de *Tetraselmis chuii* com fertilizantes orgânicos. Arq. Biol. Tecnol., Recife, (27) 3:293-298., 1984.
 8. PADIL, M. G. Crescimento poblacional de *Tetraselmis suecica* (Chlorophyceae) em ambiente controlado. Apud: OLIVEIRA, A. A. G. de & KOENING, L. L. Crescimento exponencial de *Tetraselmis chuii* com fertilizantes orgânicos. Arq. Biol. Tecnol., Recife, (27) 3:293-298., 1984.
 9. WALNE, R. R. Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. Fishery Investigations. Serie II, London, Ministry of Agriculture, Fishery and Food, Série 2 - 24(5):1-62, 1970.
 10. YAMASHITA, C. & MAGALHÃES, P. M. S. de. Método simples para o cultivo de *Tetraselmis chuii*. Boletim de Pesquisa. Natal. EMPARN, n. 8, 1984. 21 p.