

CULTIVO DE *Chlorella ellipsoidea* S-1 EM SACOS PLÁSTICOS

(Culture of *Chlorella ellipsoidea* S-1 in plastic bags)

Shitiro TANJI (1)
Motoi MISHIMA (1)
Roberval POZZI (2)

RESUMO

Foi realizado em laboratório, cultivo de *Chlorella ellipsoidea* S-1 em sacos transparentes de polietileno, com aeração contínua de 1 litro de ar por minuto em cada saco, sob iluminação permanente de aproximadamente 4.000 lux. Observou-se que é possível realizar cultivo massivo de *Chlorella ellipsoidea* S-1 em sacos plásticos transparentes, chegando a produzir no 5º dia, média de $14,5 \times 10^5$ células/ml, com melhor média de produção no período entre 3º e o 5º dias. Foram realizadas 2 séries de cultivos com densidades iniciais de 10^5 células/ml e 10^6 células/ml. Essa diferença na densidade inicial não acarreta diferença na produção total das células após 4º dia de cultivo. Cultivo de menor densidade inicial (10^5 células/ml), apresentou melhor índice de crescimento específico ($\mu = 2,2$).

ABSTRACT

Chlorella ellipsoidea S-1 was cultivated in transparent polyethylene bags with continuous aeration of 1 liter of air per minute for each bag, under permanent illumination of approximately 4.000 lux, at laboratory. At the 5th day a total of 14,5 millions of cells/ml was obtained. The best average production was between the 3th and 5th days. The initial density of 10^5 cells/ml or 10^6 cells/ml had no influence in the total quantity of cells after the 4th day. Cultures of smaller initial density (10^5 cells/ml) had shown a better specific growth rate ($\mu = 2,2$).

1. INTRODUÇÃO

Em vários centros experimentais de cultivo de fitoplâncton, tem sido demonstrado que é possível desenvolver, em grande escala, uma cultura massiva de *Chlorella* para uso alimentar (ROUND, 1973).

Em muitas áreas superpovoadas do mundo, *Chlorella* é considerada um importante suplemento alimentar para o consumo humano e animal (Witch, 1960 e Spoehr, 1953, apud UKELES, 1965).

Além de seu uso como alimento, esta alga unicelular é capaz de fornecer um produto bactericida denominado chlorellin (ROUND, 1973) e, pela sua capacidade de sintetizar cobalaminas em meio deficiente em B_{12} , pode ser uma importante fonte dessa vitamina na água doce (PROVASOLI, 1958).

O gênero *Chlorella* é muito empregado na alimentação de organismos zooplanctônicos cultivados para nutrição de animais

aquáticos em sua fase larval (FUKUCHO, et alii, 1976).

Segundo SASSAKI (1978), a eficiência energética do zooplâncton como alimento vivo é determinada pela qualidade da sua própria alimentação. Este autor considera *Chlorella* como um alimento de alto valor energético para a nutrição de zooplâncton.

LOOSANOFF (1951) afirma ser possível manter um cultivo massivo de *Chlorella* em tanques com densidades entre 25 e 30 milhões de células por ml, podendo-se alçar até 45 milhões de células por ml.

SASSAKI (1978) conseguiu produzir 48 milhões de células de *Chlorella ellipsoidea* S-1 por ml no 5º dia de crescimento, em balões de vidro com 5% de meio de cultura.

O cultivo foi desenvolvido sob condi-

(1) Biologistas - Seção de Biologia Pesqueira - Divisão de Pesca Marítima - Instituto de Pesca.

(2) Biologista - Seção de Microbiologia e Bioquímica - Divisão de Pesca Marítima - Instituto de Pesca.

ções ótimas de temperatura, Ph e luminosidade.

Davis et alii, apud BURLEW (1964), realizaram um estudo experimental de cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* em tubo plástico (Tygon) de 8 mm de diâmetro interno e 40 pés (aproximadamente 12 metros) de comprimento, disposto em espiral e com capacidade para 1 litro de meio de cultura. O cultivo foi realizado em condições muito especiais de laboratório: a cultura foi mantida em movimento constante no tubo, com auxílio de uma bomba, esfriamento, 5% de CO₂, 95% de ar e remoção periódica de depósito de células mortas. Nessas condições, conseguiram 500 milhões de células por ml no 5^o dia de crescimento, e aproximadamente 13 x 10⁸ de células por ml no 21^o dia. Assim, os autores acima consideraram satisfatório o crescimento da *Chlorella pyrenoidosa* em tubo plástico.

