

CULTIVO EM LARGA ESCALA DE ORGANISMOS PLANCTÔNICOS
PARA ALIMENTAÇÃO DE LARVAS E
ALEVINOS DE PEIXES: I - ALGAS CLOROFÍCEAS.

LÚCIA HELENA SIPAÚBA-TAVARES¹
ODETE ROCHA²

1. Laboratório de Limnologia - Centro de Aqüicultura FCAVJ - UNESP - JABOTICABAL
- S.P. 14870-000

2. Laboratório de Limnologia - Depto Ecologia e Biologia Evolutiva - UFSCar - São
Carlos - SP 13560-000

RESUMO

Três espécies de algas clorofíceas (*Ankistrodesmus gracilis*, *Scenedesmus bijugus* e *Chlamydomonas sp.*) foram cultivadas em larga escala tanto no meio CHU₁₂ quanto em um meio alternativo de baixo custo, o adubo NPK. Os resultados indicam que as três espécies exibem, quando cultivadas em CHU₁₂, taxas de crescimento muito semelhantes entre si. Já no meio NPK, as três espécies apresentaram taxas de crescimento de *A. gracilis* foi muito mais elevado que o das outras espécies. Com relação ao rendimento, as respostas foram muito semelhantes para *A. gracilis* e *S. bijugus* (2,30 e 2,20 X 10⁶ células/ml, respectivamente), quando cultivadas em meio NPK; com o uso do meio padrão CHU₁₂, foi constatada alguma diferença (1,40 e 1,15 X 10⁶ células/ml, respectivamente). *Chlamydomonas sp.* apresentou menor resposta de crescimento no meio CHU₁₂ e NPK.

UNITERMOS: Algas Clorofíceas, Curva de Crescimento, Teor de Carbono, Aqüicultura

Abstract

Three species of chlorophycean algae (*Ankistrodesmus gracilis*, *Scenedesmus bijugus* and *Chlamydomonas sp.*) were cultured at large quantity in both CHU₁₂ nutrient medium and in a less expensive alternative medium, the NPK fertilizer. The results indicated that the growth curve was very similar for all three species when cultured in a CHU₁₂ medium; on the other hand, growing performance at NPK medium fertilizer was very different and *A. gracilis* and *S. bijugus* (2.30 and 2.20×10^6 cells/ml, respectively) were very similar when using NPK medium fertilizer and different when using CHU nutrient medium (1.40 and 1.15×10^6 cells/ml, respectively). *Chlamydomonas sp.* exhibited a smaller growth response in both CHU₁₂ and NPK nutrient medium.

KEY WORDS: Chlorophycean, Growth Curve, Carbon Content, Aquaculture

Introdução

Recentemente tem-se registrado um interesse crescente na manipulação da dinâmica das populações de alguns corpos de água, visando uma maximização na produtividade biológica (May, 1972). Investigações experimentais em tais sistemas utilizam espécies planctônicas, das quais grandes populações podem ser mantidas em condições controladas, por diversas gerações (Bazin *et al.*, 1974).

Uma pequena fração da energia radiante incidente sobre um lago é convertida pelo fitoplâncton em energia química na forma de matéria orgânica. Parte desta energia será transferida para os organismos zooplanctontes, chamados consumidores primários ou herbívoros. A partir daí, direta ou indiretamente via consumidores secundários, ela poderá fluir para os pequenos peixes e finalmente para os grandes predadores. Ambos, produtores primários (algas) e consumidores primários, podem ser utilizados diretamente como alimento pelos peixes planctófagos.

O papel das algas na nutrição das larvas e alevinos de peixes tem sido investigados em trabalhos experimentais, os quais têm fornecido importantes informações relativas aos aspectos qualitativo e quantitativo da alimentação (Sipaúba-Tavares, 1988).

Apesar de diversas tentativas para o desenvolvimento da aquicultura no Brasil, pode-se dizer que ainda não fez nenhuma contribuição significativa para atender as necessidades proteicas da população. Uma das razões é provavelmente a falta de uma tecnologia adequada que permita uma produção de grande porte a baixo custo. Geralmente, peixes são cultivados e alimentados com rações artificiais ao invés do alimento natural.

