



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA



**CRESCIMENTO E PROPRIEDADES NUTRICIONAIS DE
Chaetoceros muelleri LEMMERMAN PARA AQUICULTURA:
COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO**

Evaldení Guiomar Moreira

**Recife
2007**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA



Evaldení Guiomar Moreira

**CRESCIMENTO E PROPRIEDADES NUTRICIONAIS DE
Chaetoceros muelleri LEMMERMAN PARA AQUICULTURA:
COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia/ Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Oceanografia.

Orientadora: Dra. Maria Luise Koenig

Co-Orientador: Dr. Alfredo Matos Moura Junior

Recife
2007

M838c Moreira, Evaldení Guiomar

Crescimento e propriedades nutricionais de *Chaetoceros muelleri* Lemmerman para aquicultura: comparação entre diferentes meios de cultivo. – Recife: O Autor, 2007.

63 folhas.: il.; fig., tabs.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CTG. Oceanografia, 2007.

Inclui Bibliografia.

1. Oceanografia. 2. Aquicultura. 3. *Chaetoceros muelleri* Lemmerman – Composição bioquímica. 4. *Chaetoceros muelleri* Lemmerman – Propriedades nutricionais. I. Título.

UFPE

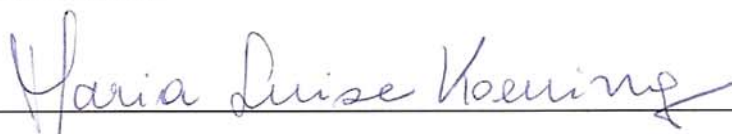
BCTG/2006-047

551.46CDD (22.ed.)

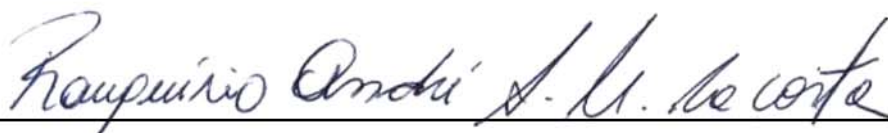
**CRESCIMENTO E PROPRIEDADES NUTRICIONAIS DE
Chaetoceros muelleri LEMMERMAN PARA AQUICULTURA:
COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO.**

Aprovada em: 28 / 02 / 2007.

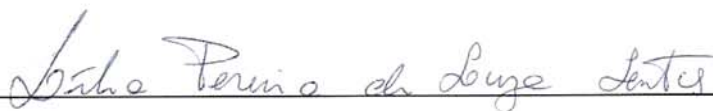
Esta dissertação foi julgada para a obtenção do título de Mestre em Oceanografia,
pela banca Examinadora:



Profa. Dra. Maria Luise Koenig – Orientadora
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE



Prof. Dr. Rauquílio André Albuquerque Marinho da Costa – Membro externo
Universidade Federal do Para – UFPA



Profa. Dra. Lília Pereira de Souza Santos – Membro interno
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Alfredo Olivera Gálvez – Membro externo (Suplente)
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Profa. Dra. Enide Eskinazi Leça – Membro interno (Suplente)
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Dedico à minha família...

AGRADECIMENTOS

A Deus por me proporcionar viver.

A minha mãe Aldenora Moreira e meu pai Benedito Moreira que apóiam meus sonhos com tanto cuidado e zelo.

Aos meus irmãos pelo apoio e amizade, em especial minha querida e única irmã Evaldinólia Moreira.

Aos professores Marco Cutrim e Andréa Azevedo que muito incentivaram minha vinda a Recife para o mestrado.

A minha amiga e orientadora Profª. Dra. Maria Luise Koenig, que acreditou neste projeto e muito se dedicou para soluções dos vários problemas que enfrentamos e que proporcionaram a finalização desta dissertação... muito obrigada.

Ao amigo e co-orientador Prof. Dr. Alfredo Matos Moura Junior pela sua experiência com o assunto e enumeráveis sugestões para o desenvolvimento e finalização deste trabalho.

Aos membros da banca, professores Drs. Rauquílio André Albuquerque Marinho da Costa, Lília Pereira de Souza Santos, Alfredo Olivera Gálvez e Enide Eskinazi Leça, pelas valiosas considerações.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Oceanografia, não só pelas lições aprendidas em sala de aula, mas também pelas lições de vida, momentos que marcaram e que não se esquece.

A Profª. Dra. Lucia Gusmão, uma pessoa sem igual, alegre e sempre com uma palavra de incentivo, sempre preocupada com as pessoas à sua volta e disposta a ajudar.

Aos Profs. Dr. Silvio Macêdo, Dr. Fernando Feitosa e Dr. Manuel Flores, por serem sempre prestativos e atenciosos a qualquer questionamento.

As Profas. Dra. Maria Elizabeth Cavalcante Chaves, Dra. Maria da Paz e Msc. Vera Cristina Oliveira de Carvalho que disponibilizaram seu tempo e sem elas não seria possível a finalização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Luís de Lima Filho (Diretor do LIKA) pelo apoio logístico.

A Profa. Dra. Edleide Freitas Pires e a Sebastião Camilo de Melo Filho pela disponibilidade e integração dos departamentos da universidade com seus alunos.

As Profas. Dras. Fátima Queiroz e Glicia Calazans e o Prof. Dr. Cláudio Câmara que também contribuíram de forma valerosa.

As amigas Keyla e Lara que nas horas de pequenos imprevistos sempre me salvaram na hora H.

As amigas Natália e Daniele, que também se dispuseram e contribuíram, para o andamento deste trabalho.

As pessoas que fazem parte do Departamento de Oceanografia e que sempre estão prontas para estender a mão a um pedido de ajuda: Paulinho, Beto, Mano, Tiba, Edleusa, Joaquim e, em especial, nossa amiga de todos os momentos e soluções, Mirna.

Aos amigos que fiz ao longo desses três anos, os meninos Leandro, Thiago, Sergio, Jesser, Alexandre, Augusto, Eroni, Neto, Negaum, Jorge e as meninas Fabiana, Adilma, Lillian, Val, Maristela, Doris, Dani, Renata, Tatiana, Adriane. Se continuasse essa lista seria realmente imensa ... mas só tenho muito a agradecer ter encontrado pessoas tão bonitas de alma e sempre com uma palavra amiga para dar aquela animada nos momentos de desestímulo.

Às amigas Xio, Bel e Pató, grandes amigas ... obrigada por tudo, momentos muito felizes e verdadeiros. Vocês sempre estarão na minha mente e coração...nada supera uma amizade, nem mesmo a distância.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

A CAPES pela concessão de bolsa que possibilitou a realização desta pesquisa.

Ao LIKA – UFPE pelo apoio a este trabalho.

Aos Deptos. de Bioquímica, Nutrição, Antibióticos e Oceanografia – UFPE pelo apoio logístico.

*For want of a nail a shoe was lost,
For want of a shoe a horse was lost,
For want of a horse a rider was lost,
For want of a rider a battle was lost,
For want of a battle the kingdom was lost,
And all for want of a horseshoe nail.*

“Trecho de historieta infantil,
afixada no Anglo_American Supply Headquarters – Londres,
segunda guerra mundial”

Tradução livre:

*Por falta de um prego perdeu-se uma ferradura,
Por falta de uma ferradura perdeu-se um cavalo,
Por falta de um cavalo perdeu-se um cavaleiro,
Por falta de um cavaleiro perdeu-se uma batalha,
Por falta de uma batalha perdeu-se o reino,
E tudo por falta de um prego de ferradura.*

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo determinar a composição bioquímica de *Chaetoceros muelleri* Lemmerman, uma importante espécie para atividades na aquicultura, em diferentes meios de cultivo. Os bioensaios foram realizados em duas etapas e mantidos nas mesmas condições (iluminação constante; $22\pm 1^\circ\text{C}$; pH de 8 a 9 e salinidade 33 ups). O meio controle utilizado foi F/2 Guillard (F/2) e os meios alternativos de cultivo foram extrato de esterco de gado (EEG) e de minhoca (EEM). Na primeira etapa, a diatomácea *C. muelleri* foi cultivada em 500 mL dos meios de cultivo, em triplicatas, e determinou-se a densidade celular, taxa diária de crescimento, clorofila *a* e biovolume. A fase exponencial foi definida através da curva de crescimento. A segunda etapa dos bioensaios foi iniciada em garrafão plástico até o volume final de 20 litros, para cada meio. A cada aumento do volume foram determinadas a densidade celular e a concentração de clorofila *a*. As análises bioquímicas foram realizadas com o material precipitado dos garrafões (20 L), através de centrifugação (4000 rpm, 15 min). Esse precipitado foi seco em estufa até peso constante, à temperatura de 40°C . Foram analisados nitrogênio total, carboidrato total, proteína total e lipídeo total, em triplicatas. Na primeira etapa dos bioensaio, as maiores densidades celulares foram de $11,05\pm 1,32 \times 10^6$ céls.mL⁻¹, F/2; no 6^o dia; de $8,33\pm 0,83 \times 10^6$ céls.mL⁻¹, EEG, no 4^o dia e de $6,86\pm 0,38 \times 10^6$ céls.mL⁻¹, EEM, 8^o dia. O valor médio da taxa diária de crescimento celular de *C. muelleri*, na fase *log*, para o meio F/2 foi de $0,65\pm 0,70$, enquanto que, para os meios EEG e EEM foi de $0,97\pm 0,43$ e $0,36\pm 0,31$, respectivamente. Os teores máximos de clorofila *a* foram de $0,34\pm 0,03$ pg.cél.⁻¹, no 7^o dia, meio F/2; de $0,74\pm 0,90$ pg.cél.⁻¹, no 9^o dia; meio EEG e de $2,26\pm 1,70$ pg.cél.⁻¹, no 12^o dia, meio EEM. Os maiores valores de biovolume celular foram de $528,55\pm 321,06 \mu\text{m}^3$, para o meio F/2 e de $515,28\pm 351,87 \mu\text{m}^3$, para o meio EEG, no 5^o dia, em ambos meios; e, de $534,17\pm 454,13 \mu\text{m}^3$, para o meio EEM, no 11^o dia. Na segunda etapa dos bioensaios, para o volume final de 20 L, as concentrações médias da densidade celular para o meio F/2 foi de $21,61\pm 0,24 \times 10^6$ céls.mL⁻¹, para o meio EEG de $18,53\pm 0,43 \times 10^6$ céls.mL⁻¹ e para o meio EEM de $23,07\pm 0,44 \times 10^6$ céls.mL⁻¹. Os teores médios de clorofila *a* foram de $0,90\pm 0,01 \times 10^{-7}$ pg.cél.⁻¹, para o meio EEG, seguida de $0,79\pm 0,05 \times 10^{-7}$ pg.cél.⁻¹, para o meio EEM e de $0,73\pm 0,02 \times 10^{-7}$ pg.cél.⁻¹, para o meio F/2. Quanto ao nitrogênio total, os valores médios foram $3,35\pm 0,06\%$ de matéria seca, para o meio EEM; $2,30\pm 0,05\%$ de matéria seca, para o meio F/2 e $1,80\pm 0,05\%$ de matéria seca, para o meio EEG. Em relação ao valor médio de lipídio total, no meio EEM foi de $0,112\pm 0,001$ pg.cél.⁻¹; e para os meios F/2, de $0,104\pm 0,001$ pg.cél.⁻¹ e EEG, $0,100\pm 0,001$ pg.cél.⁻¹. Para a proteína total, o valor médio no meio EEM, foi de $0,226\pm 0,012$ pg.cél.⁻¹ e nos meios F/2, de $0,140\pm 0,014$ pg.cél.⁻¹ e EEG, $0,125\pm 0,001$ pg.cél.⁻¹. Para o carboidrato total, o valor médio no meio EEM, foi de $36,22\pm 1,53$ pg.cél.⁻¹, seguido dos meios EEG, $29,16\pm 0,81$ pg.cél.⁻¹ e F/2, $19,76\pm 0,85$ pg.cél.⁻¹. Entre as médias dos dados analisados para os bioensaios (F/2, EEG e EEM), foram encontradas diferenças significativas ($p<0,05$). Estatisticamente, em relação aos parâmetros analisados para a espécie *C. muelleri*, o meio extrato de esterco de minhoca demonstrou que pode ser utilizado como fonte nutritiva para o desenvolvimento algal, podendo substituir meios convencionais como o meio F/2 Guillard.

Palavras-chave: Crescimento; propriedades nutricionais; *Chaetoceros muelleri*, meios alternativos; composição bioquímica.

ABSTRACT

The aim of this work was to determine the biochemical composition of *Chaetoceros muelleri* Lemmerman, an important species for aquiculture activities, in different culture media. Bioassays were developed in two steps and maintained in the same conditions (constant illumination; $22\pm 1^{\circ}\text{C}$; pH from 8 to 9 and salinity 33 psu). Control medium used was F/2 Guillard (F/2) and alternative media were cattle dung extract (EEG) and earthworm dung extract (EEM). For the first step, the diatom *C. muelleri* was cultivated into 500 mL ($n=3$), for cellular density, growth rate, chlorophyll *a* and biovolume determination. As the exponential phase growth was defined, through the growth curve. The second step started with species cultivation in plastic carboy, until 20 L, for each medium. Cellular density and chlorophyll *a* content were determined for each increased volume. Total nitrogen, total carbohydrate, total protein and total lipid were analyzed, in 3 replicates, from dry precipitated alga from carboys (20 L) (4000 rpm, 15 min). In the first step, cellular density maximum values was $11.05\pm 1.32 \times 10^6 \text{ cells.mL}^{-1}$, in F/2 (6th day); $8.33\pm 0.83 \times 10^6 \text{ cells.mL}^{-1}$, in EEG (4th day) and $6.86\pm 0.38 \times 10^6 \text{ cells.mL}^{-1}$, in EEM (8th day). Daily rate cellular growth average value, in *log* phase, was 0.65 ± 0.70 to F/2, while, to EEG and EEM media were 0.97 ± 0.43 and 0.36 ± 0.31 , respectively. Chlorophyll *a* maximum content was $0.34\pm 0.03 \text{ pg.cell}^{-1}$ (7th day) in F/2 medium; $0.74\pm 0.90 \text{ pg.cell}^{-1}$ (9th day) in EEG medium and $2.26\pm 1.70 \text{ pg.cell}^{-1}$ (12th day) in EEM medium. Cellular biovolume maximum values was $528.55\pm 321.06 \mu\text{m}^3$, to F/2 medium and $515.28\pm 351.87 \mu\text{m}^3$ to EEG medium, in the 5th day, in both media. EEM medium presented $534.17\pm 454.13 \mu\text{m}^3$ (11th day). For the second step, the average value cellular density was $21.61\pm 0.24 \times 10^6 \text{ cells.mL}^{-1}$ to F/2 medium; $18.53\pm 0.43 \times 10^6 \text{ cells.mL}^{-1}$ to EEG medium and $23.07\pm 0.44 \times 10^6 \text{ cells.mL}^{-1}$ to EEM medium. The chlorophyll *a* average content was $0.90\pm 0.01 \times 10^{-7} \text{ pg.cell}^{-1}$ to EEG medium; $0.79\pm 0.05 \times 10^{-7} \text{ pg.cell}^{-1}$ to EEM medium and $0.73\pm 0.02 \times 10^{-7} \text{ pg.cell}^{-1}$ to F/2 medium. Total nitrogen average value was $3.35\pm 0.06\%$ to EEM medium, followed by $2.30\pm 0.05\%$, to F/2 medium and $1.80\pm 0.05\%$ to EEG medium. Total lipid average value was determined to EEM medium, $0.112\pm 0.001 \text{ pg.cell}^{-1}$. In F/2 medium, its content was $0.104\pm 0.001 \text{ pg.cell}^{-1}$ and $0.100\pm 0.001 \text{ pg.cell}^{-1}$ to EEG medium. As well as for total protein, the average value determined was to EEM medium, $0.226\pm 0.012 \text{ pg.cell}^{-1}$. In F/2 medium, $0.140\pm 0.014 \text{ pg.cell}^{-1}$ and to EEG medium, $0.125\pm 0.001 \text{ pg.cell}^{-1}$. Total carbohydrate average value was to EEM medium, $36.22\pm 1.53 \text{ pg.cell}^{-1}$. In EEG medium, it was $26.16\pm 0.81 \text{ pg.cell}^{-1}$ and to F/2 medium, it was $19.76\pm 0.85 \text{ pg.cell}^{-1}$. Among the averages of the data analyzed for the bioassays (F/2, EEG and EEM), were found significant differences ($p < 0,05$). Statistically, in relation to the parameters analyzed *C. muelleri* species, the earthworm dung extract media demonstrated that it can be used as algal development nutritious source, could substitute conventional medium (F/2 Guillard).