No Instituto Central de Investigações sobre Pesca Continental de Barrackpore, na Índia, desenvolveu-se um cultivo massivo de *Chlorella* sp. em bolsas transparentes de polietileno, utilizando-se fertilizantes N.P.K. como meio de cultivo. O cultivo foi desenvolvido em ambiente natural com uma produção de 2 a 3 milhões de células por ml, após 3 a 7 dias de cultivo (GOPA-LAKRISHNAN, 1974).

O presente trabalho teve como propósito realizar em laboratório um cultivo massivo de *Chlorella* em saco transparente de polietileno sob condições artificiais de iluminação, agitação e aeração. A opção pelo uso do saco de polietileno deveu-se pelo seu fácil manuseio durante o cultivo, armazenamento e transporte de cultivo no próprio saco, além de ser material resistente e de baixo custo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A espécie de *Chlorella* utilizada para a realização deste trabalho foi *Chlorella ellipsoidea* S-1, a mesma utilizada por SASSAKI (1978) em seu estudo preliminar de cultivo para o "Projeto de Cultivo do Pitú", realizado em Colatina (ES) pelo Projeto de Desenvolvimento Pesqueiro (P.D.P.).

O meio de cultivo enriquecido foi o de Myer's 4N com pequenas alterações na quantidade de alguns dos elementos que compõem o meio.

A composição do meio utilizado é:

KNO ₃	5,0g
KH ₂ PO ₄	0,25g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,25g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	5,0mg
Na ₂ EDTA	0,3mg
Arnon'S A ₅	1 ml
H ₂ O destilada	1000ml

O pH do meio foi de 6,5, utilizando-se KOH (10%) e H₂ SO₄ (5%) para o seu controle.

O saco plástico utilizado para o cultivo foi de polietileno branco e transparente, de 50 x 20 cm, com a capacidade para 5 litros.

Para obter maior resistência, o saco plástico foi duplicado, colocando-se um dentro do outro. Foram preparados 6 sacos plásticos duplos com três litros de meio Myer's 4 N modificado em cada um deles, sendo três com densidade inicial de 10⁵ células/ml (sacos números 1,2 e 3) e três de 10⁶ células/ml (sacos números 4,5 e 6).

A boca de cada saco plástico foi amarrada com um cordonel ao redor de uma rolha de borracha de 5 cm de diâmetro e 3 cm de espessura (FIGURA 1), transpassada por duas mangueiras plásticas com 3/16" de diâmetro, uma com 50 cm de comprimento e outras com 20 cm (FIGURA 2).

A extremidade inferior da mangueira de aeração (a mais comprida), foi ajustada no fundo do saco plástico para proporcionar melhor agitação do meio e consequentemente melhor aeração. A extremidade inferior da mangueira menor guardou

