

R 246

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
Estágio Curricular

**EFEITO DO USO DE CO₂ NA PRODUTIVIDADE DA
MICROALGA *Skeletonema sp.*
UTILIZADA COMO ALIMENTO PARA MOLUSCOS**

**Relatório de Estágio de Conclusão de Curso,
apresentado como requisito parcial à obtenção do
título de Graduação em Agronomia do
Centro de Ciências Agrárias da
Universidade Federal de Santa Catarina.
Orientador: Dr. Jaime Fernando Ferreira**

RUTE IRGANG

**Florianópolis
2001.1**



0.283.522-1

UFSC-BU

R 246

**EFEITO DO USO DE CO₂ NA PRODUTIVIDADE DA MICROALGA *Skeletonema*
sp. UTILIZADA COMO ALIMENTO PARA MOLUSCOS**

Por

RUTE IRGANG

**Relatório de Estágio de Conclusão de Curso,
aprovado como requisito parcial à obtenção do
título de Graduação em Agronomia do
Centro de Ciências Agrárias da Universidade
Federal de Santa Catarina.**

Orientador: _____

Prof. Dr. Jaime Fernando Ferreira

Supervisora: _____

Ms. Adriana Pereira

Membro: _____

Prof. Ms. Roberto Bianchini Derner

Florianópolis, maio de 2001.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por estar fielmente comigo, sempre.

Aos meus pais que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado em minhas decisões.

Ao professor Jaime Fernando Ferreira pelos conhecimentos e avaliação final deste trabalho.

A minha chefe e supervisora, Adriana Pereira pela sua paciência, apoio, confiança e orientação durante o desenvolvimento deste trabalho.

A Marisa Canozzi pelas valiosas sugestões para elaboração deste trabalho.

Ao professor Roberto Bianchini Derner, do Laboratório de Camarões Marinhos de UFSC, pela ajuda na análise estatística dos dados.

SUMÁRIO

1	<u>APRESENTAÇÃO</u>	5
2	<u>OBJETIVOS</u>	6
3	<u>REVISÃO DE LITERATURA</u>	7
3.1	Microalgas utilizadas na produção de moluscos.....	7
3.2	Condições ideais para o crescimento de microalgas.....	8
3.3	Dióxido de Carbono e pH	10
3.4	Fases de crescimento de uma população microalga.....	13
3.5	Estimativa de crescimento.....	14
4	<u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	15
4.1	Local e período de estudo.....	15
4.2	Material biológico.....	15
4.3	Descrição do experimento.....	16
4.4	Curvas de crescimentos	17
4.5	Análise dos dados.....	18
5.0	<u>RESULTADOS</u>	19
5.1	Curvas de crescimento.....	19
5.2	Densidade celular máxima (DCM).....	20
5.3	Tempo de cultivo.....	22
5.4	Velocidade de crescimento.....	22
5.5	Parâmetros ambientais.....	23
6.0	<u>DISCUSSÃO</u>	24
7.0	<u>CONCLUSÕES</u>	26
8.0	<u>RECOMENDAÇÕES</u>	27
9.0	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	28
10.0	<u>ANEXOS</u>	31

1. APRESENTAÇÃO

O fitoplâncton ou microalgas são sintetizadores básicos de matéria orgânica em ambientes aquáticos. Estes são os maiores contribuintes para a produção de biomassa do oceano, lagos e reservatórios de água sendo esta salgada ou doce. Mesmo sendo minúsculos, o efeito da combinação de bilhões e bilhões destas células resultam na maior parte da matéria vegetal consumida por animais superiores na cadeia alimentar (HOFF&SNELL, 1987).

O fitoplâncton atua como principal responsável pela ciclagem de nutrientes em ambientes aquáticos, pois esta absorve nutrientes primários como amônia, uréia, nitratos, fosfatos e metais mantendo a qualidade da água em que se encontram. Nutricionalmente, as microalgas são fontes de macronutrientes, vitaminas e traços de metais para comunidades aquáticas. Estas são ainda, fontes de proteínas, carboidratos e ácidos graxos essenciais.

As microalgas são usadas na aquicultura como alimento de moluscos, peixes, larvas de crustáceos e zooplâncton. Alguns organismos, como o caso dos moluscos, beneficiam-se diretamente do fitoplâncton durante todo o ciclo de vida, enquanto outros utilizam-se das microalgas apenas em algum estágio do seu desenvolvimento.