Words-key: Growth; nutritional property; *Chaetoceros muelleri*, alternative medium; biochemical composition.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE APÊNDICES

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3 TRABALHOS SOBRE CULTIVO DE MICROALGAS NO BRASIL.....	21
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1 Posicionamento taxonômico da espécie cultivada, segundo Round et al. (1992).....	23
4.2 <i>Chaetoceros muelleri</i> Lemmerman segundo Reink (1984).....	23
4.3 Organismo.....	24
4.4 Primeira etapa dos bioensaios.....	25
4.4.1 Densidade e taxa diária de crescimento celular.....	26
4.4.2 Clorofila a.....	26
4.4.3 Biovolume celular.....	27
4.5 Segunda etapa dos bioensaios.....	27
4.5.1 Densidade celular.....	27
4.5.2 Clorofila a.....	27
4.5.3 Análises bioquímicas.....	28
4.5.4 Tratamento estatístico.....	30
4.5.5 Normalização do texto.....	30
5 RESULTADOS.....	31
5.1 Primeira etapa dos bioensaios.....	31

5.1.1 Densidade e taxa diária de crescimento celular.....	31
5.1.2 Clorofila a.....	32
5.1.3 Biovolume celular	32
5.2 Segunda etapa dos bioensaios.....	33
5.2.1 Densidade celular.....	33
5.2.2 Clorofila a.....	34
5.2.3 Análises bioquímicas.....	34
6 DISCUSSÃO.....	36
6.1 Primeira etapa dos bioensaios.....	36
6.2 Segunda etapa dos bioensaios.....	37
7 CONCLUSÕES.....	42
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
APÊNDICES.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Frústula vegetativa de <i>Chaetoceros muelleri</i> Lemmerman, em microscópio de esquadramento de elétron. Escala = 10 μm . Fonte: Reinke (1984).....	23
Figura 2.	Concentrações médias da densidade celular (10^6 céls.mL ⁻¹) e curvas de crescimento de <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivada nos meios F/2 Guillard (F/2), extrato de esterco de gado (EEG) e extrato de esterco de minhoca (EEM), durante o período de 12 dias de cultivo.....	31
Figura 3.	Teores médios de clorofila <i>a</i> (pg.cél. ⁻¹) de <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivada nos meios F/2 Guillard (F/2), extrato de esterco de gado (EEG) e extrato de esterco de minhoca (EEM), durante o período de 12 dias de cultivo.....	32
Figura 4.	Valores médios do biovolume celular (μm^3) de <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivada nos meios F/2 Guillard (F/2), extrato de esterco de gado (EEG) e extrato de esterco de minhoca (EEM), durante o período de 12 dias de cultivo.....	33
Figura 5.	Concentrações médias da densidade celular (10^6 céls.mL ⁻¹) de <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivada nos meios F/2 Guillard (F/2), extrato de esterco de gado (EEG) e extrato de esterco de minhoca (EEM), até volume final de 20 L: i – início do cultivo com 2 L.....	33
Figura 6.	Teores médios de clorofila <i>a</i> (10^{-7} pg.cél. ⁻¹) de <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivada nos meios F/2 Guillard (F/2), extrato de esterco de gado (EEG) e extrato de esterco de minhoca (EEM), até volume final de 20 L: i – início do cultivo com 2 L.....	34
Figura 7.	Concentrações médias da densidade celular média (10^6 céls.mL ⁻¹), teores médios de clorofila <i>a</i> (10^{-7} pg.cél. ⁻¹); valores médios de nitrogênio total (% matéria seca), lípidio total (pg.cél. ⁻¹), proteína total (pg.cél. ⁻¹) e carboidrato total (pg.cél. ⁻¹) de <i>Chaetoceros muelleri</i> cultivada nos meios F/2 Guillard (F/2), extrato de esterco de gado (EEG) e extrato de esterco de minhoca (EEM), analisados para o volume final de 20 L: i – início do cultivo com 2 L. Letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição e concentrações dos meios F/2 Guillard (F/2), extrato de esterco de gado (EEG) e extrato de esterco de minhoca (EEM).....	25
Tabela 2.	Preparo das soluções padrões para a curva de calibração para proteína total.....	60
Tabela 3.	Preparo da curva de calibração para proteína total.....	61

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Protocolo da primeira etapa dos bioensaios.....	55
APÊNDICE B – Protocolo da segunda etapa dos bioensaios.....	56
APÊNDICE C – Protocolo para determinação do nitrogênio total (%) segundo o método de Kjeldahl (Association of Official Analytical Chemists – AOAC, 1990).....	57
APÊNDICE D – Protocolo para dosagem de carboidrato total segundo a técnica fenol – ácido sulfúrico descrita por Dubois et al. (1956).....	59
APÊNDICE E – Protocolo para dosagem proteína total segundo o método de Lowry et al. (1951).....	60
APÊNDICE F – Protocolo para dosagem de lipídio total segundo a técnica descrita por Frings et al. (1972).....	62

1 INTRODUÇÃO

O potencial do Brasil para o desenvolvimento sustentável da aquicultura é imenso. Essa atividade, no país tem crescido a uma média de 30% ao ano, índice superior à média mundial de 10%. O Brasil possui uma longa costa marítima, clima favorável e crescente demanda por produtos aquícolas como o pescado, camarão, ostra, dentre outros. Além desses pontos, pesa nesse setor da economia, o fato de que a pesca extrativista atingiu o limite máximo sustentável de captura e, não consegue mais atender às demandas de alimentos geradas pela população mundial. Com isso, a aquicultura passou a ser incentivada e muitos pescadores investiram nessa nova atividade o que lhes garante sobrevivência e melhora na qualidade de vida (MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO, 2006).

A aquicultura tem vários objetivos, tais como, a produção de alimento; a melhoria do estoque natural através do recrutamento e transplante artificial; a produção de peixes para pesca esportiva; a produção de iscas para uso comercial; a produção para uso industrial de rações e substâncias coloidais extraída das algas; ostras para a produção de pérolas; entre outros (BOROWITZKA, 1999).

Entre os objetivos acima citados, a produção de alimento para consumo humano é o principal objetivo na maioria dos países. Seja para aumentar ou melhorar o consumo dentro do país ou para exportação, aumentando as divisas e melhorando a sua balança comercial (FAO, 1977). Para dar suporte à aquicultura, um dos fatores importantes é a utilização de alimentação natural (fitoplâncton e zooplâncton), principalmente nos estágios iniciais de desenvolvimento dos animais cultivados, em especial nos primeiros dias de vida. Há também, a necessidade de reproduzir, ao máximo possível, as condições naturais (temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido, dióxido de carbono, etc) da água de seu habitat (DE PAUWN; PERSOONE, 1988).

A larvicultura é essencial para o sucesso de cultivos de espécies aquáticas, chegando a atingir 10% ou mais dos custos totais do projeto. Um dos itens que mais encarecem essa atividade é o alimento fornecido às larvas, ou seja, as microalgas ou fitoflagelados que são mantidos em meios de cultura elaborados à base de produtos químicos de altos custos (KLEIN; GONZALEZ, 1993).

A alimentação com utilização de microalgas pode ser feita diretamente no ambiente ou através do isolamento de espécies para cultivo. Dependendo do animal e do seu estágio de vida, as microalgas são consumidas diretamente, por várias espécies de herbívoros, ou indiretamente, via cadeia alimentar "alga-zooplâncton", podendo também, junto com as bactérias, controlar o balanço entre o oxigênio e o dióxido de carbono nos cultivos (DE PAUWN; PERSOONE, 1988) e os componentes dos nutrientes dissolvidos, principalmente nitrogênio.

A biotecnologia microalgal ganhou importância considerável nas últimas décadas e as suas aplicações variam da simples produção de biomassa para alimentação, como já mencionado, a valiosos produtos para aplicações farmacêuticas. Para a maioria destas aplicações, o mercado ainda está em desenvolvimento e seu uso se estendendo a novas áreas. Considerando a enorme biodiversidade das microalgas e recentes desenvolvimentos em engenharia genética, este grupo de organismos representa uma das fontes mais promissoras para novos produtos. Com o desenvolvimento de técnicas sofisticadas de culturas, a biotecnologia microalgal já responde as altas demandas de alimento e indústrias farmacêuticas (PULZ; GROSS, 2004).

O maior problema associado ao uso das microalgas na aquicultura é a falta de conhecimento sobre o seu valor nutricional e os requerimentos essenciais de seus consumidores. Atualmente, mais de 40 espécies de microalgas já foram testadas como fonte de alimento para aquicultura, mas nem todas têm condições de suprir as exigências nutricionais para o desenvolvimento de animais cultivado para o consumo humano. Alguns critérios nutricionais que as microalgas devem possuir para suprir essas exigências são: não serem tóxicas, terem o tamanho apropriado para serem ingeridas, digestibilidade da parede celular e possuírem os componentes bioquímicos essenciais (BECKER, 1995; BROWN et al., 1997).

A descoberta do alto valor nutricional das microalgas, ricas em proteínas, lipídeos e carboidratos, bem como vitaminas e outras moléculas como carotenóides, clorofilas, enzimas, dentre outras, fez com que houvesse um impulso para o desenvolvimento de pesquisas relacionadas ao uso das microalgas como alimento para organismos cultiváveis.

O conteúdo bioquímico das algas pode variar com a idade da cultura e com as mudanças das condições ambientais. O efeito da variação destes parâmetros em muitas espécies de algas é tema de pesquisas para melhor entender sua fisiologia, assim como também para responder perguntas específicas e pertinentes ao cultivo em massa e a nutrição de herbívoros. O efeito de alguns nutrientes, especialmente nitrogênio, na composição bioquímica das algas foi o assunto de vários documentos. Os seus resultados permitem a identificação de tendências gerais para o cultivo em massa de microalgas, quando as condições de cultura estão sujeitas a variações, embora muitos efeitos pareçam ser espécie-específicos (LOURENÇO et al., 1997).

Os lipídeos, proteínas e carboidratos presentes nas microalgas são as principais fontes de energia para o crescimento e o desenvolvimento dos animais utilizados na aquicultura (FABREGAS et al., 1985; GOLDMAN, 1980; WHYTE, 1987; FIDALGO et al., 1998).

Lipídeos e ácidos graxos são constituintes de toda célula vegetal, na qual têm função de constituinte da membrana celular, produto armazenado, metabólitos e fonte de energia. Mas segundo Becker (1995), as microalgas têm seu melhor aproveitamento na produção de carboidratos e proteínas, considerando-se que a percentagem de proteína nesses organismos pode variar de 6 a 71% de matéria seca, os quais são valores muito superiores, quando comparados ao arroz (8% de matéria seca), ao leite (26% de matéria seca) e a soja (37% de matéria seca).

Há atualmente interesse na composição dos ácidos graxos e no metabolismo associado das microalgas marinhas para produção de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (LC-PUFAs), os ácidos docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) e ácidos eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3), que nessas combinações são reconhecidos como tendo várias aplicações farmacêutica (TONON et al., 2002).

Vários estudos recentes realçam a qualidade nutricional e o importante papel das microalgas no sucesso para os organismos cultivados. Baseado na literatura, o conteúdo lipídico das diatomáceas nitidamente aumenta quando as culturas alcançam à fase estacionária devido a um fator limitante como silicato ou níveis de nitrogênio (PERNET et al., 2003).

A descoberta sobre o potencial produtivo das microalgas em relação à proteína foi um fator essencial para o desenvolvimento da aquicultura mundial (BOROWITZKA, 1988). As proteínas e os aminoácidos produzidos pelas microalgas podem dar origem a outras substâncias químicas e, através do melhoramento genético, poderá aumentar suas produções (COHEN, 1999).

As microalgas produzem uma ampla variação de carboidratos (glucose, galactose, manose, etc), os quais em sua maioria, ou são produtos de reserva (amido, crisolaminarina, paramido) ou atuam no equilíbrio osmótico (glicerol, manitol, sorbitol). Por possuírem alto valor energético, os carboidratos constituem uma valiosa fonte de alimento (BOROWITZKA, *op.cit.*; CHU et al., 1982).

Segundo Braga (2002), os carboidratos, nos oceanos, variam sazonalmente e geograficamente, diariamente e com a profundidade. A presença dominante de glucose na água do mar não é um surpresa, uma vez que o glucan (um polímero de glucose) é a maior forma de reserva de polissacarídeos no fitoplâncton marinho.

O *workshop* realizado em outubro de 1999 em Porto Seguro (BA), “Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da zona costeira marinha”, estabeleceu como prioridade: “levantamentos detalhados da ocorrência de espécies importantes de microalgas como organismos-alimento (microalgas, rotíferos e artemias) para a aquicultura e, idealmente, implantar bancos genéticos, com culturas monoespecíficas e bioensaios para testar qualidade nutricional, taxas de crescimento, adaptabilidade ao cultivo em massa e produtividade. Essas pesquisas poderão, por certo, dar maior suporte às atividades de aquicultura em desenvolvimento, tendo em vista o grande potencial do Brasil” (YONEDA, 2006).

Entre muitas microalgas, identificadas para propósitos de aquicultura, espécies pertencentes ao gênero *Chaetoceros* são extensivamente usados como alimento (SIMON, 1978; SMITH et al., 1993). A microalga, *C. muelleri*, umas das espécies de alga proeminentes, é usada como recurso alimentar para o crescimento de algumas espécies comerciais devido ao perfil de seus ácidos graxos, seu tamanho apropriado como alimento larval e sua valva pouco silicificada oferecendo pouca resistência (BROWN et al., 1997).

A produção de fitoplâncton em grande escala e de boa qualidade para alimentar diferentes organismos de importância na aquicultura, resultou na aplicação de diferentes métodos para o cultivo de microalgas, de tal modo que, às vezes isto é muito variável. Estabeleceu-se que a composição bioquímica das espécies de fitoplâncton pode ser modificada sob diferentes condições de cultivo (WEBB; CHU, 1982; FABREGAS et al., 1985). Porém, investigar o uso de meios alternativos como possível fonte de nutrientes para os cultivos de microalgas pode levar a obtenção de um decréscimo nos custos de produção, tendo em vista que os meios padrões exigem substâncias químicas de alto valor comercial (CABRALES; GONZÁLEZ, 2004).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

⇒ Determinar a composição bioquímica de *Chaetoceros muelleri* Lemmerman, em diferentes meios de cultivo, de modo a avaliar a possibilidade de sua aplicação em atividades de aquicultura.

2.2 Objetivos específicos

⇒ Testar a eficiência do uso de meios alternativos para o cultivo em laboratório;

⇒ Determinar a densidade celular, a taxa diária e a curva de crescimento para os diferentes bioensaios;

⇒ Determinar o teor de clorofila *a* da espécie cultivada;

⇒ Quantificar os teores de nitrogênio total, carboidrato total, lipídio total e proteína total;

⇒ Comparar os dados da composição bioquímica nos diferentes meios alternativos testados.

3 TRABALHOS SOBRE CULTIVO DE MICROALGAS NO BRASIL

No Brasil, o cultivo de microalgas expandiu-se paralelamente ao desenvolvimento da aquicultura, tendo em vista a demanda desses organismos como alimento direto ou indireto para diversos estágios larvais de espécies cultiváveis e de valor econômico.

A fim de reduzir os custos dos meios padrões de cultivo realizaram-se alguns estudos com meios alternativos estando, vários pesquisadores, voltados para elaboração de um meio eficiente e menos dispendioso. Foram testados diversos meios dos quais podem ser citados: adubo orgânico (CASTRO, 1979); caldo de peixe (OLIVEIRA, 1981); produtos químicos e industriais (MAESTRINI; GONZALEZ-RODRIGUEZ, 1983); fertilizantes agrícolas (GONZALEZ-RODRIGUEZ; MAESTRINI, 1984); fertilizantes orgânicos (OLIVEIRA; KOENING, 1984); meio FeNS artificial e o meio NH_{15} (YAMASHITA; MAGALHÃES, 1984a, 1984b), extrato de lixo residencial, de esterco de galinha e de lixo urbano (TRIANI et al., 1984, 1986a, 1986b); extratos de esterco de galinha e de gado; e extrato de macroalgas (PANIAGUA-MICHEL et al., 1987); vinhoto e fertilizantes orgânicos (KOENING et al., 1988, 1990a); algas arribadas (MELO et al., 1993); água de matadouro, vinhoto e caldo de peixe (KLEIN; GONZALEZ, 1993); meio comercial modificado (LOURENÇO et al., 1997); água residuária (COSTA et al., 2004); efluente suíno sintético (BERTOLIN et al., 2005); dentre outros.