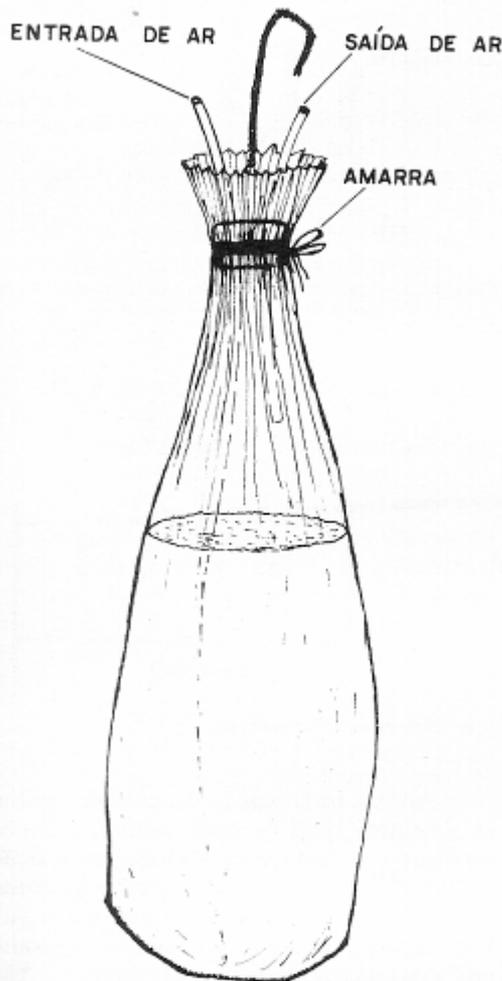


FIGURA 1 – Saco de polietileno transparente, com o meio Myer's preparado para cultivo.

uma distância de 5 a 7 cm da sua superfície, para evitar o contato com o meio líquido.

Preferiu-se utilizar tubos de plástico ao invés de tubos de vidro, pois estes últimos além de quebrarem com facilidade, freqüentemente provocam furos no sacos plástico.

Tomou-se o cuidado de ajustar a "amarra" no sulco feito ao redor da rolha (FIGURA 2).

Os cultivos preparados foram "pendurados" em canos de metal, fixos em es-

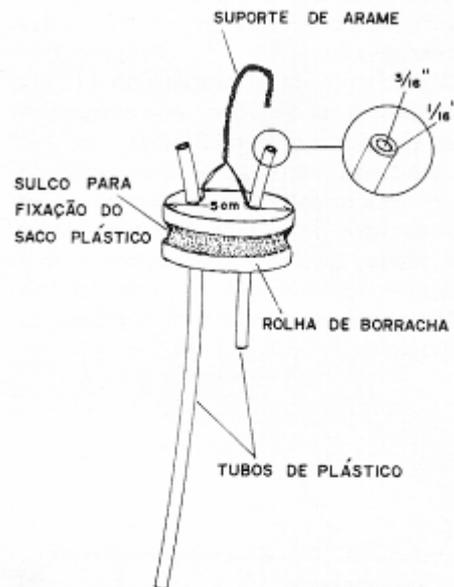


FIGURA 2 – Detalhes de montagem dos acessórios na rolha de borracha.

tantes de madeira, de forma que a parte inferior (fundo) dos sacos permanecesse levemente apoiado no tablado inferior da estante (FIGURA 3).

Para sustentar o saco plástico durante o cultivo, usou-se arame comum, fixado na rolha de borracha. A aeração da cultura foi feita por um compressor de ar com capacidade para 300 libras, fazendo-se passar um litro de ar por minuto em cada saco plástico (FIGURA 4). Foi colocado um filtro de ar de algodão para evitar possível passagem de corpos estranhos à cultura de *Chlorella* (FIGURAS 4 e 5).

As culturas receberam iluminação contínua de aproximadamente 4000 lux durante todo o período, uma vez que o trabalho foi desenvolvido em laboratório fechado. As lâmpadas do tipo fluorescente foram colocadas ao lado dos sacos plásticos, conforme demonstrado na FIGURA 3.

A temperatura do meio de cultivo oscilou de 26 a 29°C.

Foram efetuadas diariamente, no mesmo período do dia, 4 contagens de células de cada saco, utilizando-se a câmara (hemocitômetro) de Thoma, para observação do crescimento das culturas.

O número de células de *Chlorella* por ml foi calculado pela média aritmética destas 4 contagens.

O cultivo foi interrompido no 11º dia de trabalho, uma vez que, nos ensaios de cultivo anteriormente realizados com 300 sacos plásticos, verificou-se que nesse período o crescimento das células já se encontra na fase de rápido declínio. Observou-se, ainda, que após este período, algumas células de *Chlorella* se precipitam com ocorrência cada vez maior de contaminantes biológicos.