Uma grande biomassa microalgal de alta qualidade é primordial na aquicultura., principalmente na produção de sementes de moluscos, onde as microalgas constituem o único alimento. Em Laboratórios de produção, o cultivo de microalgas gira em torno de 40% (LAING & HELM, 1981) a 54% (ROSA, 1999) do custo total da produção de sementes de moluscos. Desta forma o setor de microalgas do LCMM, deve constantemente buscar alternativas para diminuir ou mesmo eliminar riscos que podem ocorrer na sua produção, aumentando a eficiência produtiva e a qualidade nutritiva das microalgas. Neste sentido, visando otimizar a produção de microalgas do Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos, verificou-se neste trabalho, o efeito de CO₂ na produtividade da microalga *Skeletonema sp.*

2- OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

Verificar o efeito do fornecimento de CO₂ nos cultivos de *Skeletonema sp.* em volumes de dois litros sob condições controladas (sala de cepas).

2.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Obter e comparar as curvas de crescimento de *Skeletonema sp.* com aeração enriquecida com CO₂ e sem CO₂.

Determinar as densidades celulares máximas nos cultivos de *Skeletonema sp.* com aeração enriquecida de CO₂ e sem CO₂.

Determinar o tempo de cultivo (dias) da microalga *Skeletonema sp.*, nos diferentes tratamentos com e sem CO₂.

Determinar velocidade de crescimento na fase exponencial da microalga *Skeletonema sp* para os diferentes tratamentos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 – MICROALGAS UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE MOLUSCOS

As espécies de microalgas, utilizadas na produção de moluscos, são selecionadas de acordo com vários critérios, sendo o valor nutricional e a facilidade de cultivo, os principais. O tamanho e forma das células, o tipo de parede celular e sua composição química, são outros critérios que não podem ser esquecidos (FULKS, 1991).

Uma característica importante na alimentação de organismos marinhos é o fornecimento de uma dieta diversificada, combinando duas ou mais espécies de microalgas para satisfazer as necessidades nutricionais destes animais. A espécie escolhida varia com o estágio de desenvolvimento do animal cultivado (BORGNE, 1990 & ALVEAL et. al, 1995).

O LCMM tem uma produção diária de 12.000 litros de microalgas cujas concentrações variam de 80×10^4 cél.mL⁻¹ a 700×10^4 céls.mL⁻¹, dependendo da espécie e de sua etapa de produção (sacos ou tanques). As espécies cultivadas são : *Chaetoceros calcitrans*, *C. muelleri*, *Thalassiosira pseudonana-3H*, *Isochrysis sp.* (TISO), *Skeletonema sp.*, *Nannocloropsis oculata*, *Tetraselmis suecica* e *T. tetrathele* para alimentação de larvas, sementes e reprodutores de ostras e vieiras. As diatomáceas e a dinoflagelada *Isochrysis sp.* são as principais espécies cultivadas. As larvas de *Crassostrea gigas* são alimentadas, inicialmente, com *Isochrysis* e *Skeletonema*. À medida que a larvas vão crescendo, as diatomáceas são acrescentadas na dieta assumindo uma percentagem maior, até atingir 70% do alimento fornecido (comunicação pessoal SILVA, 2001).

CARACTERÍSTICAS DA MICROALGA *Skeletonema sp.*

As diatomáceas estão presentes em mais de 250 gêneros, sendo que estes estão divididos em aproximadamente 100.000 espécies que incluem um grande número de algas unicelulares e coloniais (HOEK et al., 1993). Segundo SMITH (1979), a primeira característica e diagnose diz respeito à membrana celular, intensamente silicificada e constituída por duas partes que se encaixam como as duas partes de uma placa de Petri. Dentro destas existem um ou numerosos cromatóforos, desde amarelos a acastanhados, de

forma diversa e providos de clorofila a e c, beta-caroteno, um caroteno especial e várias xantofilas, a maior parte das quais só existe nas diatomáceas.