Trabalhos relacionados a estudos ecofisiológicos e bioecológicos foram realizados, tais como: crescimento de *Phaeodactylum tricornutum* (TEXEIRA; VIEIRA, 1976); cultivo de diversas algas sob diferentes condições de cultivo (VIEIRA, 1977a, 1977b, 1982a, 1982b, 1983); utilização dos parâmetros de crescimento no cultivo de microalgas (VIEIRA; TEIXEIRA, 1982); cultivo de microalgas marinhas (ARAGÃO; VIEIRA, 1986); crescimento de algumas diatomáceas (NASCIMENTO; PEREIRA, 1988); crescimento de *Nitzschia* sp (SOUZA et al., 1993); a influência de diversas concentrações de cloro nas populações fitoplanctônicas (COSTA et al., 1994); valor nutricional de microalgas (GÁLVEZ et al., 1994); bioensaio com fitoplâncton marinho (BASSFELD et al., 1999); cultivo de *Spirulina platensis* sob diferentes condições (COLLA et al., 2002a, 2002b; COSTA et al., 2001, 2004a); cultivo de *Dunaliella viridis* sob diferentes regimes de

salinidade (PINHEIRO et al., 2002); atividade extra e intracelular de *Tetraselmis gracilis* (RIGOBELLO-MASINI et al, 2003); crescimento da *Thalassiosira fluviatilis* em diferentes intensidades de luz e fotoperíodos (NASCIMENTO, 2003); experimento com *Prorocentrum micans* e *P. obtusum* sob diferentes salinidades (GUIMARÃES; RÖRIG, 2004); crescimento da *Thalassiosira pseudonana* em diferentes intensidades de luz e fotoperíodos (PEREIRA NETO, 2004); cultivo de microalgas marinhas (SILVA et al., 2004); nitrogênio intercelular em algumas microalgas (LAVÍN; LOURENÇO, 2005); entre outros.

Em relação à composição química das microalgas, pode-se citar alguns trabalhos: carboidratos em *Tetraselmis tetrathele* cultivada com fertilizante orgânico (KOENING et al., 1990b); beta-caroteno em *Dunaliella* (HENRIQUES et al., 1998); nitrogênio intracelular e perfil bioquímico de algumas microalgas (LOURENÇO et al., 1997, 1998, 2002, 2004); lipídios em *Spirulina* (COSTA; COZZA, 2000); carboidratos de *Peridinium weleii* (VIEIRA et al., 2002); ácidos graxos de *Spirulina platensis* (COSTA et al., 2004b); proteínas, carboidratos e lipídios de *Chaetoceros* cf. *wighamii* sob efeito de diferentes condições de cultivo (ARAUJO; GARCIA, 2005); extração e quantificação de proteínas (BARBARINO; LOURENÇO, 2005); carboidratos e proteínas de microalgas marinhas (MOURA JUNIOR et al., 2006); dentre outros.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Posicionamento taxonômico da espécie cultivada, segundo Round et al. (1992)

Divisão Bacillariophyta

Classe Coscinodiscophyceae

Subclasse Chaetocerotophycidae

Ordem Chaetocerotales

Família Chaetocerotaceae

Chaetoceros muelleri Lemmerman

4.2 *Chaetoceros muelleri* Lemmerman segundo Reinke (1984)

As frústulas de *C. muelleri* (Figura 1) não são unidas em filamentos como a maioria dos *Chaetoceros* e são retangulares na vista da cintura com longas setas. As valvas elípticas variam no diâmetro valvar de 4,5 a 20 µm e as valvas aparentemente não tem ornamentação sob microscópio de luz (ML) e microscópio de esquadramento de elétron (MEE). Processos centrais ou aberturas de qualquer grupo não foram observados nas valvas. A seta é circular a subcircular em secção transversal e varia em comprimento de 15 – 35 µm. A seta esta inserida na junção manto-valva variando em ângulos de 165 – 180 ° e possui fileiras de pequenos espinhos e ponta fina em um padrão espiral. A seta oca se atenua para uma suave ponta sem abertura.

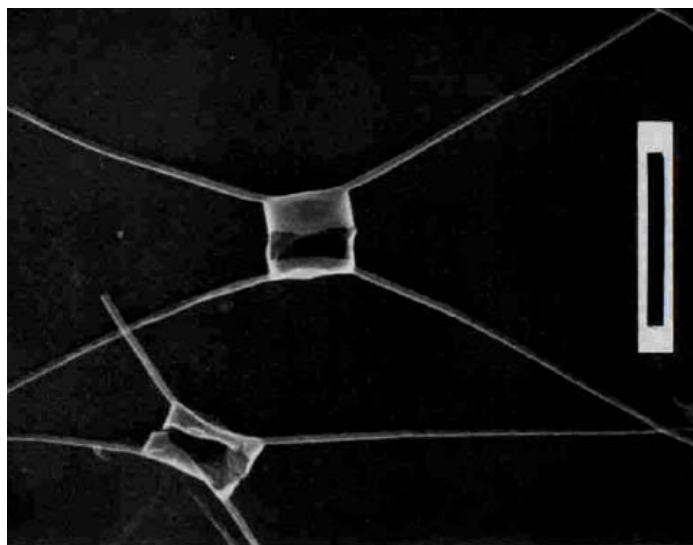


Figura 1. Frústula vegetativa de *Chaetoceros muelleri* Lemmerman, em microscópio de esquadramento de elétron. Escala = 10 µm. Fonte: Reinke (1984).

Os auxósporos de *C. muelleri* são esféricos, aproximadamente 6 µm em diâmetro e preso em posição lateral em ambas as valvas da frústula vegetativa. O auxósporo parece ser mais silicificado que a frústula vegetativa, porém menos que o esporo de resistência. A parede celular do auxósporo parece não ter ornamentação sob ML e MEE.

Os esporos de resistência endógenos ou hipnósporos são estruturalmente diferentes das células vegetativas e aparentemente encontradas no manto da célula vegetativa, sendo pesadamente silicificados. Setas e faixas são ausentes na cintura, e aparentemente sem ornamentação sob ML e MEE. O diâmetro dos esporos é similar ao das células vegetativas.

A espécie *C. muelleri* tem uma morfologia bem simples quando comparada a outras espécies marinhas neste gênero. Suas valvas são fracamente silicificadas sem processos labiados, aberturas simples, processos centrais, espinhos ou processos suportes. Só a seta tem um padrão punctato e espinhos pequenos. Embora, *C. muellerii*, seja espécie marinha, pode ser raramente informada como espécie de água doce tais como outras espécies de *Chaetoceros*.

4.3 Organismo

Para os diferentes bioensaios foi utilizada uma cepa da diatomácea *Chaetoceros muelleri* Lemmerman, mantida no banco de cultivo do Departamento de Oceanografia da Universidade Federal de Pernambuco, em tubos de ensaio com o meio F/2 Guillard (GUILLARD, 1975), gentilmente cedida pelo Laboratório de Cultivo e Ecotoxicologia (LACE/UFPE).

Para os bioensaios o meio controle utilizado foi F/2 Guillard (F/2) e os meios alternativos de cultivo foram extrato de esterco de gado (EEG) e de minhoca (EEM) (Tabela 1).

Os meios alternativos de cultivo foram preparados através da mistura de 250 g de esterco de gado e de minhoca em um litro de água do mar, agitando-se uma vez por dia, durante 15 dias, com posterior filtragem da solução final em papel de filtro e autoclavagem em 1 atm durante 15 minutos. As análises dos principais

nutrientes (nitrito – $\text{NO}_2^-.\text{N}$; nitrato – $\text{NO}_3^-.\text{N}$; fosfato – $\text{PO}_4^-.\text{P}$; silicato – $\text{SiO}_2^-.\text{S}$ e amônia – $\text{NH}_3^-.\text{N}$) inorgânicos dissolvidos nos meios alternativos foram realizadas no Laboratório de Química do Departamento de Oceanografia da UFPE, segundo os métodos descritos por Strickland e Parsons (1972) e Grasshoff et al. (1983).

Os bioensaios foram realizados em duas etapas e mantidos em condição de iluminação constante (24 horas), utilizando-se de lâmpadas fluorescentes – tipo luz do dia de 40W cada e temperatura de $22\pm 1^\circ\text{C}$. O pH variou de 8 a 9 em todos os meios. A salinidade da água do mar foi 33 ups.

Tabela 1. Composição e concentrações dos meios F/2 Guillard (F/2), extrato de esterco de gado (EEG) e extrato de esterco de minhoca (EEM).

F/2		EEG		EEM	
NUTRIENTES	mg.L ⁻¹	NUTRIENTES	mg.L ⁻¹	NUTRIENTES	mg.L ⁻¹
NaNO ₃	75	NH ₃	66,92	NH ₃	45,43
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	5	NO ₂	34,28	NO ₂	93,70
Na ₂ SiO ₃ . 9H ₂ O	30	NO ₃	41,03	NO ₃	201,28
METAIS TRAÇO		PO ₄	901,75	PO ₄	629,21
Na ₂ . EDTA ⁺	4,36	SiO ₃	1504,65	SiO ₃	2742,53
FeCl ₃ . 6H ₂ O	3,15				
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,01				
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,022				
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,01				
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	0,18				
NaMoO ₄ . 2 H ₂ O	0,006				
VITAMINAS					
Tiamina	0,01				
Biotina	0,0005				
B ₁₂	0,0005				

4.4 Primeira etapa dos bioensaios

No primeiro bioensaio (Apêndice A), a diatomácea *C. muelleri* foi cultivada em 500 mL dos meios de cultivo (F/2, EEG e EEM), em erlenmeyer de 1 L, em triplicatas. Para cada erlenmeyer foi adicionado um tubo de ensaio contendo 30 mL de cultivo da espécie. A partir deste bioensaio determinou-se a fase *log* (fase exponencial) da espécie nos meios referidos.

4.4.1 Densidade e taxa diária de crescimento celular

Na primeira etapa do bioensaio foram determinadas a densidade celular e a taxa diária de crescimento de *Chaetoceros muelleri*. Para a determinação da densidade celular retirou-se, diariamente, alíquotas de aproximadamente 1 mL de cada bioensaio, durante um período de 12 dias.

A contagem do número de células por mL foi realizado em triplicatas, com o auxílio de Câmara de Neubauer e microscópio binocular Zeiss. Através da curva de crescimento, observou-se as seguintes fases de crescimento: indução ou *lag*; exponencial ou *log*; redução do crescimento; estacionária; senescente ou de declínio, nos diferentes meios de cultivo.

A taxa diária de crescimento celular (K) de cada bioensaio foi mensurada através da seguinte fórmula (GUILLARD, 1973):

$$K = [3,332/(t_2 - t_1)] \cdot (\log N_2/N_1)$$

Onde:

K – taxa de crescimento diário;

t – tempo;

N – número de células.

4.4.2 Clorofila a

Foram utilizados 10 mL de cada bioensaio, retirados diariamente, para a determinação da concentração de clorofila a (mg.mL^{-1}), e filtrados em filtros Whatmann GF/F de fibra de vidro, de 47 mm de diâmetro. A extração foi realizada com acetona a 90% e as leituras efetuadas em espectrofotômetro, adotando-se os procedimentos descritos em Becker (1995):

$$\text{Clorofila a} = (12,7.A_{663}) - (269.A_{645})$$

Onde:

A₆₆₃ – leitura da absorbância da luz em 663 nm;

A₆₄₅ – leitura da absorbância da luz em 645 nm;

4.4.3 Biovolume celular

Em cada meio, o biovolume das células de *C. muellerii* foi determinado de acordo com a metodologia de Edler (1979). A cada dois dias foram medidas 15 células, com auxílio de micrômetro ocular e microscópio binocular Zeiss. Com os valores obtidos, foi calculado o biovolume médio, tomando-se como base a forma geométrica da espécie, que foi enquadrada na fórmula geométrica elipsóide:

$$\text{Biovolume } (\mu\text{m}^3) = \pi \cdot R \cdot r \cdot h,$$

Onde:

R – maior raio da valva;

r – menor raio da valva;

h – altura da valva.

4.5 Segunda etapa dos bioensaios

Após a determinação da fase *log* de *C. muelleri*, para cada meio de cultivo, iniciou-se novo bioensaio em um garrafão plástico com capacidade para 20 litros com aeração (Apêndice B). O segundo bioensaio foi iniciado com volume de dois litros, aos quais foram adicionados quatro tubos de ensaio contendo 30 mL de *C. muelleri*.

O aumento do volume dos meios foi realizado gradualmente com a adição dos respectivos meios e obteve-se a seguinte seqüência de volume em litros: 2 → 4 → 8 → 12 → 16 → 20. Cada aumento do volume dos cultivos foi realizado na fase exponencial da espécie referida e correspondente a cada meio de cultivo.

4.5.1 Densidade celular

Na segunda etapa, a determinação da densidade celular foi realizada em triplicatas, retirando-se 3 mL para cada bioensaio, e a cada aumento de volume do cultivo, seguindo a metodologia já citada.

4.5.2 Clorofila a

Devido a concentração celular do cultivo, foram retirados diariamente, em triplicatas, apenas 1 mL de cada bioensaio para a determinação da clorofila a ($\text{mg} \cdot \text{m}^{-3}$) e filtrados em filtros Whatmann GF/F de fibra de vidro, de 47 mm de diâmetro. A extração foi realizada com acetona a 90% e as leituras efetuadas em

espectrofotômetro, adotando-se os procedimentos descritos por Strickland e Parsons (1972):

$$\text{Clorofila } a = [11,6 \cdot \Delta 665 - (1,31 \cdot \Delta 645 + 0,14 \cdot \Delta 630 + \Delta 750)] \cdot v \cdot V^{-1} \cdot L^{-1}$$

Onde:

Δ = leitura da absorbância da luz para os diferentes comprimentos de onda (630, 645, 665 e 750 nm);

v = volume de acetona a 90% (mL);

V = volume da amostra filtrada (L);

L = caminho óptico da cubeta (cm).

4.5.3 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas no final do ciclo de cultivo e no final da fase *log* encontrado para cada meio de cultivo. O volume final (20 litros), dos três garrafões, foi centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos, em centrífuga Jouan BR-4i Multifunction – Thermo Electron Corporation, e o material precipitado foi acondicionado em becker, correspondendo aos meios de cultivo – F/2, EEG e EEM. Esse precipitado foi seco em estufa até peso constante, à temperatura de 40°C, conforme procedimento recomendado por Bezerra Neto et al. (1994). A produção final em material seco foi de 6,68 g para o meio F/2, 7,89 g para o meio EEG e 9,46 g para o meio EEM.

A determinação do nitrogênio total (%) foi realizada segundo o método de Kjeldahl (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC, 1990). Do material seco foi pesado 3 g de cada bioensaio (F/2, EEG e EEM) e sua análise foi efetuada em triplicatas (Apêndice C).

4.5.3.1. Preparação do extrato

Para as determinações bioquímicas de carboidrato total, proteína total e lipídeo total foram pesados 0,6 g do material seco, de cada bioensaio, e preparado o extrato segundo a metodologia abaixo:

- a) Adicionou-se tampão fosfato salino (PBS; pH = 7,4) ao material seco, em ependorff, nas seguintes diluições: 6 mL para o meio F/2 e 7ml para os meios EEG e EEM;
- b) O material foi conservado em banho de gelo nas etapas posteriores;

- c) O material foi sonicado por um período de 300 s, com auxílio de ultra-som Bioblock – Scientific – Vibra-cell, para quebrar as paredes celulares;
- d) Separou-se 1 mL do extrato, em ependorff, o qual foi mantido em freezer a -20°C, para posteriores dosagens em triplicatas.

4.5.3.2. Preparação do material para dosagem

A) Carboidrato total:

- a. Após descongelamento e homogeneização do extrato, foi retirada alíquotas de 50 µL, para cada meio, e diluída a 1:100 (50:5000 µL), com água destilada e agitada, para homogeneizar a amostra.

A dosagem colorimétrica foi baseada na técnica Fenol – Ácido Sulfúrico de acordo com o método de Dubois et al. (1956) (Apêndice D).

B) Proteína total: separação, precipitação e purificação:

- a. Após descongelamento e homogeneização do extrato, foi retirada uma alíquota de 500 µL, para cada bioensaio, e diluída com 4500 µL de PBS (1:5 v/v) e agitada em OMNI-MIXER;
- b. Centrifugou-se (centrifuga KUBOTA/KN-70) a 2000 rpm por 15 min., a temperatura ambiente;
- c. O sobrenadante-Sb1 foi retirado e reservado em tubos de ensaio e o precipitado foi lavado com 2000 µL de PBS, agitado e recentrifugado, obtendo-se o sobrenadante-Sb2;
- d. Aos sobrenadantes Sb1 e Sb2 foi adicionado 1500 µL de ácido tricloroacético (TCA - 10%) para precipitar as proteínas e foram centrifugadas a 3000 rpm por 15 min.;
- e. Ressuspendeu-se o precipitado de proteínas em 1000 µL de tampão PBS, para posterior análise.