A necessidade de alimento natural pode ser resolvida pelo cultivo de fitoplâncton e zooplâncton em instalações especiais designadas para este propósito (Lirski *et al.*, 1979).

Cultivo de Organismos Planctônicos

A produção de fitoplâncton tem sido realizada em diversas estações de piscicultura do país pela adição de fertilizantes ou adubo orgânico em tanques, a fim de estimular o desenvolvimento do plâncton (Silva *et al.*, 1984; Grieko-Reis *et al.*, 1986). No entanto, esta técnica apresenta problemas, como por exemplo a limitação de luz. Após um florescimento inicial do fitoplâncton onde uma alta biomassa é atingida, segue-se um declínio na produção ocasionada pelo sombreamento nas camadas inferiores resultante da própria massa algal na superfície. Tal técnica provou ser inadequada, tanto para o cultivo em larga escala de algas, quanto para o cultivo de zooplâncton.

Estudos mais detalhados serão necessários para o desenvolvimento de uma metodologia específica que permita a instalação de monoculturas de algas e de zooplâncton.

Neste enfoque, são de extrema importância pesquisas que têm por objetivo desenvolver técnicas para o cultivo em massa de algas utilizadas na alimentação direta das larvas ou indiretamente, através da alimentação de diversas espécies de zooplâncton que, por sua vez, constituirão o alimento natural de peixes.

Este trabalho teve como objetivo testar a adequação de um meio de cultivo de baixo custo, adubo químico (NPK) e o meio padrão CHU₁₂ utilizado nos cultivos laboratoriais de clorofíceas de meios eutróficos.

Material e Métodos

Cultivo de Algas

As algas fornecidas como alimento nas culturas de zooplâncton foram cultivadas em erlenmeyer de 2 litros de capacidade, sob iluminação com lâmpada fluorescente, sob intensidade de 5200 lux no topo da cultura. Os inóculos destas espécies foram obtidos no Laboratório de Fisiologia de Algas do Departamento de Ciências Biológicas da UFSCar e pertencem ao Banco de Algas correspondendo às seguintes linhagens: 029CH *S. bijugus*, 009CH *Chlamydomonas sp.* e 005CH *A. gracilis*.

Dois meios de cultura, o CHU₁₂, apropriado para o crescimento vigoroso de espécies provenientes de ambientes eutróficos, e o adubo químico (N.P.K., 20:5:20) foram utilizados.

Cerca de 0,7 g de adubo foi adicionado para 2 litros de cultura. O meio CHU₁₂ foi preparado de acordo com Chu (1942). Todas as espécies foram cultivadas em ambos os meios, tendo-se determinado a curva de crescimento para cada espécie em cada meio.

O crescimento de uma cultura algal é geralmente expresso como aumento de biomassa, do número de células ou da concentração de clorofila por unidade tempo. No

presente trabalho o crescimento das culturas foi acompanhado determinando-se a variação no número de células ao longo do tempo, através da contagem em câmara Neubauer. Foram contados 64 quadros determinando-se o número médio por quadrado a partir do qual foi calculada a densidade por ml.

Caracterização Morfológica dos Organismos Cultivados

Comprimento Total

O valor médio de comprimento total foi estimado a partir da medida de 50 organismos vivos sob aumento de 400 vezes usando uma ocular micrométrica.

Biovolume

Os biovolumes foram calculados a partir das dimensões médias das células usando as formas geométricas mais apropriadas (Vollenweider, 1974; Bottrell et al., 1976; Ruttner-Kolisko, 1977).

As medidas foram feitas sob o microscópio com organismos adultos vivos e levemente narcotizados com água morna, para evitar a locomoção.