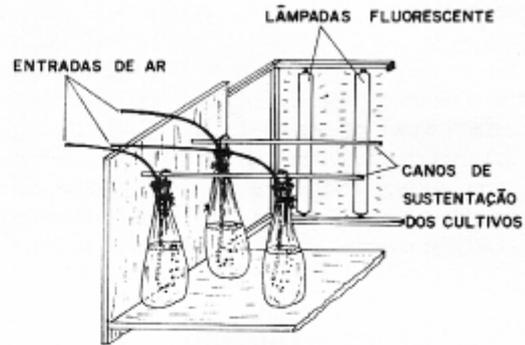


FIGURA 3 – Quadro demonstrativo de montagem da estante de madeira para cultivo.

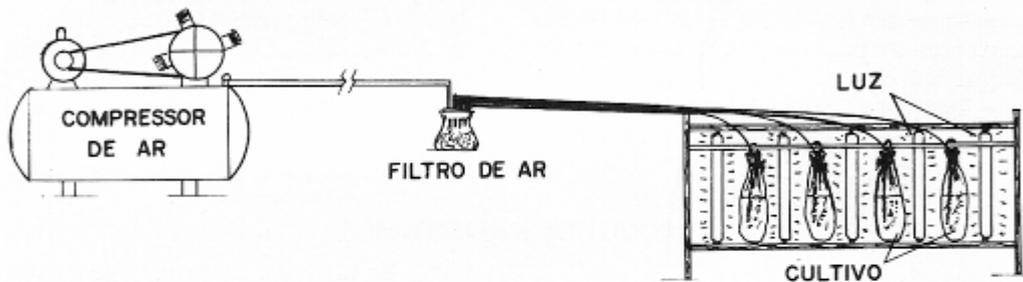


FIGURA 4 – Quadro esquemático do conjunto de compressor de ar, filtro de algodão e cultivos.

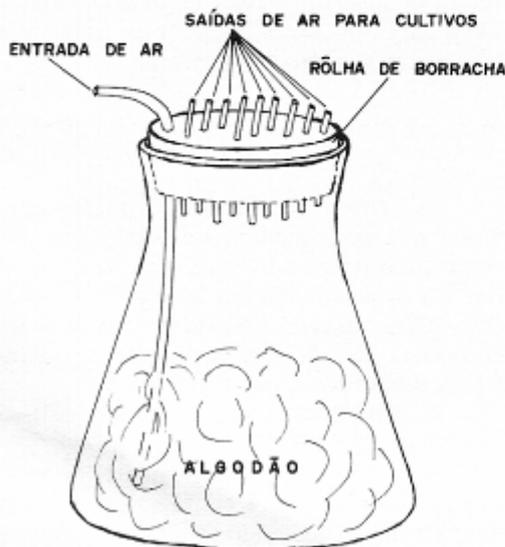


FIGURA 5 – Filtro de ar.

Após a interrupção do cultivo, mediu-se o volume total de cada cultivo, a fim de verificar a diferença de volume em relação ao início do cultivo. Esta diferença, causada pela evaporação do meio durante o cultivo, acarreta um erro no cálculo da produção total das células de cada cultivo se não for corrigida.

Para a correção do total de células no final de cada contagem diária do cultivo para os 3 litros iniciais de meio, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$N' = N \left(1 - \frac{C}{V} \cdot \frac{t}{T} \right) \text{ onde,}$$

- N' = número de células corrigido
- N = número de células realmente contadas
- t = tempo (dias)
- C = volume do meio evaporado
- V = volume da cultura de cada saco (inicial)
- T = duração do experimento

Para o cálculo do índice de crescimento específico diário (specific growth rate) das células utilizou-se a fórmula:

$$\mu t = \ln N_t' - \ln N_{t-1}' \text{ onde,}$$

N_t' = número de células corrigido do dia t.

N_{t-1}' = número de células corrigido do dia anterior.

μt = índice de crescimento específico do dia t.

A fórmula utilizada para o cálculo do rendimento médio diário das células foi:

$$\bar{R}_t = \frac{N_t}{t} \text{ onde,}$$

\bar{R}_t = rendimento médio diário até o dia t.

N_t = número de células corrigido do dia t.

t = tempo (dias)

Após a interrupção dos cultivos, os mesmos foram conservados em geladeira a +5°C e em freezer a -15°C, acondicionados no próprio saco plástico, amarrando-se simplesmente a boca com cordonel. (FIGURA 6).

