

TESTES PRELIMINARES DE CRESCIMENTO COM UMA CEPA DA MICROALGA PRODUTORA DE ASTAXANTINA *Haematococcus pluvialis* (CHLOROPHYCEAE, VOLVOCALES)

CAVALHEIRO, R.¹; RÖRIG, L.¹; FONTANA, J.D.² & M. PESSATTI¹

Laboratório de Oceanografia Biológica – CTTMAR – UNIVALI, Rua Uruguai, 458 – Cx. Postal 360, CEP 88.302-202, Itajaí – SC – Fone/fax: 0-XX-47-341-7633
(rorig@cttmar.univali.br)

² Laboratório de Químico Biotecnologia de Biomassa – LQBB – Departamento de Bioquímica – UFPR, Curitiba – PR

RESUMO

Este trabalho descreve um experimento preliminar de crescimento com uma cepa da microalga produtora de astaxantina *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales). Cultivos com 4 composições diferentes de células em termos de proporção e coloração de aplanósporos e macrozoóides, foram submetidos à 20°C ± 2°C, 70μE.m⁻².s⁻¹, fotoperíodo de 12 horas de luz : 12 horas de escuro e meio de cultura adequado por cerca de 900 horas. Alíquotas de 2 ml eram retiradas periodicamente ao longo do experimento para a determinação da densidade de células e construção das curvas de crescimento. Os resultados indicaram um padrão de crescimento similar para todos os frascos de cultivo, onde os macrozoóides predominavam nos primeiros dias sendo substituídos gradualmente por aplanósporos, que tornaram-se dominantes em torno de 300 horas. A densidade máxima de aplanósporos foi verificada em torno das 800 horas de experimento. O experimento como um todo, mostrou que a cepa testada é viável, podendo ser utilizada para experimentos específicos de determinação das condições ótimas de crescimento e produção de astaxantina.

Palavras chave: *Haematococcus pluvialis*, astaxantina, crescimento algal.

PRELIMINARY GROWTH TESTS OF A STRAIN OF THE ASTAXANTHIN PRODUCER *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* (CHLOROPHYCEAE, VOLVOCALES)

ABSTRACT

This paper describes a preliminary growth experiment with a strain of the astaxanthin producer *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales). Cultures with 4 different cell compositions in terms of density and coloration of aplanospores and macrozooids, were kept under 20°C ± 2°C, 70μE.m⁻².s⁻¹, 12h light : 12h dark and appropriate culture media for about 900h. 2ml samples were collected periodically, in order to determine cells density. Results indicated a similar growth pattern to all cultures, where green macrozooids were dominant in the first days being numerically got over by aplanospores after approximately 300h. Maximal number of aplanospores were attained at 800h. The experiment showed that the strain is viable and can be used to physiological studies about optimal growth conditions and astaxanthin production.

Key words: *Haematococcus pluvialis*, astaxanthin, algal growth.

INTRODUÇÃO

Haematococcus pluvialis é uma microalga da classe Chlorophyceae (tabela 1), mundialmente conhecida por ser a maior produtora natural de astaxantina, um pigmento carotenóide responsável pela coloração avermelhada na carne de camarões, salmões e outros organismos (Tacon, 1981).

Além de conferir melhor aspecto a alimentos oriundos da aquicultura, a astaxantina apresenta poderosas propriedades nutricionais. Sua principal atividade biológica no metabolismo humano refere-se à ação anti-oxidante, a qual chega a ser de 80 à 500 vezes maior que a do tocoferol (vitamina-E), o anti-oxidante comumente utilizado na alimentação humana. Entre outros efeitos, a atividade anti-oxidante da astaxantina, comprovadamente, gera: proteção da pele contra danos de radiação ultra-violeta, redução de efeitos degenerativos do envelhecimento, prevenção de efeitos degenerativos na visão, proteção contra câncer, aumento das lipoproteínas de alta densidade (HDL) e fortalecimento do sistema imunológico (Di Mascio, 1989). Por estas razões, o cultivo comercial de *Haematococcus pluvialis* tornou-se atrativo e altamente rentável, não sendo explorado no Brasil, apesar de o país consumir o produto via importação.

Durante o ciclo de vida do *H. pluvialis*, 4 estágios ou tipos de células podem ser reconhecidos: microzoóides flagelados, macrozoóides flagelados, células palmelóides

imóveis e hematocistos ou aplanósporos, os quais são grandes células vermelhas com uma parede celular altamente resistente (Elliot, 1934). Os aplanósporos destacam-se como a principal forma celular de acumulação de grandes concentrações de astaxantina, e surgem como formas de repouso ou resistência da espécie a condições desfavoráveis, tais como deficiência de nutrientes, excesso ou falta de luz, temperaturas inadequadas e presença de substâncias que interferem no metabolismo (Kobayashi *et al.*, 1992; Boussiba & Vonshak, 1991; Fan *et al.*, 1994). Por outro lado, as maiores biomassas e taxas de crescimento da espécie são geralmente atingidos na fase de macrozoóides flagelados.