Para *Chlamydomonas sp.*, a célula com forma oval foi mensurada através da média entre uma esfera oblonga e uma prolata:

$$V = \frac{4/3 \cdot \pi \cdot a^2 \cdot b + 4/3 \cdot \pi \cdot a \cdot b^2}{2}$$

Para *A. gracilis*, célula alongada, empregou-se a fórmula para o cálculo do volume de um cone:

$$V = \frac{(\pi \cdot r^2 \cdot h)/3 \times 2}{2}$$

Para *S. bijugus* foi utilizada a fórmula para cálculo do volume de um cilindro.

$$V = \pi \cdot r^2 \cdot h$$

Análises Químicas dos Organismos Estudados

Clorofila *a*

A concentração da clorofila *a* nas diferentes espécies de algas foi determinada segundo o método descrito por Vollenweider (1974). Cerca de 10 ml de suspensão algal foi filtrada em filtro de fibra de vidro GFC (0,7 μm de tamanho de poro).

Extraiu-se a clorofila de cada amostra pela maceração mecânica do filtro, em almofariz, utilizando-se como solvente, acetona 90% a frio, sob baixa luminosidade. O extrato (10ml) foi centrifugado a 3.000 rpm por um período de 10 minutos e a absorbância do sobrenadante foi determinada em um espectrofotômetro Shimadzu UV-210 A, em diferentes comprimentos de onda: 630 nm, 645nm e 665 nm. Procedeu-se uma leitura adicional a 750 nm para correção de turbidez. Todas as leituras realizadas foram corrigidas pela subtração da densidade ótica neste comprimento de onda.

A concentração de clorofila *a* foi então calculada a partir da equação proposta por Parsons and Strickland (1963):

$$\text{Concentração de Clorofila } a \text{ em mg/ml} = Ca (v/V.l)$$

onde:

V = volume da suspensão algal filtrada para extração.

v = volume (ml) de acetona (90%) usada.

l = caminho da luz (em cm da cubeta).

$$Ca = 11,6 D_{665} - 1,31 D_{645} - 0,14 D_{630}$$

onde:

D_{665} , D_{645} e D_{630} = são as densidades óticas em 1 cm de caminho da luz no comprimento de onda de 665, 645 e 630 nm respectivamente.

Conhecendo-se a densidade por ml da suspensão algal, a quantidade de clorofila *a* por célula é calculada e normalmente expressa por picograma (10^{-12} g) por célula.

Peso Seco

O peso seco corresponde ao valor constante do peso do corpo totalmente desidratado. Este parâmetro foi calculado da seguinte forma para as espécies de algas.

Em relação às algas, o peso seco foi determinado retirando-se 10 ml de cada cultura, com uma densidade conhecida. Para *A. gracilis* esta foi de $14,4 \times 10^6$ células/ml, para *Chlamydomonas sp* de $0,9 \times 10^6$ células/ml e para *S. bijugus* de $22,9 \times 10^6$ células/ml. Estas amostras foram filtradas em filtro de fibra de vidro (GFC, $0,7 \mu\text{m}$ de tamanho de poro), previamente lavado em água destilada, sob vácuo. Posteriormente, o filtro foi seco a 60°C e submetido à pesagem, até peso constante.

O peso elemental expresso em termos de carbono orgânico total foi obtido através da relação entre conteúdo de carbono e volume celular proposta por ROCHA E DUNCAN (1985), para algas de água doce.

$$C = 0,1204 \cdot V^{1,051}$$

onde: C = conteúdo de carbono orgânico em pg/célula.
V = volume celular.

Conteúdo de Cinzas

Para determinação do conteúdo de cinzas das algas, o material foi incinerado em mufla a 500°C por 4 horas. O conteúdo de cinzas foi obtido pela diferença entre o peso do material depois de frio e o seco total, anteriormente determinado. O conteúdo de cinzas foi também expresso em pg/célula.

Resultados

Cultivos de Algas

As curvas de crescimento das três espécies de algas, cultivadas nos meios de cultura utilizados, são mostrados nas Figuras 1 e 2.

Pode-se observar que as três espécies de algas cresceram em ambos os meios utilizados, sendo que para as outras duas espécies estudadas (excetuando-se *Chlamydomonas sp*), o maior rendimento em termos de densidade numérica, foi obtido no meio com adubo químico. Com exceção de *S. bijugus*, as curvas de crescimento mostraram um pico em menor intervalo de tempo, quando as espécies foram cultivadas em meio com adubo químico, quando comparadas com as do meio CHU_{12} . Para *S. bijugus*, embora o crescimento tenha sido um pouco mais lento, o rendimento do obtido em cultura com adubo químico foi superior ao dobro daquele obtido com o meio CHU_{12} .