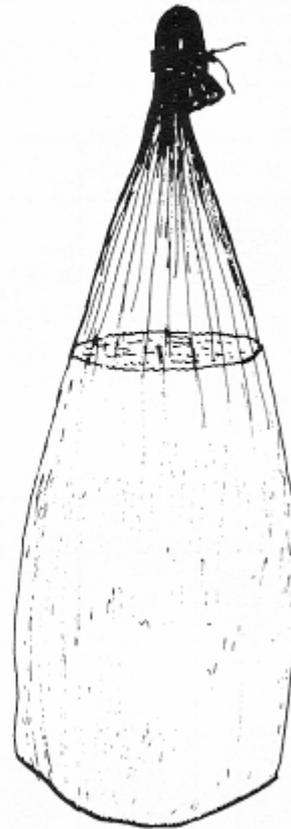


FIGURA 6 - Cultivo preparado para conservação em geladeira ou freezer.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos cultivos de *Chlorella ellipsoidea* S-1 em sacos plásticos, encontram-se na TABELA 1 e FIGURA 7.

A maior produção de células no 11º dia de cultivo foi de $27,7 \times 10^6$ células/ml, verificado no cultivo n.º 2 (TABELA 1) sendo de $19,5 \times 10^6$ células/ml a média nos 6 sacos plásticos. Estes números correspondem à quantidade de células após a correção da densidade.

Nos cultivos de densidade inicial de 10^5 células/ml, o índice de crescimento específico (μ) foi mais alto no segundo dia, com uma média de $\mu = 2,21$. Nos cultivos de densidade inicial de 10^6 células/ml o valor de μ mais alto foi de 1,46, também, no segundo dia de crescimento.

Verificou-se que a fase exponencial

de crescimento (FOGG, 1971) das células em todos os cultivos ocorreu a partir do 2º dia até a concentração de 6×10^6 células/ml (FIGURA 7).

A média de rendimento diário (\bar{R}) nos outros cultivos atingiu valor máximo entre o terceiro e o quinto dia de crescimento.

O melhor rendimento verificou-se no cultivo número 2, tendo o valor $\bar{R} = 4,1 \times 10^6$ células/ml no quinto dia.

Os cultivos de densidade iniciais de 10^5 e 10^6 células/ml passaram a produzir praticamente a mesma quantidade de células a partir do quarto dia de crescimento.

Observou-se que o pico de média de rendimento diário das células foi entre o terceiro e o quinto dia de crescimento, período que se considera ideal para inter-

TABELA 1

Dados obtidos e calculados do cultivo de *Chlorella ellipsoidea* S-1 no período de 11 dias realizados nos 6 sacos. Do saco nº 1 a 3 com densidade inicial de 10^5 cels/ml e do 4 a 6 10^6 cels/ml.

N = número de células/ml; N' = número de células/ml corrigido; μ = índice de crescimento e R = rendimento médio diário das células.