O crescente interesse comercial na astaxantina tem despertado várias iniciativas em pesquisa sobre a fisiologia de *H. pluvialis*, especialmente no que diz respeito a determinar as condições ideais de crescimento em biomassa e de produção de astaxantina. Assim sendo, torna-se importante testar diferentes fatores influentes nestes aspectos fisiológicos da espécie, pois, apesar de diversos estudos similares já terem sido conduzidos com a mesma, cada cepa pode apresentar respostas diferenciadas. Além disso, muitas dessas informações são de difícil acesso e reprodutibilidade por constituírem segredo comercial ou industrial. Este trabalho apresenta os primeiros resultados obtidos nesse tema, enfocando as respostas fisiológicas de uma cepa de *H. pluvialis*, em termos de cres-

Tabela 1. Posição taxonômica da microalga *Haematococcus pluvialis* segundo Van den Hoek, *et al.*(1997)

Divisão	➡	Chlorophyta
Classe	➡	Chlorophyceae
Ordem	➡	Volvocales
Família	➡	Haematococcaceae
Gênero	➡	<i>Haematococcus</i>
Espécie	➡	<i>Haematococcus pluvialis</i>
Sinonímia	➡	<i>Haematococcus lacustris</i> , <i>Spharella lacustris</i>

cimento e produção de astaxantina. Com isto, inaugura-se uma nova linha de pesquisa no Laboratório de Oceanografia Biológica: o uso e padronização de cultivos de microrganismos para obtenção de produtos naturais de interesse econômico.

MATERIAIS E MÉTODOS

A partir de inóculos originados de uma cepa cultivada pelo Laboratório de Químico Biotecnologia de Biomassa (LQBB), do departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, foram realizados 4 repiques em meio líquido como cultivos de referência. Estes foram mantidos no Laboratório de Oceanografia Biológica do CTTMar – UNIVALI, à temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, em meio de cultivo líquido padrão para água doce (conforme Greenberg *et al.*, 1992), adicionado de vitamina B12 e biotina, com aproximadamente $70\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de irradiância e fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Como cada repique apresentou, após 15 dias de crescimento, composições e densidades diferentes de células, cada um deles foi novamente repicado em triplicata para a realização de testes controlados de crescimento, os quais foram conduzidos às mesmas condições descritas acima. Os 4 diferentes repiques foram denominados como tipo 1: predomínio de grandes aplanósporos avermelhados; tipo 2: composição equitativa de macrozoóides verdes e aplanósporos verdes e vermelhos; tipo 3: predomínio de macrozoóides verdes em densidade visualmente elevada; e tipo 4: predomínio de macrozoóides verdes em baixa densidade visual.

Para determinar as curvas de crescimento, alíquotas de 2,5 ml foram retiradas diariamente de cada frasco-teste, sendo fixadas com duas gotas de lugol. Estas alíquotas foram então contadas em microscópio óptico em câmaras de Sedgewick-Rafter, tendo sido contados separadamente, os macrozoóides flagelados e os aplanósporos. Os dados de

contagem (média de células por mililitro, Cél./ml, a partir das triplicatas) foram plotados graficamente contra o tempo em horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os frascos-teste dos 4 tipos caracterizaram-se por um predomínio de macrozoóides flagelados nos primeiros dias de crescimento com gradual incremento de aplanósporos ao longo do experimento (Figura 1). Tal fato foi verificado visivelmente pela coloração dos cultivos, que passou de verde a avermelhado. Após as primeiras 24 horas em que os cultivos foram repicados para o presente experimento, houve alteração na composição de formas celulares, indicando uma reação fisiológica à renovação de nutrientes. Nos primeiros momentos, parece que há tendência de favorecimento aos macrozoóides, para, posteriormente estes declinarem em favor de aplanósporos.

Os tipos 1, 3 e 4 (Figura 1A, 1C e 1D) apresentaram padrão de crescimento similar, onde o número relativo de aplanósporos superou o número de macrozoóides flagelados em torno das

300 horas de experimento. No caso do tipo 2 essa situação ocorreu em torno das 500 horas de experimento. Ao final do experimento (936 horas), houve virtual ausência de macrozoóides flagelados e máximas densidades (10.000 a 15.000 Cél./ml) de aplanósporos avermelhados em todos os frascos-teste. O número máximo de macrozoóides flagelados foi verificado em torno das 180 horas nos tipos 1, 3 e 4 e em torno das 380 horas no tipo 2. A razão para o padrão diferenciado deste tipo 2, certamente relaciona-se com a condição inicial das células no frasco, que eram na maioria macrozoóides flagelados e em grande densidade. É interessante notar, no entanto, que o número de macrozoóides permaneceu quase 250 horas praticamente constante, ou seja, com uma taxa de divisão celular baixa. Por outro lado, quando o número de aplanósporos superou

o de macrozoóides, o crescimento daqueles esboçou um ritmo mais acelerado. Tal situação foi também verificada para os outros frascos, indicando que os aplanósporos desenvolvem um tipo de reprodução próprio, que é mais intenso e rápido que na fase macrozoóide. Os perfis de crescimento indicam nitidamente que não só há uma conver-

são de macrozoóides (em torno das 300 horas para os tipos 1, 3 e 4; e em torno de 500 horas para o tipo 2) em aplanósporos, mas um aumento real de número na fase de aplanósporo. Outro aspecto interessante a ressaltar é que o crescimento de aplanósporos tendeu a estabilizar em torno das 800 horas (exceto para o tipo 4 que teve leve crescimento), indicando que este tempo, ao menos para as condições deste teste, seria o tempo de máxima biomassa de aplanósporos produzida nos frascos.