A dosagem colorimétrica foi realizada segundo o método de Lowry et al. (1951) (Apêndice E).

C) Lipídio total: obtenção do extrato segundo Folch et al. (1957), descrito a seguir:

- a. Após descongelamento e homogeneização do extrato, foi adicionado ao 1 mL do extrato 40 mL da solução de clorofórmio-metanol (2:1, v/v), na seguinte seqüência: acrescentou-se 7 mL de metanol a amostra e agitou-se (Vortex Phoenix AP 56); depois adicionou-se 14 mL de clorofórmio.
- b. Novamente foi agitado e esperou-se 20 min. para precipitação das proteínas; depois foi filtrado em proveta utilizando papel de filtro para retirar o precipitado;
- c. O tubo utilizado e o papel de filtro foi lavado com clorofórmio-metanol (2:1, v/v) até completar o volume de 40 mL;
- d. Adicionou-se 10 mL da solução cloreto de potássio (KCl - 0,05 M) ao filtrado, agitando-se por inversão, para purificação do extrato. O extrato se divide em substâncias solúveis em água, como os íons e metanol, que permanecem na fase aquosa e lipídios, que ficam na fase clorofórmica.
- e. Acondicionou-se as amostras em freezer a -20°C, por 12 horas;
- f. Após, deixar as amostras à temperatura ambiente, mediu-se o volume inferior clorofórmico (o volume final para cada bioensaio foi de 28,5 mL); desprezando a fase superior aquosa;
- g. A solução foi mantida em freezer a -20°C, para posterior análise.

Para a dosagem colorimétrica seguiu-se o método descrito por Frings et al. (1972) (Apêndice F).

4.5.4 Tratamento estatístico

No tratamento estatístico dos dados empregou-se uma análise de variância (ANOVA) com nível de significância de $\alpha=0,05$, com posterior aplicação do teste de Tukey, com o auxílio do programa SANEST (SARRIÉS et al., 1992).

4.5.5 Normalização do texto

Este trabalho foi elaborado de acordo com as instruções normativas da Associação Brasileira de Normas Técnicas: NBR 10520 (ABNT, 2002a); NBR6023 (ABNT, 2002b); NBR 6024 (ABNT, 2003a); NBR 6027 (ABNT, 2003b) NBR 6028 (ABNT, 2003c).

5 RESULTADOS

5.1 Primeira etapa dos bioensaios

5.1.1 Densidade e taxa diária de crescimento celular

As concentrações médias da densidade celular no meio F/2 variaram de $1,14 \pm 0,03$ a $11,05 \pm 1,32 \times 10^6$ céls.mL⁻¹, sendo observado o valor máximo no 6^o dia de cultivo. Já no meio EEG, variou de $1,11 \pm 0,12$ a $8,33 \pm 0,83 \times 10^6$ céls.mL⁻¹ e no meio EEM, variou de $1,22 \pm 0,13$ a $6,86 \pm 0,38 \times 10^6$ céls.mL⁻¹, com valor máximo no 4^o e 8^o dias, respectivamente (Figura 2).

Na curva de crescimento da espécie estudada, apresentada na figura 2, a fase *lag* ocorreu do primeiro para o segundo dia. Já no segundo dia foi observado o início da fase *log* ou exponencial. O final dessa fase variou para os meios F/2, EEG e EEM ocorrendo no 6^o, 4^o e 8^o dia, respectivamente. Na fase *log*, a taxa diária de crescimento celular (K) foi de $0,97 \pm 0,43$ no meio EEG, seguido por $0,65 \pm 0,70$ no meio F/2 e demonstrou crescimento mais lento, com uma taxa média de $0,36 \pm 0,31$ para o meio EEM. A fase estacionária começou a partir desses dias referidos e vai até o 9^o dia para o meio F/2 e o 10^o dia para o meio EEG; não foi observado essa fase para o meio EEM. A fase de senescência ou declínio começou no 9^o, 8^o e 10^o dia, para os meios F/2, EEG e EEM, respectivamente.

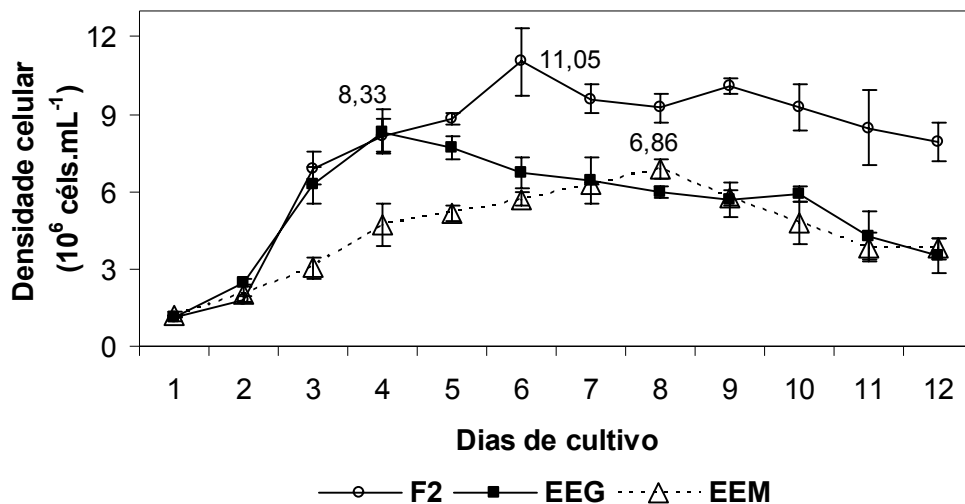


Figura 2. Concentrações médias da densidade celular (10^6 céls.mL⁻¹) e curvas de crescimento de *Chaetoceros muelleri* cultivada nos meios F/2 Guillard (F/2), extrato de esterco de gado (EEG) e extrato de esterco de minhoca (EEM), durante o período de 12 dias de cultivo.

5.1.2 Clorofila a

Os teores de clorofila a não apresentaram grandes variações. Os valores máximos médios de clorofila a foram de $0,34 \pm 0,03$ pg.cél.⁻¹, no 7^o dia, no meio F/2. No meio EEG foi de $0,74 \pm 0,90$ pg.cél.⁻¹, no 9^o dia; e no meio EEM de $2,26 \pm 1,70$ pg.cél.⁻¹, no 12^o dia (Figura 3).

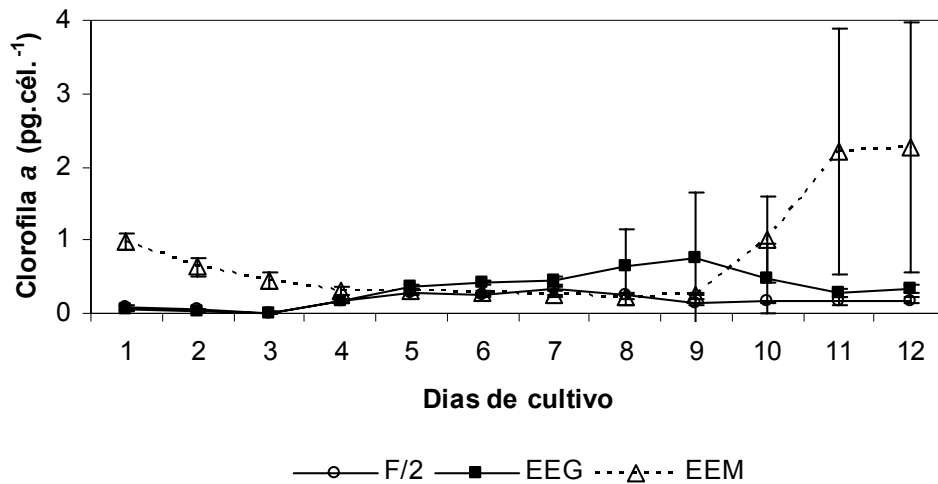


Figura 3. Teores médios de clorofila a (pg.cél.⁻¹) de *Chaetoceros muelleri* cultivada nos meios F/2 Guillard (F/2), extrato de esterco de gado (EEG) e extrato de esterco de minhoca (EEM), durante o período de 12 dias de cultivo.

5.1.3 Biovolume celular

O tamanho da célula de *C. muelleri*, neste experimento, variou em altura (H) de 2,05 a 12,3 μm ; e, na vista valvar apresenta forma elipsóide, com suas medidas variando de 4,1 a 12,3 μm (R: raio maior) e de 2,05 a 12,3 μm (r: raio menor).

Para o primeiro dia de cultivo, os valores médios do biovolume celular de *C. muelleri* foram de $813,07 \pm 1409,68$; $560,45 \pm 347,36$ e $796,97 \pm 658,07$ μm^3 , correspondentes aos meios F/2, EEG e EEM. No entanto, esses dados estão relacionados às células iniciais dos bioensaios que estavam sendo mantidas em tubos de ensaios.

Durante o bioensaio os valores médios do biovolume celular variaram de $395,18 \pm 273,87$ a $528,55 \pm 321,06$ μm^3 , para o meio F/2, e $402,83 \pm 162,36$ a $515,28 \pm 351,87$ μm^3 para o meio EEG, apresentando valores máximos no 5^o dia, para os dois meios. Porém, o meio EEM apresentou variação de $407,28 \pm 207,08$ a $534,17 \pm 454,13$ μm^3 , com valores máximos no 11^o dia (Figura 4).

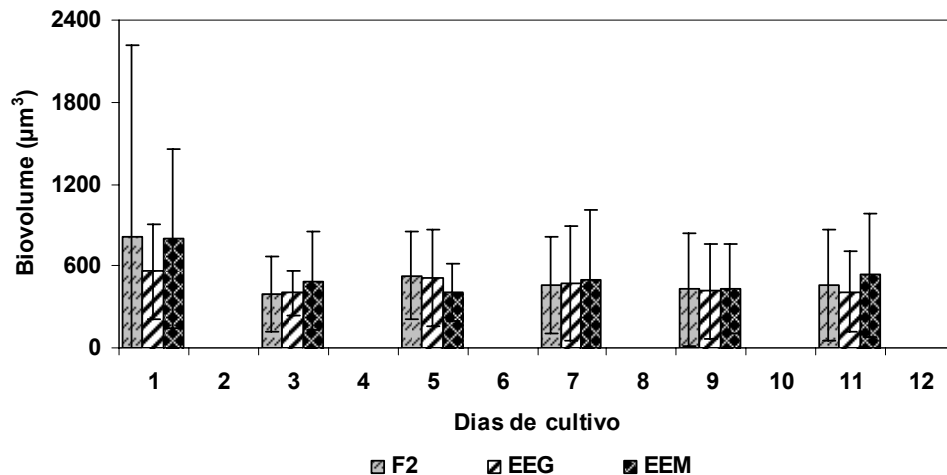


Figura 4. Valores médios do biovolume celular (μm^3) de *Chaetoceros muelleri* cultivada nos meios F/2 Guillard (F/2), extrato de esterco de gado (EEG) e extrato de esterco de minhoca (EEM), durante o período de 12 dias de cultivo.

5.2 Segunda etapa dos bioensaios

5.2.1 Densidade celular

As concentrações médias da densidade celular para o meio F/2 variaram de $1,82 \pm 0,16$ a $21,61 \pm 0,24 \times 10^6$ céls.mL⁻¹. Já para o meio EEG variou de $1,24 \pm 0,31$ a $18,53 \pm 0,43 \times 10^6$ céls.mL⁻¹ e para o meio EEM de $1,92 \pm 0,09$ a $23,07 \pm 0,44 \times 10^6$ céls.mL⁻¹ (Figura 5). O aumento da densidade celular de *C. muelleri* foi proporcional ao aumento do volume do cultivo, para todos os meios testados (Figura 5) e, no volume final (20 L) houve diferenças significativas da densidade celular entre os meios de cultivo (ANOVA: $p = 0,0001$ e Tukey: $p < 0,05$).

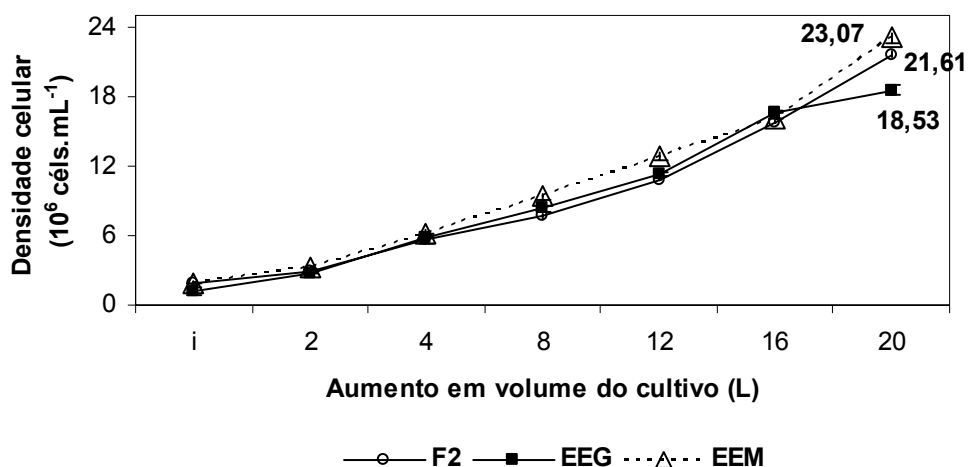


Figura 5. Concentrações médias da densidade celular (10^6 céls.mL⁻¹) de *Chaetoceros muelleri* cultivada nos meios F/2 Guillard (F/2), extrato de esterco de gado (EEG) e extrato de esterco de minhoca (EEM), até volume final de 20 L: i – início do cultivo com 2 L.

5.2.2 Clorofila a

Os teores celulares de clorofila a variaram de $0,73 \pm 0,02$ a $7,80 \pm 0,61 \times 10^{-7}$ pg.cél.⁻¹ para o meio F/2. Para o meio EEG variou de $0,90 \pm 0,01$ a $12,10 \pm 3,02 \times 10^{-7}$ pg.cél.⁻¹ e para o meio EEM de $0,79 \pm 0,05$ a $8,07 \pm 0,10 \times 10^{-7}$ pg.cél.⁻¹. Os valores de clorofila a encontrados na figura 6 são inversamente proporcionais a densidade celular e, para o volume final (20 L) houve diferenças significativas entre os meios de cultivo (ANOVA: $p=0,0008$ e Tukey: $p<0,05$).

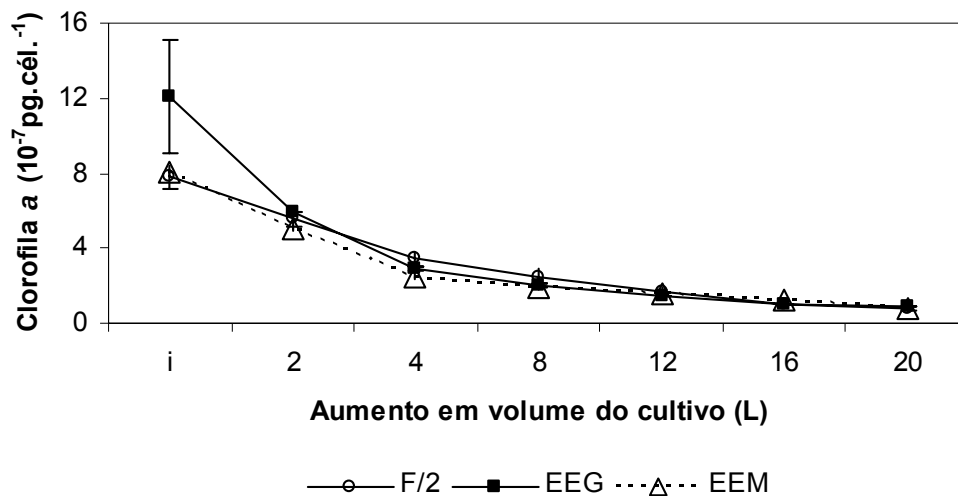


Figura 6. Teores médios de clorofila a (10^{-7} pg.cél.⁻¹) de *Chaetoceros muelleri* cultivada nos meios F/2 Guillard (F/2), extrato de esterco de gado (EEG) e extrato de esterco de minhoca (EEM), até volume final de 20 L: i – início do cultivo com 2 L.