SACO Nº 1.					SACO Nº 4.				
Dias	N x 10 ⁶	N' x 10 ⁶	μ	\bar{R} x 10 ⁶	Dias	N x 10 ⁶	N' x 10 ⁶	μ	\bar{R} x 10 ⁶
0	0,10	—	—	—	0	1,00	—	—	—
1	0,14	0,14	0,34	0,04	1	1,32	1,31	0,27	0,31
2	1,39	1,34	2,25	0,62	2	6,44	6,27	1,57	2,63
3	5,40	5,12	1,34	1,67	3	8,25	7,93	0,23	0,31
4	6,80	6,33	0,21	1,56	4	9,34	8,85	0,11	1,96
5	7,36	6,73	0,06	1,33	5	15,48	14,47	0,49	2,69
6	8,89	7,98	0,17	1,31	6	13,72	12,64	-0,13	1,94
7	13,28	11,69	0,38	1,66	7	14,30	12,99	0,03	1,71
8	11,67	10,07	-0,15	1,25	8	17,58	15,74	0,19	1,84
9	15,45	13,07	0,26	1,44	9	15,50	13,67	-0,14	1,41
10	18,64	15,44	0,17	1,53	10	18,87	16,40	0,18	1,54
11	18,04	14,64	-0,05	1,32	11	17,58	15,05	-0,09	1,28
SACO Nº 2.					SACO Nº 5.				
0	0,10	—	—	—	0	1,00	—	—	—
1	0,13	0,12	0,21	0,02	1	1,46	1,44	0,36	0,44
2	1,08	1,05	2,14	0,47	2	6,04	5,86	1,40	2,43
3	5,72	5,48	1,65	1,79	3	10,04	9,58	0,49	2,86
4	14,88	14,03	0,98	3,48	4	12,64	11,87	0,21	2,72
5	22,28	20,69	0,39	4,12	5	16,20	14,97	0,23	2,79
6	24,56	22,46	0,08	3,73	6	19,37	17,60	0,16	2,77
7	29,60	26,64	0,17	3,79	7	18,57	16,59	-0,06	2,23
8	27,73	24,56	-0,08	3,06	8	23,73	20,84	0,23	2,48
9	29,14	25,39	0,03	2,82	9	22,25	19,20	-0,08	2,02
10	30,15	25,84	-0,02	2,57	10	19,75	16,74	-0,14	1,57
11	32,93	27,76	0,07	2,51	11	24,16	20,11	0,18	1,74
SACO Nº 3.					SACO Nº 6.				
0	0,10	—	—	—	0	1,00	—	—	—
1	0,13	0,13	0,22	0,03	1	1,64	1,61	0,47	0,61
2	1,22	1,19	2,25	0,54	2	6,78	6,53	1,40	2,77
3	7,21	6,90	1,76	2,27	3	12,74	12,04	0,61	3,68
4	13,52	12,75	0,61	3,16	4	17,26	15,99	0,28	3,75
5	15,06	13,98	0,09	2,78	5	17,60	15,99	0,0	3,00
6	16,28	14,89	0,06	2,46	6	16,18	14,40	-0,10	2,23
7	17,04	15,34	0,03	2,18	7	20,29	17,69	0,21	2,38
8	14,81	13,12	-0,16	1,63	8	24,20	20,65	0,15	2,46
9	17,52	15,27	0,15	1,69	9	22,25	18,58	-0,11	1,91
10	18,43	15,80	0,03	1,57	10	20,77	16,96	-0,09	1,60
11	24,52	20,67	0,27	1,87	11	23,84	19,03	0,12	1,64
MÉDIA DE Nº 1 a Nº 3					MÉDIA DE Nº 4 a Nº 6				
0		0,10	—	—	0		1,00	—	—
1		0,13	0,26	0,03	1		1,45	0,37	0,45
2		1,19	2,21	0,55	2		6,22	1,46	2,61
3		5,83	1,59	1,91	3		9,85	0,46	2,95
4		11,04	0,64	2,73	4		12,24	0,22	2,81
5		13,80	0,22	2,74	5		15,14	0,21	2,83
6		15,11	0,09	2,50	6		14,88	-0,02	2,31
7		17,89	0,17	2,54	7		15,76	0,06	2,11
8		15,92	-0,12	1,98	8		19,08	0,19	2,26
9		17,91	0,12	1,98	9		17,15	-0,11	1,79
10		19,03	0,06	1,89	10		16,70	-0,03	1,57
11		21,02	0,10	1,90	11		18,06	0,08	1,55