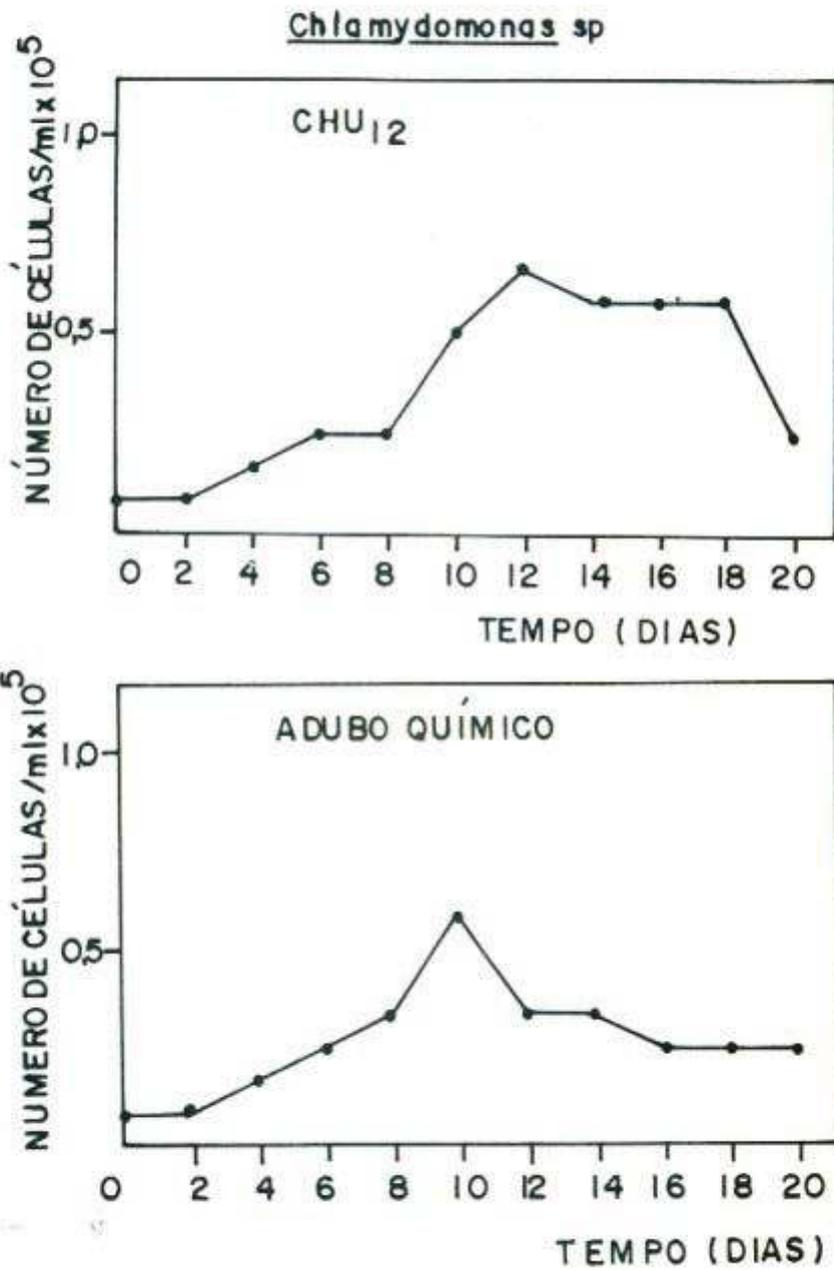


Figura 1. Curva de crescimento de *Chlamydomonas* sp nos meios de cultura CHU₁₂ e adubo químico.