Ainda segundo SMITH (1979), a reprodução é feita por divisão da célula em duas de tamanho levemente diferente. O primeiro indicio de divisão é o aumento de volume do protoplasto que provoca um ligeiro afastamento da epiteca e hipoteca, que são as dois tecidos formadores da membrana celular. Segue-se com a divisão mitótica do núcleo. A utilização das meias membranas como as epitecas das células filhas traz como consequência que uma destas tem o mesmo tamanho da célula inicial e a outra levemente menor. Em teoria, desta progressiva diminuição de grandeza de certa células resultaria numa população com certas células levemente mais pequenas e apenas uma única do mesmo tamanho. Mas segundo lei de Macdonald-Pfitzer (op cit.), a progressiva redução de tamanho não continua indefinitivamente, porque as células de certa grandeza mínima originam auxósporos, que são produtores de células vegetais com as dimensões máximas da espécie. Estes auxósporos dividem-se em duas células vegetativas. Nas diatomáceas pertencentes à ordem Centrales o auxósporos são formados por uma célula velha ou por uma recentemente formada.

Skeletonema é uma microalga cujas células variam de 3-6µm de comprimento, e 3-5µm de largura, as células desta microalga formam cadeias cadeia, e o número de células por cadeia chegam em até seis (CCMP, 2000).

3.2 – Condições ideais para o crescimento de microalgas.

O crescimento regular de populações de algas depende da interação de fatores físicos, químicos e biológicos. Em um laboratório de produção de microalgas é de interesse que estas se reproduzam na forma vegetativa. Isso é conseguido e mantido com o simples fornecimento de condições ideais de crescimento e a transferência de uma porção de células para um novo ambiente antes que a população atinja níveis críticos, como por exemplo esgotamento de recursos (MORALES, 1991).

Portanto parâmetros como luz, pH, salinidade, temperatura, movimento do meio de cultura, quantidade e qualidade de nutrientes são fatores que devem ser controlados desde o início do cultivo, ainda mais por estes organismos serem fotoautotróficas (HOFF&SNELL, 1987; LEVINTON, 1995).

Luminosidade

A luz é fonte de energia, fator vital para que ocorra fotossíntese (FULKS et al, 1991). As algas marrons são adaptadas a diferentes comprimento de onda (BORGNE, 1999). Normalmente em intensidades luminosas variáveis de 2500 a 5000 lux, tem-se o crescimento ótimo das microalgas (SNELL & HOFF, 1987).

O transporte de carbono inorgânico e seu acúmulo é um processo ativo, cuja evidência é o processo da fotossíntese. Se a luminosidade for o fator limitante, este regula a capacidade das células do transporte de carbono inorgânico dissolvido (BEARDALL, 1998).

Temperatura

A faixa de temperatura na qual as microalgas têm melhor crescimento se encontra entre 18 a 22°C, sendo que cada espécie tem o seu mínimo, máximo e temperatura ótima. Abaixo desta faixa o crescimento algal é desacelerado, e as espécies mais frágeis podem ser perdidas. Temperaturas acima de 35°C geralmente são letais para a grande maioria da microalgas cultivadas para alimentação na aquicultura (HOFF & SNELL, 1989).

Temperaturas elevadas aumentam a atividade metabólica em plantas marinhas, mas também causam a diminuição da solubilidade de CO₂ (BEARDALL et al, 1998). FULKS (1991), porém, cita que culturas devem ser mantidas à temperaturas mais baixas mas que não afetem o crescimento das algas, pois assim estará se evitando o crescimento de bactérias.

Aeração

A maioria dos cultivos sedimentam-se, sendo assim é necessário que estes sejam homogeneizados todos os dias, no caso de pequenos volumes sem aeração. A agitação da cultura é essencial para manter nutrientes e células bem distribuídas para absorção de luz, que é um problema em culturas de alta densidade. Nesses casos, a baixa aeração faz com que haja perda na produção por sombras que as próprias células acabam fazendo e / ou por foto-inibição (diminuição da taxa de fotossíntese pelo excesso da luz). Para culturas externas, este processo impede estratificações térmicas, precipitações causadas por metais pesados, e deposição de matéria orgânica. Comprovou-se que culturas aeradas renderam 3% mais do que as não aeradas (BORGNE, 1990).

As diatomáceas são organismos cujas células precisam de sílica para o seu desenvolvimento. Portanto, suas paredes celulares são ricas em silicato de sódio, que faz com que tenham densidade maior que a da água. No caso da *Skeletonema sp.*, que é formadora de cadeias, verifica-se seu afundamento mais facilmente, tendo então grande importância a aeração em cultivos com estas microalgas (HOEK, 1993; LEVINGTON, 1995).

Esterilização

Organismos que naturalmente estão presentes na água do mar, e que irão competir com o crescimento das microalgas, devem ser eliminados. Estes organismos podem ser outras espécies de fitoplâncton, zooplâncton ou bactérias (BORGNE, 1990).