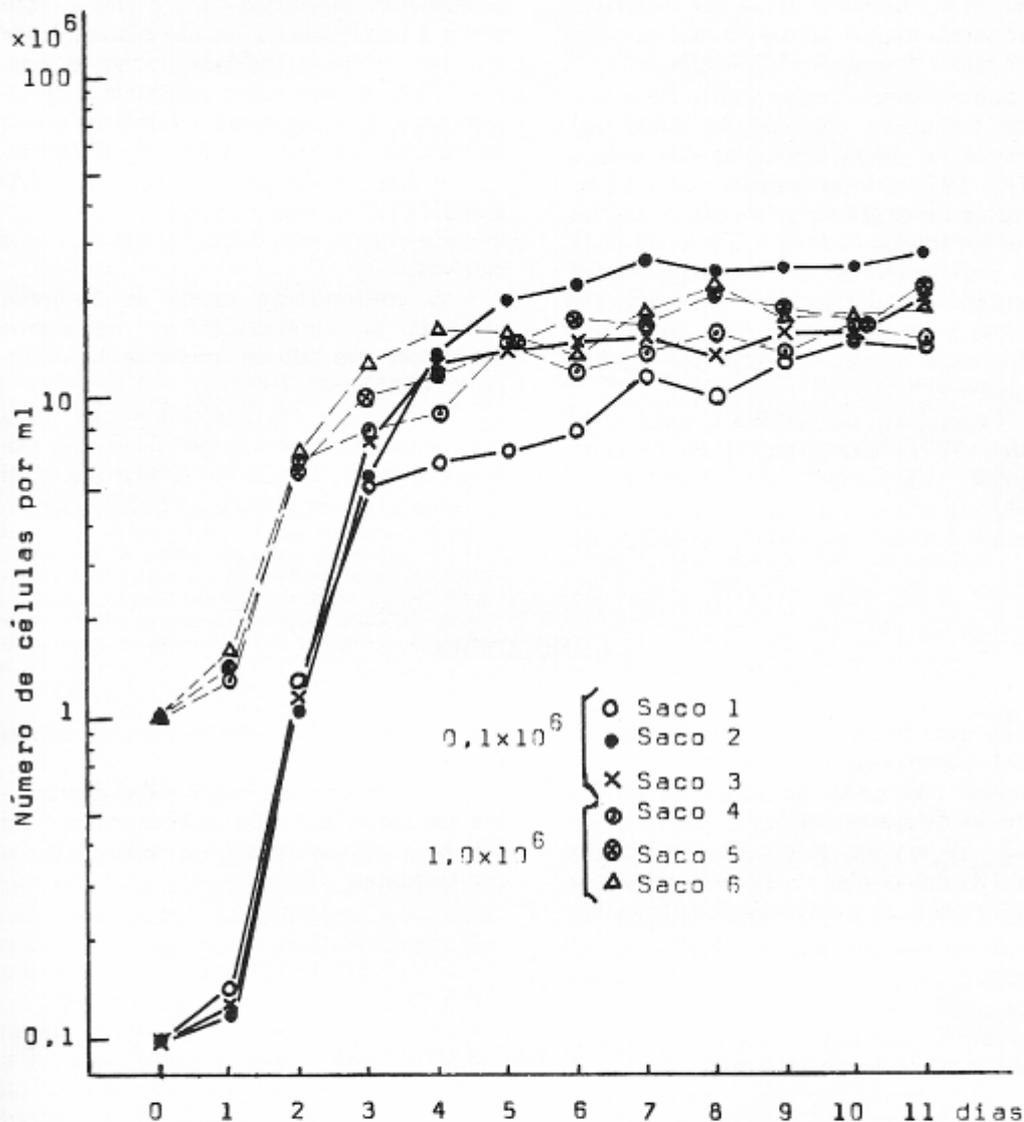


FIGURA 7 - Curvas de crescimento de *Chlorella ellipsoidea* S-1 nos três sacos plásticos com concentração de 10⁵ cels/ml e outros três com concentração inicial de 10⁶ cels/ml.

rupção do cultivo, uma vez que a multiplicação das células nos dias subsequentes se torna mais lenta (TABELA 1).

Comparando-se resultados obtidos por vários pesquisadores, verifica-se que os apresentados aqui demonstram viabilidade deste método para *Chlorella*, acreditando-se que seja possível desenvolver culturas massivas de outros fitoplanctontes com a utilização deste método, podendo-se variar evidentemente, o volume do meio e tamanho do saco plástico.

Como pode ser verificado ainda na FIGURA 7, observou-se que, tanto nos cultivos de densidade inicial de 10⁵ células/ml como nos de 10⁶ células/ml, a fase de retardamento (lag fase) foi de apenas um dia, demonstrando que as condições oferecidas por este método podem ser consideradas satisfatórias.