Enfim, os resultados deste teste preliminar indicaram que a cepa e a experimentação laboratorial de crescimento com essa espécie são viáveis. Além disso, verificou-se que o maior incremento em biomassa não necessariamente está ligado à fase de macrozoóide, podendo haver incremento significativo na fase de aplanósporo.

Com base nestas informações preliminares, pretende-se realizar uma série de experimentos fatoriais, variando condições como nutrientes, irradiância e temperatura, no intuito de verificar o conjunto de variáveis que gera maior produção de biomassa e, posteriormente, de astaxantina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Borowitzka, M.A.; Huisman, J.M. & Osborn, A. 1991. Culture of the astaxanthin producing green alga *Haematococcus pluvialis*. 1 Effects of nutrients on growth and cell tuype. *Journal of Applied Phycology* 3: 295-304.
- Boussiba, S. & Vonshak, A. 1991. Astaxanthin accumulation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Cell Physiol.* 32(7): 1077-1082.
- Di Mascio, P.; Murphy, M.E.; & Sies, H. 1989. Lycopene as the most efficient biological carotenoids singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.* 274: 532-538.
- Elliot, A.M. 1934. Morphology and the life history of *Haematococcus pluvialis*. *Arch. Protistenk.* 82: 250-272.

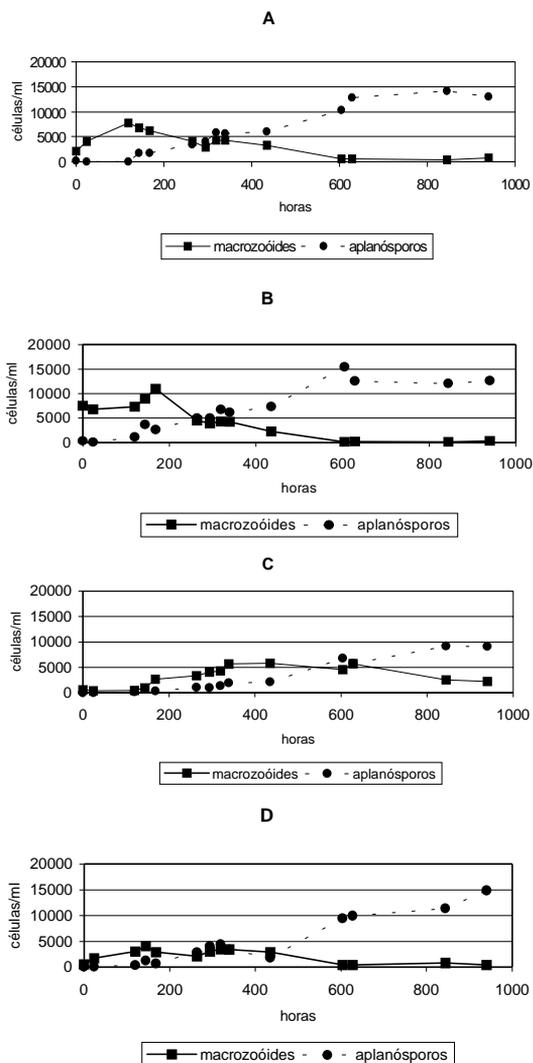


Figura 1. Curvas de crescimento de aplanósporos e macrozoóides flagelados de *Haematococcus pluvialis*. A: tipo 1; B: tipo 2; C: tipo3; D: tipo 4 (ver texto para detalhes).

- Fan, L.; Vonshak, A.; & Boussiba, S. 1994. Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 30: 829-833.
- Greenberg, A.E.; Clesceri, L.S. & Eaton, A.D. (eds.) 1992. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* 18^o ed. Washington: American Public Health Association.
- Kobayashi, M.; Kakizono, T.; Naomichi, N. & Nagai, S. 1992. Effects of light intensity, light quality, and illumination cycle on astaxanthin formation in a green alga, *Haematococcus pluvialis*. *Journal of fermentation and bioengineering* 74 (1): 61-63.
- Shimidzu, N.; Goto, M.; & Miki, W. 1996. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. *Fisheries Science* 62(1): 134-137.
- Tacon, A.G. 1981. Speculative review of possible carotenoid function in fish. *Prog. Fish. Cult.* 43(4): 205-208.