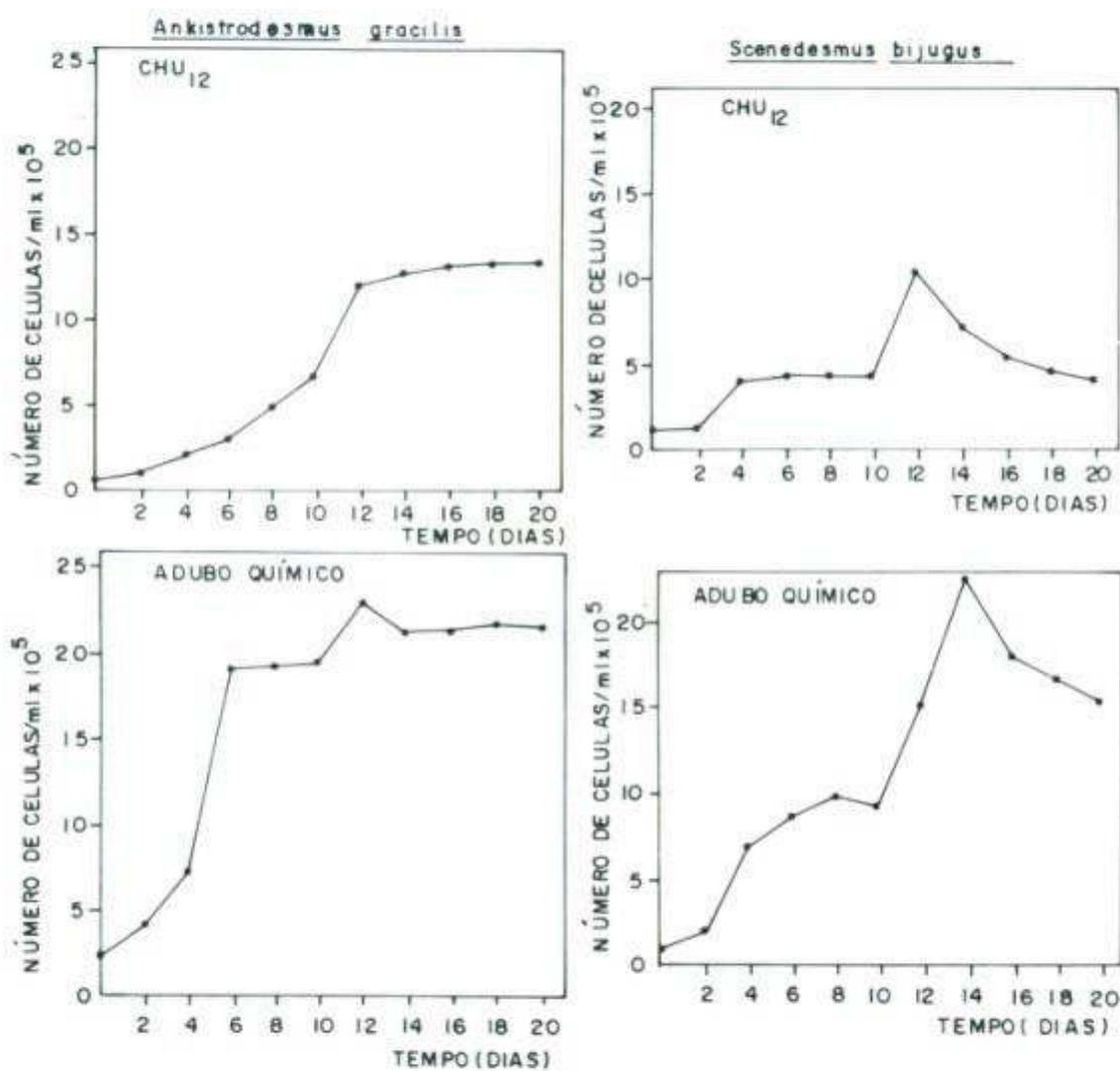


Figura 2 - Curva de crescimento de *A. gracilis* e *S. bijugus* nos meios de cultura CHU₁₂ e Adubo Químico.

Cultivo de Organismos Planctônicos

De maneira geral, pode-se dizer que o crescimento das três espécies foi adequado em ambos os meios, atingindo rendimento máximo entre o 10º e o 14º dia, no entanto, com exceção de *Chlamydomonas sp.*, o rendimento no meio de adubo químico foi superior ao do CHU₁₂.