O fato de os cultivos de menor densidade inicial (10⁵ células/ml) terem alcançado maior índice de crescimento específico ($\mu = 2,2$), pode ser atribuído à maior pene-

tração da luz nesses cultivos, em decorrência de serem menos turvos do que os cultivos de maior densidade (10^6 células/ml).

Sabe-se que o maior índice de crescimento específico corresponde à fase exponencial de desenvolvimento das células (FOGG, 1971); dessa maneira quando é interessante obter grande produção de células em menor espaço de tempo, a solução pode ser o prolongamento da fase exponencial, aumentando gradativamente a intensidade luminosa à medida que o meio vai se tornando mais denso, dentro dos limites permissíveis.

Nielsen et alii, (1962), apud TAKECHI, 1971) citam que a clorofila de *Chlorella* desaparece por completo a 50.000 lux e a uma temperatura de 25°C. Segundo TAKECHI (1971), o índice de

crescimento específico (μ) é alto quanto maior a incidência da luz nas células, desde que não atinja intensidade nociva às mesmas. Esse mesmo autor considera desinteressante utilizar intensidade luminosa acima de 10.000 lux para o cultivo de *Chlorella*.

Ainda conforme afirmação de TAKECHI (1971), essa produção pode ser melhorada com a introdução de gás CO₂ nos cultivos.

A concentração média de *Chlorella* utilizada na alimentação de organismos aquáticos, tem sido em torno de 10^7 células/ml (SASSAKI, 1978).

O método ora descrito atingiu uma concentração de $14,5 \times 10^6$ células/ml, podendo-se assim considerar satisfatória, com a vantagem de ser prático e de baixo custo.

5. CONCLUSÕES

1 – Nos cultivos de *Chlorella ellipsoidea* S-1 a densidade inicial entre 10^5 e 10^6 células/ml não influi na produção após o quarto dia de crescimento.

2 – A melhor média de rendimento diário (\bar{R}) das células verificou-se no período do terceiro ao quinto dia de cultivo. No

quinto dia, a média do número de células foi de $14,5 \times 10^6$ /ml.

3 – Observou-se que é viável desenvolver em laboratório um cultivo massivo de *Chlorella ellipsoidea* S-1 em sacos plásticos transparentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DAVIS, E. A. et alii 1964 Laboratory experiments on *Chlorella* culture at the Carnegie Institution of Washington Department of plant biology. In: BURLEW, J. S., *Algal culture: from laboratory to pilot plant*. Washington, D. C., Carnegie Institution of Washington Publications. part 3: Growth of algae in mass culture. cap. 9, p. 105-53.
- FOOD, G. E. 1971 *Algal cultures and phytoplankton ecology*. Madison, University of Wisconsin Press. 126p.
- FUKUSHO, K.; HARA, O.; YOSHIO, J. 1976 Mass production of the rotifer, *Brachiorus plicatilis*, by feeding *Chlorella* sp. and yeast using large-scale outdoor tanks. *The Aquiculture*, 24 (3): 96-101. Original japonês.
- GOPALAKRISHNAN, V. 1974 Cultivo massivo de *Chlorella*. *Boletim de acuicultura de la FAO*, 6(2/3):6-7. en/abr.
- LOOSANOFF, V. L. 1951 Culturing phytoplankton on large scale. *Ecology*, 32(4):748-50.
- PROVASOLI, L. 1958 Nutrition and ecology of protozoa and algae. *Annual Rev. Microbiol.*, 12: 279-308.
- ROUND, F. E. 1973 Economic aspects. In: *The biology of the algae*. 2. ed. London, Edward Arnold, cap. 12, p. 216-30.
- SASSAKI, I. 1978 Cultivo de zooplankton como alimento inicial na criação de animais aquáticos. *Relatório do Projeto Pitú/PDP*, Colatina, E. S. 24p.
- TAKECHE, Y. 1971 *Chlorella: estudo básico e sua utilização*. Tokyo, Gakuchu-Konkycha. 432p. Original japonês.
- UKELES, R. 1973 A simple method for the mass culture of marine algae. *Limnology and Oceanography*, 10 (3): 492-5.