5.2.3 Análises bioquímicas

Os valores descritos a seguir correspondem apenas ao volume final de 20 L dos bioensaios.

Os valores médios de nitrogênio total celular foram de $3,35 \pm 0,06\%$ de matéria seca para o meio EEM, seguido por $2,30 \pm 0,05\%$ de matéria seca, para o meio F/2 e de $1,80 \pm 0,05\%$ de matéria seca, para o meio EEG, havendo diferenças significativas entre os meios testados (ANOVA: $p=0,0000$ e Tukey: $p<0,05$) (Figura 7).

Em relação ao valor médio de lipídio total celular, o meio EEM foi maior, $0,112 \pm 0,001$ pg.cél.⁻¹; que os meios F/2 e EEG, com valores muito próximos, $0,104 \pm 0,001$ e $0,100 \pm 0,001$ pg.cél.⁻¹, respectivamente, havendo diferenças significativas entre os meios testados (ANOVA: $p=0,0273$). O teste de Tukey detectou diferenças significativas entre os meios alternativos ($p<0,05$) embora estes

não sejam diferentes do meio convencional ($p>0,05$) (Figura 7).

No meio EEM, as células, apresentaram o maior valor médio de proteína total, $0,226\pm0,012$ pg.cél.⁻¹, seguido pelos meios F/2, $0,140\pm0,014$ pg.cél.⁻¹ e EEG, $0,125\pm0,001$ pg.cél.⁻¹, com diferenças significativas entre os meios testados (ANOVA: $p=0,0039$). Já, o teste de Tukey detectou diferenças significativas apenas para o meio EEM ($p<0,05$) (Figura 7).

Da mesma forma, o valor médio de carboidrato total celular foi maior para o meio EEM, $36,22\pm1,53$ pg.cél.⁻¹, seguido dos meios EEG, $29,81\pm0,81$ pg.cél.⁻¹ e F/2, $19,76\pm0,85$ pg.cél.⁻¹. Para esse parâmetro houve diferenças significativas entre os meios testados (ANOVA: $p=0,0025$ e Tukey: $p<0,05$) (Figura 7).

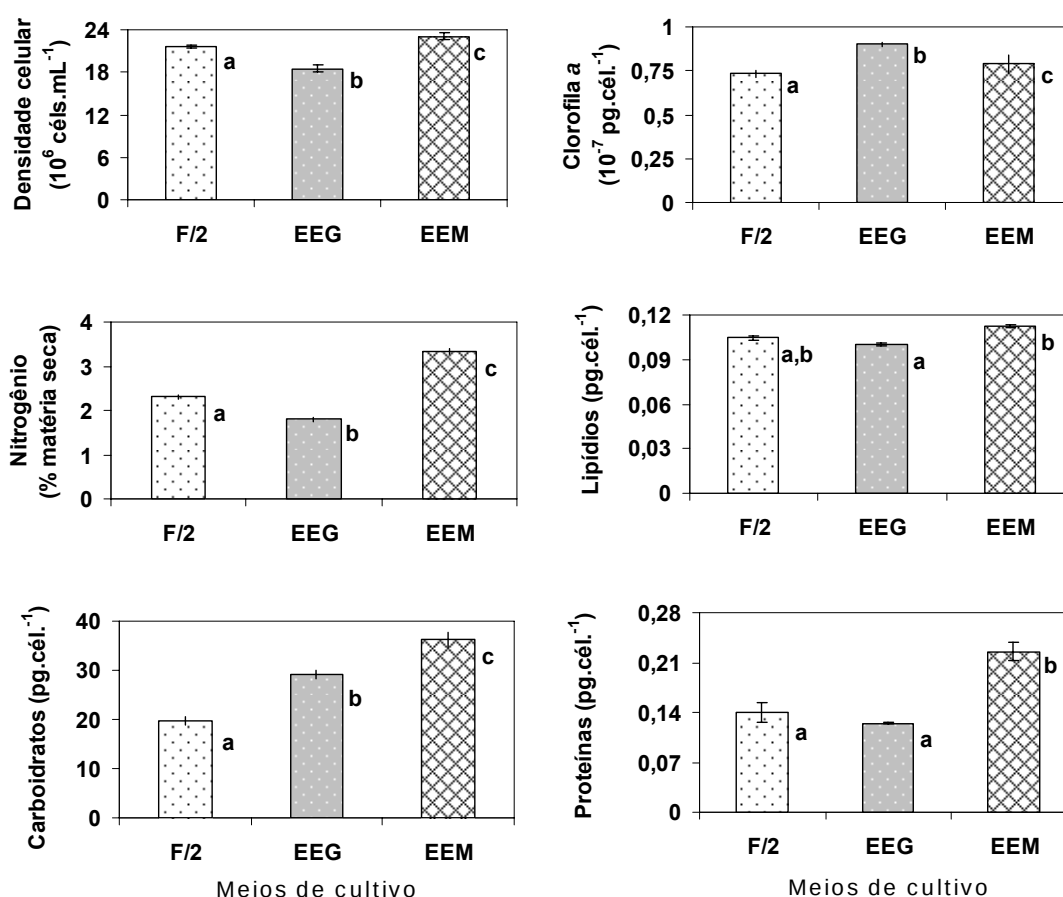


Figura 7. Concentrações médias da densidade celular média (10^6 céls.mL⁻¹), teores médios de clorofila a (10^{-7} pg.cél.⁻¹); valores médios de nitrogênio total (% matéria seca), lípidio total (pg.cél.⁻¹), proteína total (pg.cél.⁻¹) e carboidrato total (pg.cél.⁻¹) de *Chaetoceros muelleri* cultivada nos meios F/2 Guillard (F/2), extrato de esterco de gado (EEG) e extrato de esterco de minhoca (EEM), analisados para o volume final de 20 L: i – início do cultivo com 2 L. Letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância.

6 DISCUSSÃO

6.1 Primeira etapa dos bioensaios

A densidade celular de *C. muelleri*, no meio F/2, mostrou-se mais elevada que a dos meios alternativos, extrato de esterco de gado (EEG) e de minhoca (EEM), como observado na curva de crescimento. Além disso, para o meio EEG foi observado um menor período para alcançar seu pico de crescimento, isto é, o final da fase *log*. O que é interessante em termos de menor tempo de produção microalgal. No entanto, o valor nutricional é outro fator importante e decisivo na escolha da espécie de microalga utilizada como alimento na aquicultura.

Os valores de densidade celular obtidos neste estudo foram maiores que os encontrados por Størseth et al. (2005), para *C. muelleri* ($3,6 \times 10^6$ céls.mL⁻¹) cultivada em 200 L de meio F/2. No entanto, o final da fase *log* coincidiu no 6º dia, para ambos os bioensaios.

Na pesquisa de Göksan et al. (2003) com *C. muelleri*, os valores das concentrações celulares foram maiores ($49,08 \times 10^6$ céls.mL⁻¹) e alcançaram o final fase *log* no sétimo dia. Isso se deve, possivelmente, a área e forma do recipiente de cultivo (20 x 50 cm) e diferentes intensidades de luz que proporcionam menor agrupamento das células.

A determinação da curva de crescimento é importante para todo experimento com cultivo, visto que as fases de crescimento estão diretamente relacionadas à produção de muitos compostos das microalgas, tanto em quantidade como em qualidade. De acordo com Brown (1991); Brown et al. (1997) e Renaud et al. (1999), no final da fase *log* as espécies tendem a acumular carboidratos, como resposta a limitação do nitrogênio utilizado durante a fase *log* para a síntese de proteína.

No presente trabalho, observou-se para o meio EEM uma relação inversa entre os altos valores de biovolume celular e os baixos valores da taxa diária de crescimento. Já nos meios F/2 e EEG, a espécie *C. muelleri* manteve altos valores de biovolume celular, porém altos valores da taxa diária de crescimento. Phatarpekar et al. (2000) estudando a espécie *Chaetoceros calcitrans*, com diâmetro de 8 µm, também encontraram essa relação, ou seja, altos valores de biovolume celular ($267,95 \mu\text{m}^3$) e baixos valores da taxa diária de crescimento (0,48). No entanto, com a espécie *Isochrysis galbana*, de diâmetro 4 µm, foram observados baixos valores

de biovolume ($33,49 \mu\text{m}^3$) e altas taxas diárias de crescimento (1,20).

Essas associações, segundo Fogg (1965), podem ser atribuídas à diferença em tamanho comparativamente entre as espécies, isto é, espécies de tamanhos menores crescem mais rápidas que as de tamanhos maiores, devido à relação superfície-volume das células, o que facilita a assimilação de nutrientes mais rapidamente por espécies de tamanho menores. No entanto, esse fator não foi observado para os meios F/2 e EEG, o que se deve provavelmente por outros fatores como diferentes concentrações dos nutrientes nos meios.

6.2 Segunda etapa dos bioensaios

Vários autores, estudando a mesma espécie deste trabalho, em meio F/2, na fase exponencial, registraram valores menores de concentrações celulares. Parrish et al. (1998), cultivando de 4 a 85 L, encontraram concentrações celulares de $7,1 \pm 2,6 \times 10^6$ céls.mL⁻¹, em meio semi-contínuo entre 25 e 26°C, por 28 dias e Liang et al. (2006), cultivando 2 L em diferentes fontes de nitrogênio encontrou uma variação de 6,65 a $7,01 \times 10^6$ céls.mL⁻¹, a 18°C.

López-Elías et al. (2005) obtiveram também densidades celulares menores, cultivando por 42 h, 300L da mesma espécie, em recinto fechado ($2,02 \times 10^6$ céls.mL⁻¹), entre 21 e 27°C e, ao ar livre ($2,94 \times 10^6$ céls.mL⁻¹), entre 13 e 37°C; e tanques de 3000 L em recinto fechado ($0,97 \times 10^6$ céls.mL⁻¹) e ao ar livre ($1,75 \times 10^6$ céls.mL⁻¹). Essas diferentes concentrações celulares, nas pesquisas citadas, com a mesma espécie, podem ocorrer devido a um fator ou a combinação de muitos fatores, como temperatura, nutrientes, luz, tempo de cultivo, fase de crescimento da microalga, dentre outros.

Embora não se tenha encontrado trabalhos com *C. muelleri* cultivada em meios alternativos, os valores obtidos para os meios EEG e EEM foram maiores, quando comparados com Yamashita e Magalhães (1984b) que encontraram $1,7 \times 10^6$ céls.mL⁻¹ para *Tetraselmis chuii*, em meio alternativo adubo foliar (2 gotas em 1 L de água do mar) a 22-29°C; Klein e Gonzalez (1993), cultivando a espécie *T. chuii*, observaram densidades de $2,01 \times 10^6$ céls.mL⁻¹ em meio caldo de peixe (5 mL em 1 L de água do mar) e de $1,52 \times 10^6$ céls.mL⁻¹ em meio vinhoto (5 mL em 1 L de água do mar), a 24°C.

Na mesma temperatura, Koenig et al. (1990b) encontraram $0,61 \times 10^6$ céls.mL⁻¹ para *Tetraselmis tetrahele*, em meio água residual de matadouro (280 mL em 1 L de água do mar). Do mesmo modo, como observado para o meio convencional (F/2), nos meios alternativos foram determinadas diferentes densidades celulares, demonstrando a mesma complexidade já citada. Para os meios alternativos a concentração correta de nutrientes torna-se o fator mais importante para o melhor desenvolvimento das microalgas. E, assim como foram necessários muitas pesquisas para se obter os meios convencionais é indispensável mais estudos com os meios alternativos.

A determinação da clorofila *a* é um dos componentes celulares que auxilia para calcular a biomassa da microalga em cultura e pode ser usada para medir o crescimento microalgal (VALENZUELA-ESPINOZA et al., 2002).

O trabalho de Nelson et al. (1992) foi o único encontrado que pesquisou a clorofila *a* e composição bioquímica da espécie *C. muelleri*, em meio F/2 e no final da fase exponencial, a 30°C. Os autores encontraram valores de clorofila *a* em baixa irradiação (0,82 pg.cél.⁻¹) e alta irradiação (0,60 pg.cél.⁻¹), os quais foram maiores que os relatados neste trabalho.

Em relação aos meios alternativos testados, os teores de clorofila *a* foram menores que os registrados por Valenzuela-Espinoza et al. (2002), para a espécie *Isochrysis galbana*, cultivada no período de 8 dias em meio fertilizante orgânico (0,41 pg.cél.⁻¹), na fase log, a 20°C e por Lourenço et al. (1997), para *Tetraselmis gracilis*, em 4,5 L de meio comercial modificado, a 21°C, com valores de 2,35 pg.cél.⁻¹, na metade da fase log; de 1,53 pg.cél.⁻¹, no final da fase log; e de 1,22 pg.cél.⁻¹, na fase estacionária.

No presente estudo não se observou relação direta ou indireta da densidade com a clorofila *a*, como relataram López –Muñoz et al. (1992) e Saoudis-Helis et al. (1999), os quais afirmam que quanto maior a densidade, tanto maior serão os teores de clorofila *a*, pois a alta concentração de células diminui a irradiação dentro do recipiente de cultivo, fazendo com que as células produzam mais clorofila.

No entanto, os valores de clorofila *a* celular nos meios EEG e EEM foram

maiores que no meio F/2, e isso se deve provavelmente a quantidade de partículas nos meios alternativos que diminui a irradiação, concordando com a afirmação acima que relaciona a irradiação e a produção de clorofila.

As microalgas são usadas como uma fonte de alimento para estágios larvais de muitas espécies de interesse comercial para aquicultura. O valor alimentar de cada espécie de microalga depende da interação entre sua composição e as exigências metabólicas e nutricionais do organismo consumidor (HOLF; SNELL 1999; LORA-VILCHIS; DOKTOR, 2001).

De acordo com Poulet e Marsot (1978) e Huntley et al. (1983) o zooplâncton é capaz de discriminar células entre uma mistura alimentar com diferentes espécies de algas. Isso nos leva a afirmar a importância de estudos sobre as propriedades nutricionais das microalgas.

No meio EEM, *C. muelleri* apresentou valor de nitrogênio total igual ao de *I. galbana* (3,35% de matéria seca), cultivada em 2 L de meio Conway por Barbarino e Lourenço (2005), em ciclo de luz:escuro (12:12), a 23 e 20°C, respectivamente. Nesse mesmo estudo, a espécie *Skeletonema costatum* apresentou valores maiores (3,41% de matéria seca) que os desta pesquisa. O nitrogênio tem papel importante na constituição das microalgas, pois este é matéria prima para seu metabolismo, sendo, componente das proteínas, assim como, do DNA, dentre outros.

Webb e Chu (1983) revisaram o papel dos componentes bioquímicos no fitoplâncton e concluíram que o lipídio é o mais importante para larva de bivalve. Porém, o teor de lipídio de microalga parece ser altamente variável e relacionado às condições de cultivo.

A produção e armazenamento de lipídios, com respeito a fatores ambientais, são específicas para espécies de microalga, dificultando fazer generalizações. Porém, baseado na literatura, o conteúdo lipídico de diatomáceas aumenta quando culturas alcançam a fase estacionária, devido a um fator limitante, como silicato ou níveis de nitrogênio (PERNET et al., 2003).

Dentre os lipídios, os glicolipídios e fosfolipídios são componentes essenciais da tilacóide e membrana celular em microalgas. E outros, como os triglicérides, têm função de armazenar energia celular (CHAUTON et al., 2004).

Em relação aos lipídios, os valores encontrados no presente trabalho foram muito próximos e baixos, quando comparados com os dados obtidos, para a microalga *C. muelleri*, por Nelson et al. (1992), sob baixa irradiação ($4,18 \text{ pg.cél.}^{-1}$) e alta irradiação ($6,57 \text{ pg.cél.}^{-1}$).

Valores de lipídios igualmente inferiores foram encontrados por Valenzuela-Espinoza et al. (2002), para a espécie *I. galbana*, $10,6 \text{ pg.cél.}^{-1}$, no meio fertilizante orgânico, na transição da fase *lag* para *log* e por Lourenço et al. (1997), para a microalga *T. gracilis* que apresentou valores de lipídios de $44,42 \text{ pg.cél.}^{-1}$, na metade da fase *log*; de $41,10 \text{ pg.cél.}^{-1}$, no final da fase *log*; e de $33,12 \text{ pg.cél.}^{-1}$, na fase estacionária.

As proteínas são componentes principais das células durante a fase exponencial de crescimento, no entanto na fase estacionária, elas são substituídas por produtos de armazenamento (STRICKLAND, 1965; MYKLESTAD E HAUG, 1972; HEALEY, 1973; DORTCH et al., 1984; UTTING, 1985).