3.3 - Dióxido de carbono e pH

A concentração de substâncias ácidas e básicas, na água do mar é regulada por processos biológicos, físicos e químicos (LITTLEPAGE & FINNIGAN, 1991). Quando nenhum destes é alterado o pH da água marinha é mantido em torno dos valores de neutralidade, através de um auto equilíbrio conhecido como efeito tampão ou sistema carbonatos. Gás carbônico, água e carbonatos são envolvidos. O CO_2 reage com a água de tal forma, que no final tem-se para cada molécula de CO_2 , uma molécula de CO_3^{-2} (carbonato) mais dois íons de hidrogênio (H^+). Nessas condições pode-se dizer que a quantidade deste íon livre (H^+) é que determina a acidez de um ambiente - quanto mais H^+ na água, mais baixo pH (pH ácido). Mas, por outro lado, a reação contrária envolvendo os carbonatos (CO_3^{-2} e HCO_3^-) e, novamente a água, libera desta vez, duas moléculas de OH^- , elevando o pH.

Entretanto, este equilíbrio com a presença das microalgas é quebrado. As microalgas retiram o CO_2 e ainda liberam metabólitos que contribuem para a elevação do pH (pH alcalino), de tal forma que criam condições altamente desfavoráveis para a própria sobrevivência.

Valores altos de pH não somente limitam a disponibilidade de carbono para as algas, como também a dos demais nutrientes. A concentração do íon hidrogênio muito alta ou

muito baixa, irá diminuir o crescimento algal por interrupção dos processos celulares (FULKS & MAIN, 1991).

A eficiência da fotossíntese realizada pelas microalgas dá-se graças a existência do mecanismo de concentração de CO_2 , que é realizado pelo transporte ativo de carbono inorgânico e por uma enzima carbônica, a anidrase – CA (KURANO, 1998).

A capacidade das microalgas no transporte de carbono e o seu acúmulo em suas células é controlado por vários fatores ambientais. Primeiramente, a regulação ocorre pelas mudanças das fontes de CO_2 para as células: estas podem ser afetadas por fatores como salinidade, temperatura, atividade biológica, assim como pelas mudanças nas concentrações de carbono inorgânico dissolvido no meio. Além de restrições na capacidade de geração de ATP, pela disponibilidade de luz ou nutrientes (BEARDALL et al, 1998).

Em culturas com pH neutro, a molécula mais abundante de carbono inorgânico dissolvido é o bicarbonato, enquanto que CO_2 livre é o componente em menor concentração. No entanto CO_2 livre passa muito mais facilmente pela membrana celular pela força do gradiente de densidade, enquanto que o íon bicarbonato não consegue. Algumas células têm a CA, na parte externa da membrana celular. O ATP produzido no ciclo de fosforilação é usado como fonte de energia para o sistema de transporte.

A suplementação de meio de cultura com altas concentrações de CO_2 pode causar acidificação tanto em ambientes extra como intracelulares devido a formação de substâncias ácidas no curso de hidratação do CO_2 . Muitas reações enzimáticas na fotossíntese e no metabolismo podem ser inibidas quando o pH está baixo. No entanto, a habilidade de manter o pH intracelular estável é um dos fatores importantes no crescimento rápido quando células estão expostas a altas concentrações de CO_2 .

A adição de CO_2 deve ser proporcional ao assimilado, para que o pH não se torne ácido. Isto é devido ao equilíbrio do bicarbonato de sódio, CO_2 e o íon hidróxido, da solução tampão contra a variação de pH (FULKS, 1992)

As formas de carbono absorvido pelas algas são: CO_2 , H_2CO_3 e HCO_3^- . Em pH 7,2 - 8,5 vamos encontrar maiores disponibilidades destes elementos.

Os laboratórios que exploram altas concentrações de microalgas, principalmente em sistemas contínuos e semicontínuos, utilizam CO_2 para manter o pH em torno de 7,2 - 8,5 (GOMES, 1986; BOURNE et al., 1989; URIBE, *op cit.*). Alguns, inclusive, utilizam-no

em todo o sistema de produção. A amplitude de pH das espécies de microalgas cultivadas está entre 7 e 9, com a faixa ótima entre 8,2-8,7 (COUTTEAU, 1996). No entanto, KAPLAN et al. (1986), citado por FULKS & MAIN (*op cit.*) descobriram que enquanto a concentração de Fe^{+3} mantiver-se alta o suficiente, a *Isochrysis galbana* cresce igualmente bem entre uma faixa de pH de 5,0 a 9,0.