Caracterização Morfológica e Química das Algas

Em termos da forma e dimensão das células, *Chlamydomonas sp.*, *A. gracilis* e *S. bijugus* são sensivelmente diferentes. O comprimento total em µm (micrometro) de *Chlamydomonas sp.* e *S. bijugus* é aproximadamente igual, o que ocorre com *A. gracilis*, cujo tamanho é cerca de 3 vezes maior que as outras algas, devido à sua forma alongada.

A tabela 1 apresenta os valores médios estimados de tamanho e volume para as diferentes espécies de algas.

Tabela 1 - Caracterização Morfológica de *Chlamydomonas sp.*, *A. gracilis*, *S. bijugus*.

Espécies	Forma	Número de organismo medidos	Tamanho Médio (µm)	Volume Médio (µm) ³
<i>Chlamydomonas sp.</i>		50	8,80	2616,62
<i>Ankistrodesmus gracilis</i>		50	23,80	90,00
<i>Scenedesmus bijugus</i>		50	7,50	124,60

Algumas características químicas das espécies de algas cultivadas foram examinadas para possíveis considerações sobre diferenças quanto ao valor nutricional. Os resultados das análises realizadas estão representadas na Tabela 2. Algumas diferenças entre as três espécies em relação à sua composição básica são constatadas, embora as três espécies pertençam ao grupo das clorofíceas. Este fato, pode ser função de diferenças na composição química das células algais, que pode ser alterada em função da fase de crescimento ou da fonte de nutrientes.

Discussão

A necessidade da proteína animal na dieta humana é mais pronunciada nos trópicos. Pesquisas recentes indicam não só um grande potencial para aqüicultura em água doce e salobra nas regiões tropicais, mas também pela possibilidade de se cultivar espécies nativas (Ling, 1960).

Um dos fatores mais importantes para o sucesso do cultivo de peixe é provavelmente a utilização do alimento natural primariamente o fitoplâncton e o zooplâncton (Krazhan e Fill 1982), principalmente nos estágios iniciais do desenvolvimento.

Além do valor nutricional, o principal requisito de qualquer alimento a ser usado para um programa de produção em massa é que ele seja facilmente obtido em quantidades adequadas e a baixo custo (Howell, 1973).

Neste trabalho, as culturas de algas em laboratório foram realizadas com o objetivo de servirem diretamente como alimento para as larvas de peixes ou, indiretamente, como alimento para os diversos organismos zooplancônicos cultivados.

O cultivo de algas em laboratório para obtenção de uma dieta definida é bastante adequado, pois as células em crescimento exponencial têm alta capacidade fotossintética e o principal produto da sua fotossíntese é a proteína.

Um dos principais problemas do cultivo em massa de algas para alimentação direta ou indireta das larvas e alevinos de peixes, está relacionado com o custo dos reagentes químicos necessários para a preparação dos meios de cultura. Alternativas que levam a uma redução do custo de produção das algas são necessárias e muitas pesquisas têm sido direcionadas para isto.

Tabela 2 - Características químicas de *Chlamydomonas sp. A. gracilis*, *S. bijugus*, em meio CHU₁₂.

Constituintes químicos	Espécies de algas cultivadas		
	<i>Chlamydomonas</i> sp	<i>Ankistrodesmus</i> gracilis	<i>Scenedesmus</i> bijugus
Peso seco (pg/célula)	1.446,96	1,40	44
Conteúdo de cinzas (pg/célula)	0,168	0,011	0,0065
Carbono Orgânico (pg/célula)	470,62	13,63	19,19
% de Carbono Orgânico em relação ao peso seco	35,52	9,73	43,61
Clorofila <i>a</i>	0,46	0,12	0,10

No presente trabalho, a utilização do adubo químico NPK (20:5:20) como uma alternativa menos dispendiosa para a produção de alga, provou ser eficiente, uma vez que as maiores densidades e picos atingidos num curto espaço de tempo foram encontrados neste meio (Figuras 1, 2) para as três espécies de algas *Chlamydomonas sp.*, *S. bijugus*

Cultivo de Organismos Planctônicos

e *A. gracilis*. Provavelmente, isto possa estar relacionado com a proporção destes mesmos elementos que é até maior do que no outro meio utilizado (CHU₁₂), cuja proporção é 6:1:2. Deve-se ainda considerar que o nitrogênio e o fósforo constituem dois elementos de fundamental importância para o cultivo de algas, com influência direta no seu crescimento.