Os teores de proteína, em *C.muelleri*, foram menores que os valores relatados por Nelson et al. (1992) sob baixa irradiação ($13,42 \text{ pg.cél.}^{-1}$) e alta irradiação ($0,60 \text{ pg.cél.}^{-1}$), durante a fase exponencial.

Nos meios alternativos, os teores de proteína, também, foram menores que os valores registrados por Valenzuela-Espinoza et al. (2002), para a espécie *I. galbana*, que encontraram $7,6 \text{ pg.cél.}^{-1}$, no meio fertilizante orgânico, na fase *log*; e por Lourenço et al. (1997), para *T. gracilis* com valores de $179,61 \text{ pg.cél.}^{-1}$, na metade da fase *log*; de $229,81 \text{ pg.cél.}^{-1}$, no final da fase *log*; e de $108,07 \text{ pg.cél.}^{-1}$, na fase estacionária.

Diferentemente dos lipídios e proteínas, para *C. muelleri*, as quantidades de carboidratos por célula, neste estudo, foram maiores que as encontradas por Nelson et al. (1992) sob baixa irradiação ($3,36 \text{ pg.cél.}^{-1}$) e alta irradiação ($4,97 \text{ pg.cél.}^{-1}$).

Em relação aos meios alternativos, os valores de carboidrato total, também, foram superiores àqueles registrados por Valenzuela-Espinoza et al. (2002), para a espécie *I. galbana*, de $10,5 \text{ pg.cél.}^{-1}$, no meio fertilizante orgânico, na transição da fase *lag* para *log*; e menores que os de Lourenço et al. (1997), para *T. gracilis*, de $110,84 \text{ pg.cél.}^{-1}$, na metade da fase *log*; de $77,13 \text{ pg.cél.}^{-1}$, no final da fase *log*; e de $119,10 \text{ pg.cél.}^{-1}$, na fase estacionária.

Os valores obtidos para os carboidratos foram maiores em relação aos de proteínas e lipídios, o que caracteriza o final da fase *log* e início da fase estacionária, como já foi referenciado. Essa relação também pode ser observada na pesquisa de Nelson et al. (1992), na qual os maiores valores são dos carboidratos (baixa irradiação) ou lipídios (alta irradiação).

No trabalho de Valenzuela-Espinoza et al. (2002), observou-se a relação do decréscimo na produção de carboidratos e lipídios, na fase *log* e o aumento em proteínas, característico dessa fase. Lourenço et al. (1997), examinaram as fases *log* e estacionária, constatando a relação das fases de crescimento com a composição bioquímica: na metade da fase *log* as proteínas são maiores que os carboidratos e lipídios; no final da fase *log*, a produção de proteínas aumenta e os carboidratos e lipídios diminuem e na fase estacionária, ocorre uma inversão, ou seja, a produção de carboidratos cresce e a de proteínas, decresce. Esses aspectos validam a seriedade da necessidade de mais pesquisas relacionadas à composição bioquímica e sua variação ao longo das fases de crescimento das microalgas.

Além das diferenças significativas do meio alternativo extrato de esterco de minhoca (EEM) em relação ao meio convencional (F/2) houve um ganho de produtividade para os parâmetros estudados, com exceção apenas ao lipídio que não teve diferenças significativas. Já o meio alternativo extrato de esterco de gado (EEG) teve uma maior produção em relação ao meio convencional (F/2) somente quanto aos parâmetros clorofila *a* e carboidratos, apresentando diferenças significativas. Dessa forma, entre os meios analisados o meio EEM é o mais indicado para substituir o meio convencional, pois foi o mais produtivo dos meios; com ressalva apenas na produção de lipídios, porém, mesmo sem diferenças significativas, apresentou maior valor que o meio convencional (F/2).

7 CONCLUSÕES

➤ Para a diatomácea *Chaetoceros muelleri*, evidenciou-se que em diferentes meios de cultivo obtêm-se diferenças quanto ao final da fase exponencial, isto é, o dia de máximas concentrações celulares.

➤ Os teores dos compostos bioquímicos analisados, tanto nos meios alternativos (extrato de esterco de gado e extrato de esterco de minhoca) como no meio convencional (F/2 Guillard), apresentaram relação entre si, correspondendo ao esperado para o final da fase exponencial, como referido em literatura especializada.

➤ Os maiores valores de clorofila *a* celular nos meios EEG e EEM em relação ao meio F/2, demonstram que existe uma relação entre a irradiação e a produção de clorofila, visto que isso se deve provavelmente a quantidade de partículas nos meios alternativos que diminui a irradiação fazendo com que as células produzam mais clorofila.

➤ A avaliação da densidade celular, clorofila *a* e composição bioquímica, demonstrou que o meio extrato de esterco de minhoca obteve os maiores valores confirmados pelas diferenças significativas ($p < 0,05$) dos parâmetros testados em relação ao meio F/2 Guillard. Assim, o meio alternativo, extrato de esterco de minhoca, pode ser utilizado como fonte nutritiva para o desenvolvimento algal e substituir meios convencionais diminuindo os custos da produção de grandes volumes de microalgas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAGÃO, E. A.; VIEIRA, A. A. H. O cultivo de microalgas de águas continentais e marinhas no Brasil. In: BICUDO, C. E. M.; TEIXEIRA Cl. (Org.). **Algas: a energia do amanhã**. INSTITUTO OCEANOGRÁFICO, USP, v. 1, p. 1-5, 1986.
- ARAUJO, S. C.; GARCIA, v. M. T. Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros* cf. *wighamii* Brightwell under different temperature, salinity and carbon dioxide levels: I. Protein, Carbohydrates and Lipids. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 246, p. 405-412, 2005.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6024**: Numeração progressiva das seções de um documento: procedimento. Rio de Janeiro, 2003a.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6027**: Sumários: procedimento. Rio de Janeiro, 2003b.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6028**: Resumos: procedimentos. Rio de Janeiro, 2003c.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10520**: Informação e documentação: citações em documentos: apresentação. Rio de Janeiro, 2002a
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002b
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official methods of analysis**. 15th ed, Washington, D. C., 1990.
- BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. O. An evaluation of methods for extraction and quantification of protein content of marine macro- and micro-algae. **Journal of Applied Phycology**, Grã-Bretanha, v. 17, n. 4, p. 453-461, 2005.
- BASSFELD, J. C.; FERNANDES, L. F.; BRANDINI, F. P. Avaliação de um bioensaio de multiespécies utilizando fitoplâncton marinho natural. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente Pesticidas**, Curitiba, v. 9, p. 75-84, 1999.
- BECKER, E. W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. New York: Cambridge University Press, 1995, 293 p.
- BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. v.; BERTOLIN, T. B. P.; COLLA, L. M.; HEMKEMEIER, M. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* a partir de efluente suíno sintético. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 118-125, 2005.
- BEZERRA NETO, E.; ANDRADE, A. G.; BARRETO, L. P. **Análise Química de Tecidos e Produtos Vegetais**. Recife: UFRPE, 1994, 99p.
- BOROWITZKA, M. A. Economic evaluation of microalgal process and products. In:

- COHEN, Z. (ed). **Chemicals from microalgae**. UK: Taylor & Francis, 1999, cap.16, p. 387-409.
- BOROWITZKA, M. A. Vitamins and fine chemicals from micro-algae. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. (ed). **Micro-algae biotechnology**. Cambridge: Cambridge University Press. 1988, cap. 7, p.153 -196.
- BRAGA, E. S. **Bioquímica marinha e efeitos da poluição nos processos bioquímicos**. FUNDESPA. São Paulo, 2002,108 p.
- BROWN, M. R.; JEFFREY, S. W.; VOLKMAN, J. K.; DUNSTAN, G. A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 151, p. 315 – 331, 1997.
- BROWN, M. R. The amido-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 145, p. 79 – 99, 1991.
- CABRALES, M. M. Q.; GONZÁLEZ, M. F. Utilización de residual aviar como fuente de nutrientes en cultivos de microalgas. **Centro de Investigaciones de Energia Solar. MEDISAN**, v. 8, n. 3, p. 27-31, 2004.
- CASTRO, A. R. C. Utilização de adubo orgânico em cultura de fitoplâncton. **Instituto de Pesquisa Agropecuária do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO)**, Rio de Janeiro, 1979, 2p.
- CHAUTON, M. S.; Størseth, t. R.; Krane, J. High-resolution magic angle spinning nmr analysis of whole cells of *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae) and comparison with ¹³C-nmr and distortionless enhancement by polarization transfer ¹³C-nmr analysis of lipophilic extracts. **J. Phycol.** v. 40, p. 611–618. 2004.
- CHU, F. L. E.; DUPUY, J. L.; WEBB, K. L. Polysaccharide composition of five algal species used as food for larvae of american oyster, *Crassostrea virginica*. **Aquaculture**, v. 29, n. 3/4, p. 241 – 252, 1982.
- COHEN, Z. *Prophyridium cruentum*. In: COHEN, Z. (ed). **Chemicals from microalgae**. UK: Taylor & Francis. 1999, cap.1, p. 1 – 24.
- COLLA, L. M.; COSTA, J. A. v.; DUARTE FILHO, P. *Spirulina platensis* growth in open raceway ponds using fresh water supplemented with carbon, nitrogen and metal ions. **Zeitschrift Für Naturforschung C-A Journal Of Biosciences**, Germany, v. 58C, p. 76-80, 2002a.
- COLLA, L. M.; RUIZ, W. A.; COSTA, J. A. v. Metabolismo de carbono e nitrogênio na microalga *Spirulina platensis*. **Revista Vetor**, Rio Grande, v. 12, p. 48-61, 2002b.
- COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; DUARTE FILHO, P. Improving *Spirulina platensis*

- biomass yield using a fed-batch process. **Bioresource Technology**, v. 92, n. 3, p. 237-241, 2004a.
- COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M.; BERTOLIN, T. E. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. **Zeitschrift Für Naturforschung C-A Journal Of Biosciences**, KEMPTEN, v. 59, n. c, p. 55-59, 2004b.
- COSTA, J. A. V.; COZZA, K.; SANTOS, L. O.; MAGAGNIN, G. Different nitrogen sources and growth responses of *Spirulina platensis* in microenvironments. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 17, p. 439-442, 2001.
- COSTA, J. A. V.; COZZA, K. Lipídios em *Spirulina*. **Revista Vetor**, Rio Grande, v. 10, p. 69-80, 2000.
- COSTA, R. A. A. M.; KOENING, M. L.; MACÊDO, S. J. Urban secondary sewage: an alternative medium for the culture of the *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae) and *Dunaliella viridis* (Chlorophyceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Paraná, v. 47, n. 3, p. 451-459, 2004.
- COSTA, R. A. A. M.; KOENING, M. L.; FEITOSA, F. A. N. Influência de diversas concentrações de cloro nas populações fitoplanctônicas do estuário do rio Botafogo (Itamaracá - PE), **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 37, p. 877 – 888, 1994.
- DE PAUWN, N.; PERSOONE, G. Micro-algae for aquaculture. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. (Ed.) **Micro-algal Biotechnology**. Sydney: Cambridge University Press, 1988, cap. 08, 477 p.
- DORTCH, Q.; CLAYTON, J. R. Jr.; THORESEN, S. S.; AHMED, S. I. Species differences in accumulation of nitrogen pools in phytoplankton. **Mar. Biol.**, v.81,p. 237–250, 1984.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars, add related substances. **Anlytical Chemistry**. v. 5, p. 5-38, 1956.
- EDLER, L, Recomendations on methods for marine biological studies in the Baltic Sea, Phytoplankton and chlorophyll, **The Baltic Marine Biologist**, Sweden, v. 5, p. 5-38, 1979.
- FABREGAS, J., HERRERO, C.; CABEZAS, B.; ABALDE, J. Mass culture and biochemical variability of the marine microalgae *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) with high nutrients concentrations, **Aquaculture**. Amsterdam, v. 49, p. 231-244,

1985.

- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Planning of aquaculture development**. Great Britain: Combelds Limited. 1977, v. 1, 71 p.
- FIDALGO J. P.; CID, A.; TORRES, E.; SUKENIK, A.; HERRERO, C. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalga *Isochrysis galbana*. **Aquaculture**. Amsterdam, v. 166, p. 105-116, 1998
- FOGG, G. E. **Algal Cultures and Phytoplankton Ecology**. The University of Wisconsin Press, Madison, WI, 1965. 126 p.
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE-STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **Journal Biology Chemical**. v. 226, p. 497, 1957.
- FRINGS, C. S.; FENDLEY, T. W.; DUNN, R. T.; QUEEN, C. A. Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phospho-vanilin reaction. **Clin. Chem**. v.18, p. 673, 1972.
- GÁLVEZ, A. O.; DERNER, R.; BUITRAGO, E.; PINASCO, K. Crecimiento de *Chaetoceros calcitrans* en ambiente cerrado y abierto bajo diferentes fotoperiodos y medios nutritivos. **Revista Memória**, Nueva Esparta, v. 54, n. 142, p. 03-08, 1994.
- GÖKSAN, T.; DURMAZ, Y.; GÖKPINAR, S. Effects of light path lengths and initial culture density on the cultivation of *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898) **Aquaculture**. Amsterdam, v. 217 p. 431–436. 2003.
- GOLDMAN J. C. Physiological aspects in algal mass cultures. In: SHELEF G., SOEDER C. J. (Ed.), **Algae Biomass**, Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1980, p. 343 - 359.
- GONZALEZ-RODRIGUEZ, E.; MAESTRINI, S. Y. The use of some agricultural fertilizers for the mass production of marine algae. **Aquaculture**. Amsterdam, v. 36, p. 245-256, 1984
- GRASSHOFF, K.; EHRARDT, M.; KREMELIN, K. **Methods of sea water analysis**. 2 ed. New York: Verlag Chemie. 1983. 317 p.
- GUILLARD, R. R. L. Cultures of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: SMITH, W. L.; CHANLEY, M. H., Ed., **Culture of marine invertebrates animals**, Plenum Publish. Co., New York, 1975, p. 29 – 60.
- GUILLARD, R. R. L. Division rates. In: STEIN, J. R. **Handbook of phycological**

- methods – culture methods and measurements.** Cambridge University Press, 1973, p. 289-313.
- GUIMARÃES, S. C. P.; RÖRIG, L. R. Efeito da salinidade no crescimento dos dinoflagelados *Prorocentrum micans* Ehrenberg e *Prorocentrum* cf. *obtusum* Ostenfeld isolados da costa catarinense - Brasil. **Revista Estudos de Biologia**, Curitiba, v. 26, n. 54, p. 29-36, 2004.
- HEALEY, F. P. The inorganic nutrition of algae from an ecological view point. **CRC Crit. Rev. Microbiol.** v. 3, p. 69–113. 1973.
- HENRIQUES, N. M.; NAVALHO, J. C.; VARELA, J. C.; CANCELA, M. L. Biotecnologia de microalgas: *Dunaliella*: uma fonte natural de beta-caroteno com potencialidades de aproveitamento biotecnológico. **Boletim de Biotecnologia**, n. 61, p 12-18. 1998.
- HOLF, F. H.; SNELL, T. W. **Plankton Culture Manual**, 5th edn. Florida Aqua Farms, Dade City, FL, USA, 1999. 160p.
- HUNTLEY, M. E.; BARTHEL, K. G.; STARR, J. L. Particle rejection by *Calanus pacificus*: discrimination between similarly sized particles. **Mar. Ecol. Prog.**, v. 20, p.151–160. 1983.
- KLEIN, v. L. M.; GONZALEZ, W. A. A. Cultivo da microalga *Tetraselmis chuii* Prings em diferentes meios de cultura. **Ciên. Agron.** Fortaleza, v. 24, n. 1/2, p. 91-100, 1993.
- KOENING, M. L.; LACERDA, S. R.; BARTOLOMEU, C. C.; PASSAVANTE, J. Z. O.; COSTA, K. M. P. Cultivo em laboratório de *Tetraselmis chuii* e *Tetraselmis tetrathele* (Chlorophyceae) com fertilizantes orgânicos. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 33 n. 1, p. 91-103, 1990a.
- KOENING, M. L.; MAIA, P. R.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Composição bioquímica de *Tetraselmis tetrathele* (West. G. S) Butcher (Chlorophyceae) cultivada com fertilizante orgânico. **Revista Biológica Brasileira**, v. 2, n. 1, p. 23 – 38, 1990b.
- KOENING, M. L.; PASSAVANTE, J. Z. O.; BARTOLOMEU, C. C.; COSTA, K. M. P. O vinhoto no cultivo de microalgas. **Gayana**, v. 45, n. 1-4, p. 253 – 263, 1988.
- LAVÍN, P. L.; LOURENÇO, S. O. An evaluation of the accumulation of intracellular inorganic nitrogen pools by marine microalgae in cultures. **Brazilian Journal of Oceanography**, São Paulo, v. 53, n.1/2, p. 55-68, 2005.
- LIANG, Y.; BEARDALL, J.; HERAUD, P. Effects of nitrogen source and UV radiation on the growth, chlorophyll fluorescence and fatty acid composition of