Aplicação de 1 a 5% (GOMES, *op cit.*) e 2 a 4% (BOURNE et al., *op cit.*) de CO_2 são realizadas através do sistema de aeração ou em linhas independentes. Alguns laboratórios utilizam aplicações diretas (pequenas quantidades); outros aplicam a intervalos regulares; enquanto que outros, utilizam sofisticado sistema automático, medindo constantemente o pH e injetando CO_2 sempre que o pH atinja um valor pré-estabelecido.

Devido aos altos custos do CO_2 , laboratórios em países mais pobres, quando trabalhando com luz direta, optam pela não utilização deste elemento. Nesta situação, as intensidades de aeração são mais exploradas - o ar contém cerca de 0,03% de CO_2 (GOMES, 1986; COUTTEAU, 1996) - ou algum período de escuro (controle de fotoperíodo por "TIMERS"). Nestas condições a injeção de CO_2 puro passa a ser uma opção em caso de necessidade de superar alguma falha na produção.

As microalgas, na ausência de luz, cessam a fotossíntese passando a consumir O_2 e liberar CO_2 (respiração). Com isso, o pH volta às condições normais. Doze horas de luz e doze horas de escuro, podem manter o pH próximo aos valores de neutralidade (BOURNE et al., 1989).

Salinidade

A tolerância de fitoplâncton marinho a mudanças de salinidade é muito grande. (FULKS, 1991). A maioria das microalgas cultivadas em laboratório, cresce em salinidades um pouquinho mais baixas que as de seu habitat natural (BORGNE, 1990).

Salinidades entre 25-30‰ são no geral as recomendadas para cultivo de microalgas (HOFF&SNELL, 1987).

Meio de cultura e nutrientes

O meio de cultura utilizado deve ter em sua composição nutrientes que são naturalmente encontrados no mar, mas deve ser enriquecido no caso de cultivo de microalgas pois a concentração destas é muito maior em cultivos comerciais (COUTTEAU,

1996). A água usada para fazer este meio de cultura pode ter sido filtrada e ter passado por radiação UV (FULKS, 1991).

Concentrações de células de fitoplâncton geralmente são muito maiores do que no meio ambiente. Nitrato, fosfato e silicato de sódio são normalmente usados no cultivo de diatomáceas. Traços de metais e vitaminas podem ser adicionadas em quantidades muito pequenas (BORGNE, 1990).

Segundo THOMPSON (*et al.*, 1992), quando nitrato é limitante em um meio de cultura, ocorre aumento da concentração de carboidratos a nível intracelular na diatomácea *Thalassiosira pseudonana*, o que modifica o seu valor nutricional para alimentação de bivalves.

3.4 –Fases de crescimento de uma população microalgal.

Sendo a estimativa de crescimento de cada espécie de microalga o ponto mais importante para o domínio da produção, para se obter maiores concentrações de algas em menos tempo e maior qualidade, contagens diárias das células de *Skeletonema sp.* foram realizadas para a montagem da curva de crescimento, onde será determinado a fase ou o período de maior velocidade de aumento da concentração (k) durante a fase exponencial. Se o inóculo se encontra ainda com qualidade desejada no período maior k , maiores sucessos nas repicagens serão sempre obtidos.

A curva de crescimento nada mais é do que o aumento do número de células num determinado espaço de tempo. O crescimento de um cultivo de algas é diretamente influenciado por fatores físicos, químicos e biológicos, dependendo da integração mútua destes para um bom desenvolvimento.

Segundo McVEY (1986) a curva de crescimento pode ser dividida em cinco fases ou etapas de desenvolvimento:

1 – Fase de ajuste (**lag**): é a etapa que as algas passam de adaptação às novas condições de cultivo, após serem repicadas. Esta fase é curta, não havendo aumento significativo na população.

2 – Fase exponencial (**log**): nesta as células se duplicam sucessivamente em intervalos de tempos iguais.

3 - Fase de diminuição do crescimento: fase na qual o tempo necessário para duplicação do número de células é maior, reduzindo assim a taxa de crescimento. Isto ocorre pois a

quantidade de nutrientes disponíveis à célula estão escassos no meio de cultura, e porque há um aumento na concentração de metabólitos e uma redução da atividade fotossintética pelo aumento da densidade populacional, que acaba reduzindo a disponibilidade de luz por unidade de célula.