As culturas de algas neste estudo foram mantidas com aeração constante e com a presença de células bacterianas. Do ponto de vista prático, em uma massa algal as poucas células bacterianas têm uma importância pequena, uma vez que o seu consumidor direto, o zooplâncton herbívoro, também utiliza as bactérias como fonte de alimento (Geller e Muller, 1981).

Em culturas em grande volume, uma aeração constante e direta do meio é indispensável. Assim, mantém-se as células em suspensão, assegura-se o suprimento de carbono inorgânico e estabiliza-se o pH. Caso não houvesse aeração, as células sedimentariam no fundo do frasco de cultura, criando assim condições desfavoráveis ao seu crescimento por sombreamento. A agitação produzida por um fluxo gasoso permite a manutenção das células em suspensão, assegurando condições de crescimento idêntico para todas. Tendo em vista que as células algais diferem grandemente em tamanho, o número de células não permite uma comparação direta do rendimento da cultura em termos de biomassa (Findenegg, 1974). Assim, embora numericamente as culturas de *A. gracilis* e *S. bijugus* tenham alcançado concentrações de duas ordens de magnitude superiores àquela de *Chlamydomonas sp* os valores de biovolume total por ml (número de células multiplicado pelo volume celular médio) foram bem mais próximos $1,26 \times 10^9 \mu\text{m}^3/\text{ml}$, $1,25 \mu\text{m}^3/\text{ml}$ e $1,8 \times 10^8 \mu\text{m}^3/\text{ml}$ para as três espécies, respectivamente.

As informações sobre o volume celular das algas calculado a partir das dimensões lineares permitem expressar o peso elemental (C, N, P) a partir de relações entre o biovolume e o conteúdo dos elementos na célula e são úteis para comparar as taxas de ingestão de organismos filtradores quando alimentados com diferentes espécies de algas e de diferentes tamanhos.

O teor de carbono é outra importante medida para caracterizar o valor nutricional das algas. Normalmente, o carbono representa 40 a 60% do peso seco da célula. Este parâmetro é considerado um bom indicador na avaliação da qualidade do alimento algal.

As diferenças entre a quantidade de carbono das células para as três algas estudadas foram grandes (470,62 pg/célula para *Chlamydomonas sp*; 19,19 pg/célula para *S. bijugus* e 13,63 pg/célula para *A. gracilis*).

Para *A. gracilis*, a porcentagem de carbono orgânico em relação ao peso seco foi elevada, talvez por uma subestimação do peso seco (pg/célula), provável reflexo de um erro técnico.

As clorofíceas unicelulares são geralmente selecionadas para cultivo em massa e utilizadas na alimentação de organismos zooplancônicos, principalmente por apresentarem parede celular mais fina e portanto, uma quantidade de carbono orgânico total em relação ao peso seco mais elevada do que as diatomáceas.

A concentração de clorofila *a* por célula algal foi também determinada para as diferentes espécies cultivadas, visando fornecer dados adicionais que permitam caracterizar o estado fisiológico das células em meios de cultura alternativos. Contudo diferença na concentração de clorofila *a* de algas cultivadas são normalmente esperadas, considerando-se que este parâmetro pode ser influenciado pelas condições ambientais incluindo temperatura, intensidade luminosa ou deficiência de nutrientes (Mullin *et al.*, 1966).

O cultivo em larga escala de algas clorofíceas, seja para a alimentação de organismos zooplancônicos, é facilmente realizável em laboratório. A utilização do adubo químico na preparação do meio de cultura caracteriza-se como alternativa de baixo custo para os meios específicos de cultura.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho o cultivo em larga escala de clorofíceas no meio de adubo químico (NPK), já foi implantado em Centros de Aquicultura como a UNESP de Jaboticabal (SP) e o Instituto de Pesca em Pirassununga (SP).