- Phaeodactylum tricornutum* and *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). **Journal of Photochemistry and Photobiology Biology**, v. 82, p.161–172. 2006.
- LÓPEZ-ELÍAS, J. A.; VOLTOLINA, D.; ENRÍQUEZ-OCAÑA, F.; GALLEGOS-SIMENTAL, G. Indoor and outdoor mass production of the diatom *Chaetoceros muelleri* in a mexican commercial hatchery. **Aquacultural Engineering**, v. 33, p. 181-191. 2005.
- LÓPEZ-MUÑOZ, I.; ABALDE, J.; HERERRO, C. Crecimiento y contenido de pigmentos de cuatro especies de microalgas marinas cultivadas com diferentes temperaturas e intensidad de luz. **Nova acta científica compostelana**, v. 34, p. 59-65. 1992.
- LORA-VILCHIS, M. C.; DOKTOR, N. Evaluation of seven algal diets for spat of the pacific scallop *Argopecten ventricosus*. **Journal of the World Aquaculture Society**, .v. 32, p. 228-235. 2001.
- LOURENÇO, S. O.; BARBARINO, E.; LAVÍN, P.L.; LANFER MARQUEZ, U. M.; AIDAR, E. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Calculation of new nitrogen-to-protein conversion factors. **European Journal of Phycology**, Cambridge, U.K., v. 39, n. 1, p. 17-32, 2004.
- LOURENÇO, S. O.; BARBARINO, E.; MANCINI-FILHO, J.; SCHINKE, K. P.; E. AIDAR, E. Effects of different nitrogen sources on growth and biochemical profile of ten marine microalgae under batch cultures: an evaluation for aquaculture. **Phycologia**, Lawrence, KS, U.S.A., v. 41, n. 2, p. 158-168, 2002.
- LOURENÇO, S. O.; BARBARINO, E.; LANFER MÁRQUEZ, U. M.; AIDAR, E. Distribution of intracellular nitrogen in marine microalgae: Basis for the calculation of specific nitrogen-to-protein conversion factors. **Journal of Phycology**, Estados Unidos, v. 34, n. 5, p. 798-811, 1998.
- LOURENÇO, S. O.; MARQUEZ, U. M. L.; MANCINI-FILHO, J.; BARBARINO, E.; AIDAR, E. Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis* I. Comparison of two culture media. **Aquaculture**. Amsterdam, v. 148, p. 153 – 158, 1997.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, p. 265–275. 1951.
- MAESTRINI, S. Y.; GONZALEZ-RODRIGUES, E. Relative yields of marine algae grown in heavily nutrient enriched seawater. **La Mer**. Tokyo, v. 21, n. 3, p. 1145-1150, 1983.

- MELO, G. N.; SASSI, R.; ARAÚJO, T. F. H. Crescimento de *Phaeodactylum tricornutum* BOHLIN (Bacillariophyta) em água do mar enriquecida com soluções derivadas a decomposição de algas arribadas com meio de cultura. **Revista Nordestina de Biologia**, v. 8, n. 1, p. 45 – 53, 1993.
- MINISTERIO DA EDUCAÇÃO. **Aqüicultura**. Editora Ideal. Brasília. 2006. 32 p.
- MOURA JUNIOR, A. M.; BEZERRA NETO, E.; KOENING, M. L.; ESKINAZI-LEÇA, E. Composição química de microalgas em cultivo semi-intensivo: *Chaetoceros gracilis* Schutt, *Isochrysis galbana* Parke e *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) G. Fryxell & Hasley. **Revista Ciência Agronômica**. Ceará, v. 37, n.2, p. 142-148, 2006.
- MYKLESTAD, S.; HAUG, A., Production of carbohydrates by the marine diatom, *Chaetoceros affinis* var. *Willei* (Gran) Hustedt: 1. Effect of the concentration of nutrients in the culture medium. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, v. 9, p. 125–136. 1972.
- NASCIMENTO, R, C, C., **Crescimento da *Thalassiosira fluviatilis* (HUSTED), em diferentes intensidades de luz e fotoperíodos**. Dissertação. Recife, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2003, 112p.
- NASCIMENTO, I. A.; PEREIRA, S. A. Condições de cultivo de algas diatomáceas selecionadas como alimento para larvas de peneídeos. **Ciencias Naturales La Salle**, Punta de Piedra-I Margarita, v. 4, n. 48, p. 21-52, 1988.
- NELSON, J. R.; GUARDA, S.; COWELL, L. E.; HEFFERNAN, P. B. Evaluation of microalgal clones for mass culture in a subtropical greenhouse bivalve hatchery: growth rates and biochemical composition at 30°C. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 106, p. 357-377, 1992.
- OLIVEIRA, A. A. G.; KOENING, M. L. Crescimento exponencial de *Tetraselmis chuii* com fertilizantes orgânicos. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 27, n. 3, p. 293 - 298. 1984.
- OLIVEIRA, D. B. F. Utilização de caldo de peixe em decomposição em culturas de microalgas. **EMPARN**, Natal, 2 p., 1981
- PANIAGUA-MICHEL, J; FARFAN, B. C.; BUCKLE-RAMIREZ, F. Culture of marine microalgae with biodigested resources. **Aquaculture**. Amsterdam, v. 64, n. 3, p. 249-256, 1987.
- PARRISH, C. C.; WELLS, J. S.; YANG, Z.; DABINETT, P. Growth and lipid composition of scallop juveniles, *Placopecten magellanicus*, fed the flagellate *Isochrysis galbana* with varying lipid composition and the diatom *Chaetoceros*

- muelleri*. **Marine Biology**, v. 133, p. 461-471. 1998.
- PEREIRA NETO, J. B. **Crescimento da *Thalassiosira pseudonana* submetida a diferentes intensidades de luz e fotoperíodos**. 2004, 109p. Monografia (Graduação em Engenharia de Pesca). Universidade Federal Rural de Pernambuco. [2004].
- PERNET, F.; TREMBLAYB, R.; DEMERSC, E.; ROUSSYD, M. Variation of lipid class and fatty acid composition of *Chaetoceros muelleri* and *Isochrysis* sp. grown in a semicontinuous system. **Aquaculture**. Amsterdam, v. 221, p.: 393–406, 2003.
- PHATARPEKAR, P. v.; SREEPADA, R. A.; PEDNEKAR, C.; ACHUTHANKUTTY, C.T. A comparative study on growth performance and biochemical composition of mixed culture of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans* with monocultures. **Aquaculture**, v. 181, p. 141–155; 2000.
- PINHEIRO, A. C. A. S.; ABRUNHOSA, F. A.; COSTA, R. A. A. M. Culture of *Dunaliella viridis* (Volvocales: Chlorophyceae) under different salinities. **Trabalhos Oceanográficos da Universidade Federal de Pernambuco**, Recife-Pe, v. 30, n. 2, p. 97-103, 2002.
- POULET, S. A.; MARSOT, P. Chemosensory grazing by marine calanoid copepods (Arthropoda: crustacean). **Science**, v. 200, p. 1404–1405. 1978.
- PULZ, O.; GROSS W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 2004.
- REINKE, D, C, Ultrastructure of *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae): auxospore, resting spore and vegetative cell morphology, **Jounal Phycology**, v. 20, p. 153-155, 1984.
- RENAUD, S. M.; THINH, L.; PARRY, D. L. The gross chemical composition and fatty acid composition of 18 species tropical Australian microalgae for possible use in mariculture. **Aquaculture**. Amsterdam, v. 170, p. 147 – 159, 1999.
- RIGOBELLO-MASINI, M.; AIDAR, E.; MASINI, J. C. Extra and intracelular activities or carbonic anhidrase of the marine microalga *Tetraselmis gracilis* (Chlorophyta). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 267- 272, 2003.
- ROUND, F. E., CRAWFORD, R. M., MANN, D. G. **The diatoms: biology & morphology of the genera**. Cambridge: Cambridge University Press, 1992. 747p.
- SARRIÉS, G. A.; OLIVEIRA, J. C. v.; ALVES, M. C. SANEST, Série didática, nº 06, Centro de Informática da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 70 p. 1992.
- SAUODIS-HELIS, L.; DUBACQ, J. P.; MARTY, Y.; SAMAIN, J. F.; GUDIN, C.

- Influence of growth rate on pigmente and lipid composition of the microalgae *Isochrysis* aff. *galbana* clone T.. **Journal applied to phycology**, v. 6, p. 315-322. 1999.
- SILVA, F. C.; PEREIRA, A.; CANOZZI, M. B.; ARAÚJO, S. C. Cultivo de microalgas marinhas. In: POLI, C. R.; POLI, A. T. B.; ANDREATTA, E. R.; BELTRAME, E. (Org.). **Aquicultura - Experiências Brasileiras**. 1 ed. Florianópolis, 2004.
- SIMON, C. M. The culture of the diatom *Chaetoceros gracilis* and its use as a food for penaeid protozoal larvae. **Aquaculture**, v.14, p. 105–113. 1978.
- SMITH, L. L.; FOX, J. M.; TREECE, G. D. Intensive algal culture techniques. In: MCVEY, J. P.(Ed.). **Hand Book of Mariculture, Crustacean Aquaculture**. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 3–13. 1993.
- SOUZA, R. A. L.; ANDREATTA, E. R.; SILVA, I. D. Crescimento da *Nitzschia* sp. (Diatomaea, Nitzschiacea) em Laboratório. **Boletim da Fcap**. Belém, v. 21, p. 23-32, 1993.
- STØRSETH, T. R.; HANSEN, K.; REITANA, K. I.; SKJERMO, J. Structural characterization of β -D-(1→3)-glucans from different growth phases of the marine diatoms *Chaetoceros muelleri* and *Thalassiosira weissflogii*. **Carbohydrate Research**, v. 340, p.1159–1164, 2005.
- STRICKLAND, J. D. H., PARSONS, T. S. A practical handbook of sea water analysis. Bulletin Fisheries Research Board of Canada, Ottawa, v.167, 2.ed., p. 1-205, 1972.
- STRICKLAND, J. D. H. Production of organic matter in the primary stages of the marine food chain. In: RILEY, J. P., SKIRROW, G. Eds., Chemical Oceanography, Vol. 1, Academic Press, New York, pp. 478–610, 1965.
- TEXEIRA, C.; VIEIRA, A. A. H. Nutrient experiment using *Phaeodactylum tricornutum* as na assay organism. **Boletim do Instituto Oceanográfico de São Paulo**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 29-42. 1976.
- TONON, T.; HARVEY, D.; LARSON, T. R.; GRAHAM, I. A. Long chain polyunsaturated fatty acid production and partitioning to triacylglycerols in four microalgae. **Phytochemistry**. v. 61, p. 15–24. 2002
- TRIANI, L.; SEIXAS-FILHO, J. T.; COSTA, R. A. Extrato de esterco de galinha para o cultivo de *Nanochloris oculata*, Droop. **Instituto de Pesquisa Agropecuária do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO)**, Rio de Janeiro, 3p. 1986a.
- TRIANI, L.; SEIXAS-FILHO, J. T.; RODRIGUES, P. C. Extrato de lixo urbano para

- culturas externas em larga escala de *Tetraselmis chuii* Butcher. **Instituto de Pesquisa Agropecuária do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO)**, Rio de Janeiro, 5p. (Comunicado Técnico, 168). 1986b.
- TRIANI, L.; SEIXAS-FILHO, J. T.; COSTA, R. A. Extrato de lixo residencial como fonte de nutrientes para o cultivo de *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. **Instituto de Pesquisa Agropecuária do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO)**, Rio de Janeiro, 3p. 1984.
- UTTING, S. D. Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine algae of commercial importance. **Aquacult. Eng.**, v. 4, p. 175–190. 1985
- VALENZUELA-ESPINOZA, E.; MILLÁN-NÚÑEZ, R.; NÚÑEZ-CEBRERO, F. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll *a* content in *Isochrysis* aff. *galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. **Aquacultural Engineering**. v. 25, p. 207–216. 2002.
- VIEIRA, A. A. H.; COLOMBO, v.; ROCHA, O. Release of extracellular carbohydrate by *Peridinium wileii* (Dinophyceae) under different irradiances. **Hoehnea**, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 243-249, 2002.
- VIEIRA, A. A. H. Purification of phytoplankton cultures with dakin's solution. **Tropical Ecology**, v. 22, n. 1, p. 10-39, 1983.
- VIEIRA, A. A. H. Estudos ecofisiológicos sobre *Skeletonema costatum* (Grev) Cleve e *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin (Bacillariophyceae). **Journal of Tropical Ecology**, India, v. 22, n. 1, p. 10-39, 1982a.
- VIEIRA, A. A. H. Estudos experimentais com fitoplâncton marinho: alguns aspectos ecofisiológicos de duas diatomáceas. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 13, n. 1, p. 83-94, 1982b.
- VIEIRA, A. A. H.; TEIXEIRA, C. Excreção de MOD em populações de bioensaios com nutrientes. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 13, n. 3, p. 206-210, 1982.
- VIEIRA, A. A. H. Introdução aos métodos de culturas do fitoplâncton marinho. **Boletim do Instituto Oceanográfico**, São Paulo, v. 26, n. 1 p. 303-338, 1977a.
- VIEIRA, A. A. H. Métodos de cultura de algas do plâncton marinho: estudos realizados na região de Cananéia e Ubatuba, SP. **Boletim do Instituto Oceanográfico de São Paulo**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 303-338. 1977b.
- WEBB, K. L.; CHU, F.-L. E., Phytoplankton as food source for bivalve larvae. In:

- PRUDER, G. D.; LANGDON, C. J.; CONKLIN, D. E. (Eds.), **Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition**. Louisiana State University, Baton Rouge, LA, p.272–291. 1983.
- WEBB, K. L.; CHU F. L. Proceedings of the second international conference on aquaculture nutrition: biochemical and physiological approaches to shellfish nutrition. 2. **Phytoplankton as a food source of Bivalve larvae**. G. PRUDER; C. J. LANGDON; D. E. CONKLIN Louisiana State University, Baton Rongen, L. A. p.: 272-291, 1982.
- WHYTE, J. N. C. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. **Aquaculture**. Amsterdam, v. 60, p. 231 – 241, 1987.
- YAMASHITA, C.; MAGALHÃES, P. M. S. Meios de cultura para a alga *Chaetoceros gracilis*. **Boletim de Pesquisa**. EMPARN. Rio Grande do Norte, n. 7, 18p., 1984a.
- YAMASHITA, C.; MAGALHÃES, P. M. S. Métodos simples para cultivo da alga *Tetraselmis chuii*. **Boletim de Pesquisa**. EMPARN. Rio Grande do Norte, n. 8, 21p., 1984b.
- YONEDA, N. T. Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da zona costeira e marinha. **Base de Dados Tropical**. Disponível em: «<http://www.bdt.org.br/workshop/costa/plancton/diagn>», acessado em 19 de novembro de 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A – PROTOCOLO DA PRIMEIRA ETAPA DOS BIOENSAIOS

Cultivo de 500mL (Erlenmeyer - 1L) de *Chaetoceros muelleri*, em triplicatas dos meios F2 Guillard (F2) e extrato de esterco de gado (EEG) e de minhoca (EEM)



Cada Erlenmeyer – 1 tubo de ensaio com 30 mL da espécie:

Condições de cultivo (iluminação constante -24 horas- lâmpadas fluorescentes – tipo luz do dia 40W; temperatura de $22,8 \pm 0,87^{\circ}\text{C}$; pH - 8 a 9; salinidade da água do mar - 33 ups)



Retirar diariamente
alíquotas (1 mL),
período de 12 dias

Retirar diariamente alíquotas
(10 mL), período de 12 dias

Retirar a cada dois
dias alíquotas (1 mL),
período de 12 dias



Densidade celular e taxa
diária de crescimento
(Câmara de Neubauer e
microscópio binocular Zeiss)



Clorofila a (BECKER,
1995)



Biovolume (EDLER,
1979)