4 – Fase estacionária: esta fase também é curta e não ocorre aumento da população. A taxa de crescimento é compensada com a taxa de mortalidade celular.

5- Fase de morte: a taxa de mortalidade supera a de multiplicação celular, como resultado da falta de nutrientes e a ocorrência de metabólitos tóxicos produzidos pelas próprias células. Nesta fase pode-se encontrar contaminação microbiana devido à lise das células, que podem causar a morte de uma larvicultura, por exemplo.

No geral, é melhor que as microalgas sejam repicadas quando elas estão na fase log, pois células nesta fase irão se duplicar mais rapidamente do que as células em outra fase. Segundo FULKS (et al, 1991) nesta fase as células, relativamente, contém uma proporção maior de proteína que em outras fases de crescimento, e que células na fase estacionária contém maior proporção de carboidratos.

3.4 – Estimativas de crescimento

O crescimento das microalgas é avaliado pelo incremento do número de células, por meio da curva de crescimento, da velocidade de crescimento específico (K) e do tempo de duplicação STEIN (1973). Com os dados da densidade celular diária é possível estabelecer os demais parâmetros de crescimento.

4.0 – MATERIAS E MÉTODOS

4.1. Local e período de estudo

Este trabalho foi desenvolvida na sala de cepas do setor de Algocultura do Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos (LCMM), Departamento de Aqüicultura, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O Laboratório está situado na Barra da Lagoa, às margens da Lagoa da Conceição, Ilha de Santa Catarina, à 27°35'S e 48°27'W.

4.2. Material biológico

A microalga utilizada foi *Skeletonema sp.*(Fig.1), procedente do Laboratório Island Scallops Ltda, BC, Canadá. De acordo com informação pessoal de Barb Hunting, esta espécie foi adquirida do Provasoli-Guillard National Center of Culture of Marine Phytoplankton, sob o código CCMP795-ARC3.

O gênero utilizado faz parte da classe das Bacillariophyceae, que é subdividida em três classes, na qual a microalga *Skeletonema sp.* está classificada como Coscinodiscophyceae. A Ordem pertencente desta é a Centrales, formado pelas diatomáceas cêntricas (HOEK et. al., 1993).

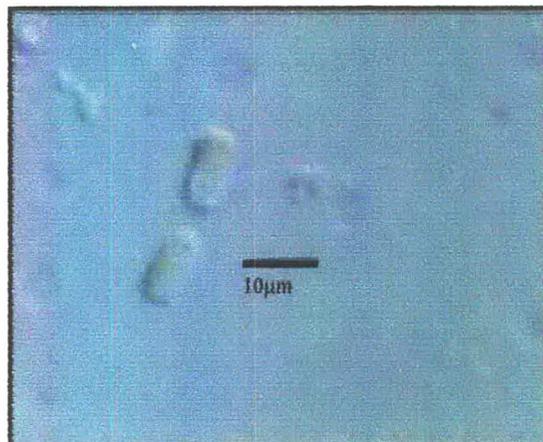


Figura 01 – Fotomicrografia da alga *Skeletonema sp.*(aumento 1000x).

4.3. Descrição do experimento

O estudo sobre o crescimento da microalga *Skeletonema sp.* consistiu de dois tratamentos, sendo um o ar enriquecido com 0,5% de CO₂ e outro sem o fornecimento deste gás. Cada tratamento teve três repetições totalizando seis unidades experimentais.

Os testes foram realizados em cultivos com volume de 2 L, meio de cultura F/2 Guillard modificado (OLIVEIRA, 1998), salinidade de 28‰ e iluminação constante de 6000 lux. Os valores de temperatura e pH foram coletados diariamente como auxílio de um pHmetro (HI 8314) (anexo 1).

Cada frasco de cultivo recebeu aeração contínua com um fluxo de 2L.min⁻¹. Nas séries com enriquecimento de CO₂, estes tiveram uma concentração de 0,5% do volume da aeração.