Referências Bibliográficas

- Bazin, M.J.; Rapa, V. and Saunders, P.T. (1974). The integration of theory and experiment in the study of predator-prey dynamics. In: Usher, M.B. e Williamson, M.H. (eds), *Ecological Stabilities*. Chapman & Hall Ltd, London, 159-164.
- Bottrell, H.H.; Duncan, A.; Gliwicz, L.M.; Grygierek, E.; Hergig, A.; Hillbricht-Ilkowska, K.; Kurasawa, H.; Larsson, P. and Weglenska, T. (1976). A review of some problems in zooplankton production studies. *Norw. J. Zool.*, 24:419-456.
- Chu, S.P. (1942). The influence of mineral composition of the medium of the growth of the planktonic algae. *J. Ecol.*, 30:284-325.
- Findenegg, I. (1974). *A Manual on Methods for Measuring Primary Productions in Aquatic Environments*. Vollenweider, R.A. (Ed). IBP Handbook n° 12. Oxford, 16-18.
- Geller, W. and Müller, H. (1981). The filtration apparatus of Cladocera: Filter mesh-sizes and their implication on food selectivity. *Oecologia*, 49:316-321.
- Grieko-Reis, M.A.; Onaga, C.A.; Borges, V.A. e Santos, A.A. (1986). Acompanhamento da produção de plâncton em tanques fertilizados na Estação de Aquicultura de Japuíá (CESP). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 5. Cuiabá... Anais... Mato Grosso 24-30.
- Howell, B.R. (1973). Marine fish culture in Britain VIII. A marine rotifer, *Brachionus plicatilis* Müller, and the larvae of the mussel, *Mitylus edulis*, as food for larvae flat-fish. *J. Cons. Int. Explo. Mer.*, 35:1-6.
- Krazhan, S.A. and Fill, S.A. (1982). The Contribution of Zooplankton to the food and of fish grow in tanks and Ponds near power plants. *Hydrobiol. Jour.*, 18:28-33.
- Ling, S.W. (1966). Feeds and feeding of warm-water fishes in ponds in Asia and the far east. In: FAO WORLDSYMPOSIUM ON WARM-WATER POND FISH CULTURE. Rome. *Proceedings...* Rome, 312-315.
- Lirski, A.; Onoszkiewicz, B.; Opusznski, K. and Wozniewski, M. (1979). Rearing of cyprinif larvae in new type flow-through cages placed in carp ponds. *Pol. Arch. Hydrobiol.*, 26:545-559.
- May, R.M. (1972). Limit cycles in predator-prey communities. *Science*, 197:900-902.
- Mullin, M.M.; Sloan, P.R. and Eppley, R.W. (1966). Relationship between carbon content cell volume, and area in phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 11:307-311.

- Parsons, T.R. and Strickland, J.D.H. (1963). Discussion of spectrophotometric determinations of marine-plant pigments, with revised equations for ascertaining chlorophylls and carotenoids. *J. Mar. Res.*, 21:155-163.
- Rocha, O. and Duncan, A. (1985). The relationship between cell carbon and cell volume in freshwater algal species used in zooplanktonic studies. *J. Plankton. Res.*, 7:279-294.
- Ruttner-Kolisko, A. (1977). Suggestions for biomass calculation of plankton rotifers. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebs. Limnol.*, 8:71-76.
- Silva, S.L.O.; Coelho, J.B.; Dias, C.; Pinto, J.B. e Crisóstomo, L.C. (1984). Cultivo de peixes econômicos em ambientes fertilizados com efluentes de biodigestor. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 3. São Carlos, 1983. *Anais...* São Paulo, pp.25.
- Sipaúbe-Tavares, L.H. (1988). Utilização do plâncton na alimentação de larvas e alevinos de peixes. São Carlos, UFSCar, pp.191. (Tese de doutorado).
- Vollenweider, R.A. (1974). *A Manual on Methods for Measuring Primary Production in Aquatic Environments*. Blackwell Publications. Oxford, pp. 225.