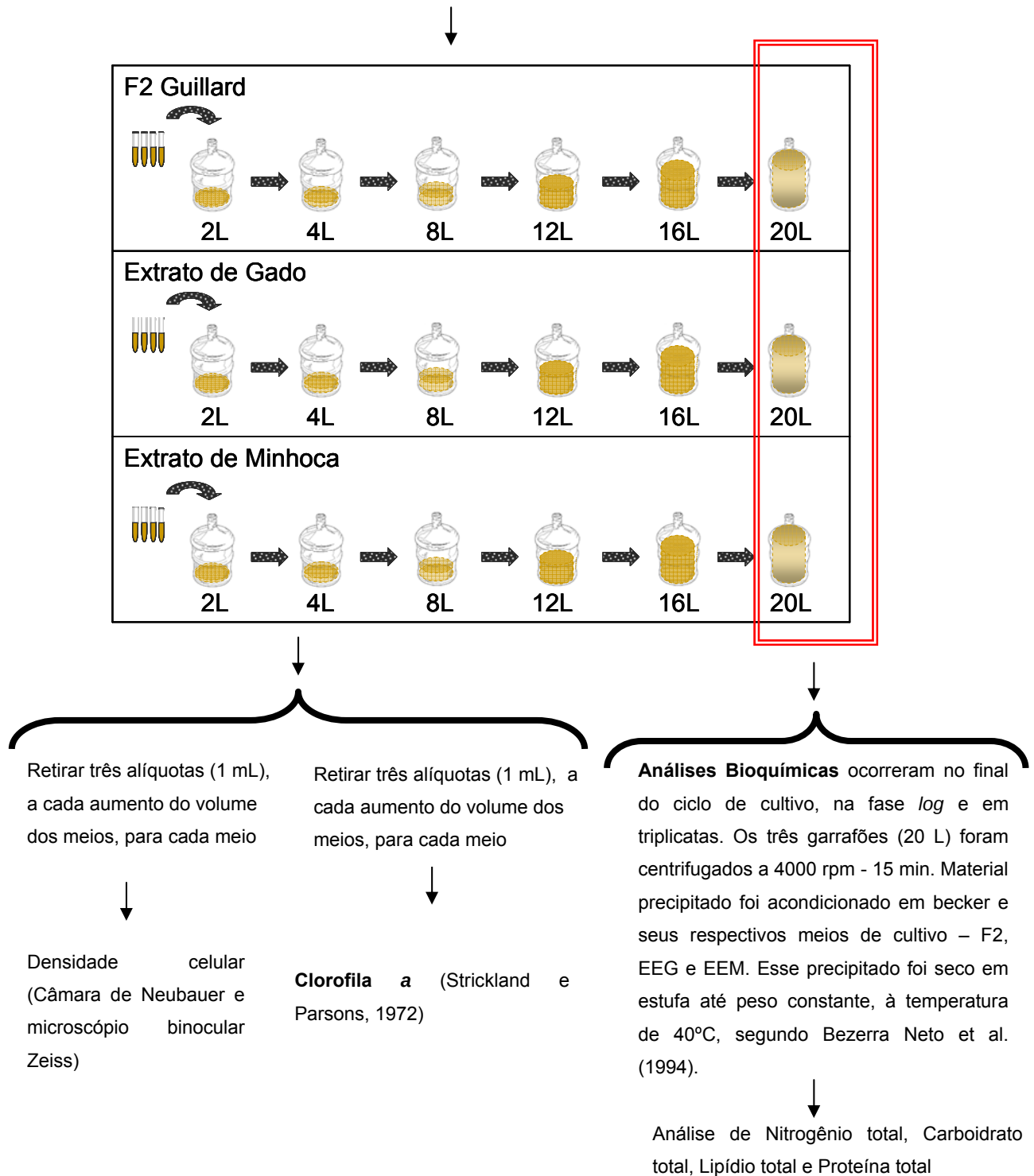


Curva de crescimento e
determinação da fase
exponencial ou *log*

APÊNDICE B – PROTOCOLO DA SEGUNDA ETAPA DOS BIOENSAIOS

Após a determinação da fase *log* de *C. muelleri*, para cada meio de cultivo.

Novo bioensaio em garrafão plástico (20 litros) e aeração. O volume inicial foi de dois litros, nos quais foram adicionados quatro tubos de ensaio contendo 30 mL de *C. muelleri*. O aumento do volume dos meios foi realizado na fase exponencial da espécie referida.



**APÊNDICE C – PROTOCOLO PARA DETERMINAÇÃO DO NITROGÊNIO TOTAL
(% matéria seca) SEGUNDO O MÉTODO DE KJELDAHL (ASSOCIATION OF
OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC, 1990)**

FUNDAMENTO

O método de Kjeldahl é usado para determinar o conteúdo de nitrogênio de substâncias orgânicas e inorgânicas. Embora modificada, consideravelmente, durante os últimos 100 anos, os princípios básicos introduzidos por Johan Kjeldahl forma mantidos até hoje.

O método de Kjeldahl consiste em três passos principais:

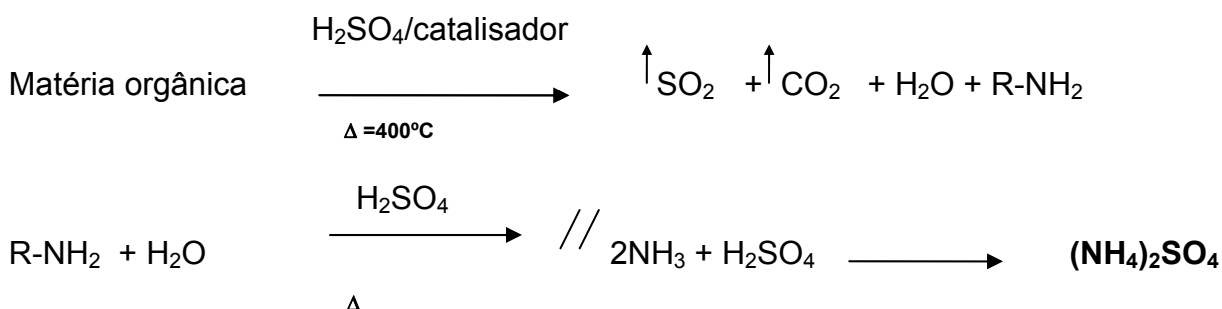
Digestão - a decomposição de nitrogênio em amostras orgânicas que utilizam uma solução ácida concentrada. Isto é realizado fervendo uma amostra homogênea em ácido sulfúrico concentrado. O resultado final é uma solução de sulfato de amônio.

Destilação - acrescentando excesso de base à mistura ácida de digestão convertemos NH_4^+ para NH_3 , seguiu-se fervendo e levando a condensação do gás NH_3 em uma solução receptora.

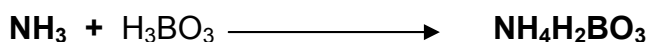
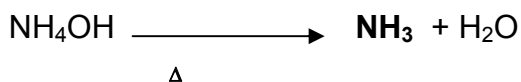
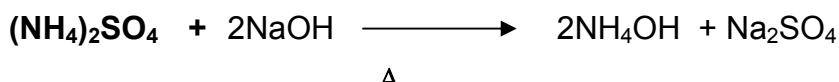
Titulação - quantificar o amônio na solução receptora.

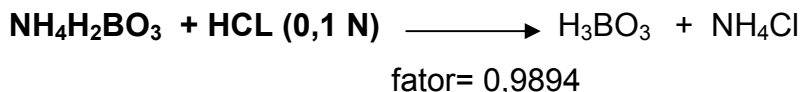
A quantidade de nitrogênio em uma amostra pode ser calculada a partir da quantidade de íons de amônia na solução receptora.

Digestão:



Destilação:



Titulação:**MATERIAL E REAGENTES**

Balança analítica; espátula de aço inox; digestor elétrico comum; aparelho destilador de kjeldahl; haste de ferro com suporte para bureta; balão de Kjeldahl de 100 ml para digestor comum; erlenmeyer de 250 mL; becker de 20 mL; pipeta volumétrica de 1, 5 e 10 mL; bureta de 25 mL; catalizador: mistura catalítica Merck: mistura reagente de selênio – PA: sulfato de coppes, sulfato de sódio; selênio; ácido sulfúrico concentrado; solução de ácido bórico a 3,5%; solução indicadora (indicador misto amoníaco); hidróxido de sódio a 40%; solução de ácido clorídrico a 0,1N; água destilada e papel livre de nitrogênio.

PROCEDIMENTO

Pesar cerca de 1 g, em triplicatas para cada bioensaio, em papel vegetal (isento de nitrogênio) e transferir para o balão digestor de Kjeldahl, em seguida acrescentar 0,5 a 1 g da mistura catalítica e 10 mL de ácido sulfúrico concentrado e acoplar ao sistema de digestão. Digerir até que se obtenha um líquido claro. Esfriar até temperatura ambiente. Acoplar o tubo com a amostra digerida ao destilador e transferir 40 mL de água e 40 mL de hidróxido de sódio 40% . Em um erlenmeyer (250 mL) adicionar 30 mL da solução de ácido bórico a 3,5% e adicionar duas gotas da solução indicadora (indicador misto amoníaco). Destilar durante 15 min. até obter aproximadamente o volume de 150 mL. Desligar o destilador e titular a amostra com ácido clorídrico (HCl 0,1N) fatorado. Anotar a quantidade de ácido clorídrico titulado e calcular o nitrogênio total (% ou g/100g).

FÓRMULA

$$\% \text{ Nitrogênio} = \frac{\text{Vol. de HCl} \times \text{fator} = 0,9894 \times 0,14\text{g}}{\text{Peso da amostra (g)}}$$

**APÊNDICE D – PROTOCOLO PARA DOSAGEM DE CARBOIDRATO TOTAL
SEGUNDO A TÉCNICA FENOL – ÁCIDO SULFÚRICO
DESCRITA POR Dubois et al. (1956)**

PROCEDIMENTO

Preparar o reagente dissolvendo o fenol em água (5%), Adicionar 500 µL de fenol nos tubos de ensaio a serem analisados e depois adicionar 500 µL da amostra já diluída, do branco e dos padrões. Agitar imediatamente as soluções. Logo depois, acrescentar rapidamente 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado diretamente a superfície das soluções sem permitir que ela toque as paredes do tubo. Deixar esfriar e no máximo em 30 minutos efetuar as leituras espectrofotométricas em 490 nm, ajustando o erro do aparelho com o branco.

A curva padrão de glicose (1 mg.mL^{-1}) é feita nas seguintes concentrações: 8, 12, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, e 70 µg.mL^{-1} . Construir a curva de calibração de regressão no Excel e calcular a concentração de carboidrato total nas amostras, pela fórmula:

$$x = (y - A)/B$$

onde:

A e B = valores fornecidos pela formula da curva de calibração de regressão;

y = valor das amostras lidas em 490 nm.

O valor de R deve ser o mais próximo possível de 1.

Para as amostras aqui analisadas a fórmula resultante da curva de calibração de regressão para o cálculo de carboidrato total foi $x = (y - 0,0559)/0,0082$.

APÊNDICE E – PROTOCOLO PARA DOSAGEM DE PROTEÍNA TOTAL SEGUNDO O MÉTODO DE Lowry et al. (1951)

SOLUÇÕES ESTOQUES

1. Tártaro duplo de sódio e potássio a 2% (p/v) – estocar na geladeira;
2. Sulfato de cobre a 1% (p/v) – estocar na geladeira;
3. Carbonato de sódio anidro a 2% (p/v) em NaOH 0,1M – estocar na temperatura ambiente em recipiente plástico;
4. Albumina do soro bovino (BSA) 500 µg/mL.

SOLUÇÕES DE USO

1. solução A:
 - ✓ 1 mL da solução de tártaro de sódio e potássio a 2%;
 - ✓ 1 mL da solução de sulfato de cobre a 1%;
 - ✓ Completar o volume para 1000 mL com a solução de carbonato de sódio a 2% em NaOH.
2. solução B:
 - ✓ 5 mL do Reagente de Folin;
 - ✓ 5 mL de água deionizada.

CURVA DE CALIBRAÇÃO

Tabela 2. Preparo das soluções padrões para a curva de calibração de proteína total.

TUBOS	µg de BSA/ 500 µL sol.	Sol. de BSA	Água deionizada
1	20	400	4600
2	40	800	4200
3	60	1200	3800
4	70	1400	3600
5	80	1600	3400
6	100	2000	3000
7	120	2400	2600

Obs: guardar os tubos de vidro com tampa em freezer. Usar 500 µL de cada solução na preparação da curva.

Tabela 3. Preparo da curva de calibração para proteína total.

TUBOS	SOLUÇÕES PADRÕES	ÁGUA DEIONIZADA	SOLUÇÃO A	SOLUÇÃO B
B	-	500 µL	2,5 mL	500 µL
B	-	500 µL	2,5 mL	500 µL
B	-	500 µL	2,5 mL	500 µL
20	500 µL	-	2,5 mL	500 µL
40	500 µL	-	2,5 mL	500 µL
60	500 µL	-	2,5 mL	500 µL
70	500 µL	-	2,5 mL	500 µL
80	500 µL	-	2,5 mL	500 µL
100	500 µL	-	2,5 mL	500 µL
120	500 µL	-	2,5 mL	500 µL

Misturar em vortex e ler a 750 nm após uma hora.

DOSAGEM DAS AMOSTRAS

- ↳ Fazer as dosagens em triplicatas usando quantidades de proteína entre 20 e 80 µg;
- ↳ Adicionar água deionizada aos tubos para completar o volume de 500 µL;
- ↳ Adicionar 2,5 mL da solução A e 250 µL da solução B a cada um dos tubos;
- ↳ Misturar no vortex e ler a 750 nm após uma hora;
- ↳ Construir a curva de calibração de regressão no Excel e calcular a concentração de proteína total nas amostras dosadas, pela fórmula:

$$x = (y - A)/B$$

onde:

A e B = valores fornecidos pela formula da curva de calibração de regressão;

y = valor das amostras lidas em 750 nm.

O valor de R deve ser o mais próximo possível de 1.

Para as amostras aqui analisadas a fórmula resultante da curva padrão para o cálculo de proteína total foi $x = (y - 0,05573)/0,00401$.

APÊNDICE F – PROTOCOLO PARA DOSAGEM DE LIPÍDIO TOTAL SEGUNDO A TÉCNICA DESCRITA POR Frings et al. (1972)

FUNDAMENTO

Os lipídios quando aquecidos com ácido sulfúrico concentrado são oxidados; os produtos tratados com fosfovanilina fornecem um complexo de coloração rósea, A reação passa por três etapas;

↳ Os componentes insaturados reagem com ácido sulfúrico formando o íon “carbonium”;

↳ A vanilina reage com o ácido fosfórico para produzir um éster fosfórico (fosfovanilina);

↳ O íon “carbonium” reage com o grupo carbonila da fosfovanilina, produzindo um complexo de coloração rósea, cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de lipídios totais existentes na amostra.

REATIVOS

↳ Ácido sulfúrico concentrado;

↳ Reativo cromogênico:

▪ Vanilina p.a.	152 mg
▪ Ácido fosfórico a 85%	76 mL
▪ Água destilada q.s.p.	100 mL

Armazenar em frasco âmbar, este reativo é estável à temperatura ambiente,

↳ Padrão de lipídios (700 mg/dL):

- Trioleína p.a.;
- Etanol absoluto q.s.p.

Armazenar em frasco âmbar na geladeira.

A curva padrão de trioleína foi realizada nas seguintes concentrações: 0,125; 0,25; 0,375; 0,5; 0,625 e 0,75 mg.

Construir a curva de calibração de regressão no Excel e calcular a concentração de lipídio total nas amostras dosadas, pela fórmula:

$$x = (y - A)/B$$

onde:

A e B = valores fornecidos pela fórmula da curva de calibração de regressão;

y = valor das amostras lidas em 530 nm.

O valor de R deve ser o mais próximo possível de 1.

PROCEDIMENTOS

- 1) Adicionar 0,05 mL das amostras, de cada meio de cultivo – F/2, EEG e EEM, em tubos de ensaio, em triplicas, Pipetar 0,05 mL das concentrações do padrão de trioleína e 0,05 mL de água destilada para fazer o branco;
- 2) Adicionar em cada um dos tubos 2 mL de ácido sulfúrico concentrado, agitada e aquecer em banho de água fervente durante 10 minutos, Esfriar sob água corrente;
- 3) Transferir para outros tubos de ensaio igualmente marcados, 0,1 mL das respectivas misturas obtidas acima;
- 4) Adicionar a cada tubo 3 mL do reativo cromogênico e mantê-los em um banho de água a 37°C durante 10 minutos. Esperar esfriar;
- 5) Efetuar as leituras espectrofotométricas em 530 nm, ajustando o erro do aparelho com o branco.

Para as amostras aqui analisadas a fórmula resultante da curva padrão para o cálculo de lipídio total foi $x = (y - 0,053)/ 0,7371$.