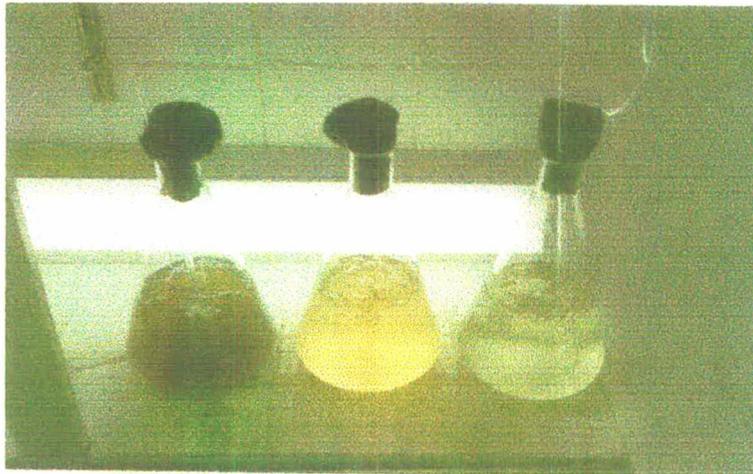


Fig. 02 - Unidades amostral do experimento

A densidade inicial nos frascos foi de 1×10^4 cél/mL. As células foram transferidas de um erlenmeyer (125mL) com densidade celular de $607,55 \times 10^4$ céls/mL, que resultou da média feita a partir de cinco contagens. O cálculo da diluição foi feito do seguinte modo:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2,$$

Onde:

C_1 e C_2 : concentração do inóculo (C_1) e concentração desejada (C_2)

V_1 e V_2 : volume a ser transferido (V_1) e volume estabelecido (V_2).

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \rightarrow 607.55 \times V_1 = 1 \times 2000$$

V=3,3 mL do cultivo de 125mL a ser transferido para cada unidade experimental

As densidades celulares foram determinadas diariamente pelo uso de câmara de Neubauer ou hemocítômetro e de um microscópio ótico OLYMPUS BX-50F4 com câmara de vídeo colorida anexa da marca SONY UPC-1010. As amostras foram contadas três vezes para cada repetição.

4.4 Curvas de crescimento

Foram ajustadas as curvas de crescimento para *Skeletonema sp.*, com auxílio do programa Statgraph 7.0, utilizando-se a média das densidades celulares das três repetições, para os tratamentos com e sem CO₂.

A densidade celular máxima refere-se ao máximo encontrado para este parâmetro em cada cultivo, independente do tempo necessário para que fosse alcançada. A unidade utilizada é número de células por mililitro.

As curvas foram ajustadas pela aproximação à curva logística segundo PINDICH E RUBENFELD (1981) aplicando-se as seguinte fórmulas:

$$Y = K_1 / (1 + (K_2 - N_0 / N_0) \cdot e^{-Rt}),$$

onde:

Y = densidade celular

K₁ e K₂ = parâmetros da curva logística

N₀ = densidade celular inicial

R = velocidade de crescimento

T = tempo em dias

Os dados das curvas obtidos e aqueles das curvas ajustadas foram considerados correspondentes quando o coeficiente de determinação (r²) foi igual ou superior a 0,80 (COSTA NETO, 1977).

A velocidade de crescimento específico (k), a qual representa o número de divisões celulares da população por unidade de tempo (dia), foi determinada através da fórmula apresentada por STEIN (1973):

$$K = (3,322 / (T_2 - T_1)) \cdot (\text{Log } N_2 / N_1),$$

Onde:

K = velocidade de crescimento

3,322 = fator de conversão do logaritmo base 2 na base 10

$(T_2 - T_1)$ = intervalo de dias

N_1 = densidade celular inicial

N_2 = densidade celular final

Log = logaritmo em base 10

A velocidade de crescimento específico de cada unidade experimental foi obtida considerando-se o dia de cultivo no qual a população alcançou a máxima densidade celular.

4.5 Análise dos dados

Foram ajustadas as curvas de crescimento para *Skeletonema sp.* utilizando-se a média das densidades celulares nas três repetições, para os tratamentos com e sem CO₂, com o programa Statgraph 7.0. A análise de variância foi calculada pelo programa Excel 6.0.

Para análise estatística dos dados foi utilizado o programa Excel 6.0. Os parâmetros de densidade celular máxima, tempo de cultivo e velocidade de crescimento, foram analisados através de ANOVA, fator único.

5.0 – RESULTADOS

5.1. Curvas de crescimento

As curvas de crescimento da espécie estudada com e sem o enriquecimento do ar com CO₂ são apresentadas na figura 3. Os pontos indicam os valores obtidos e a linha indica os valores da curva ajustada.

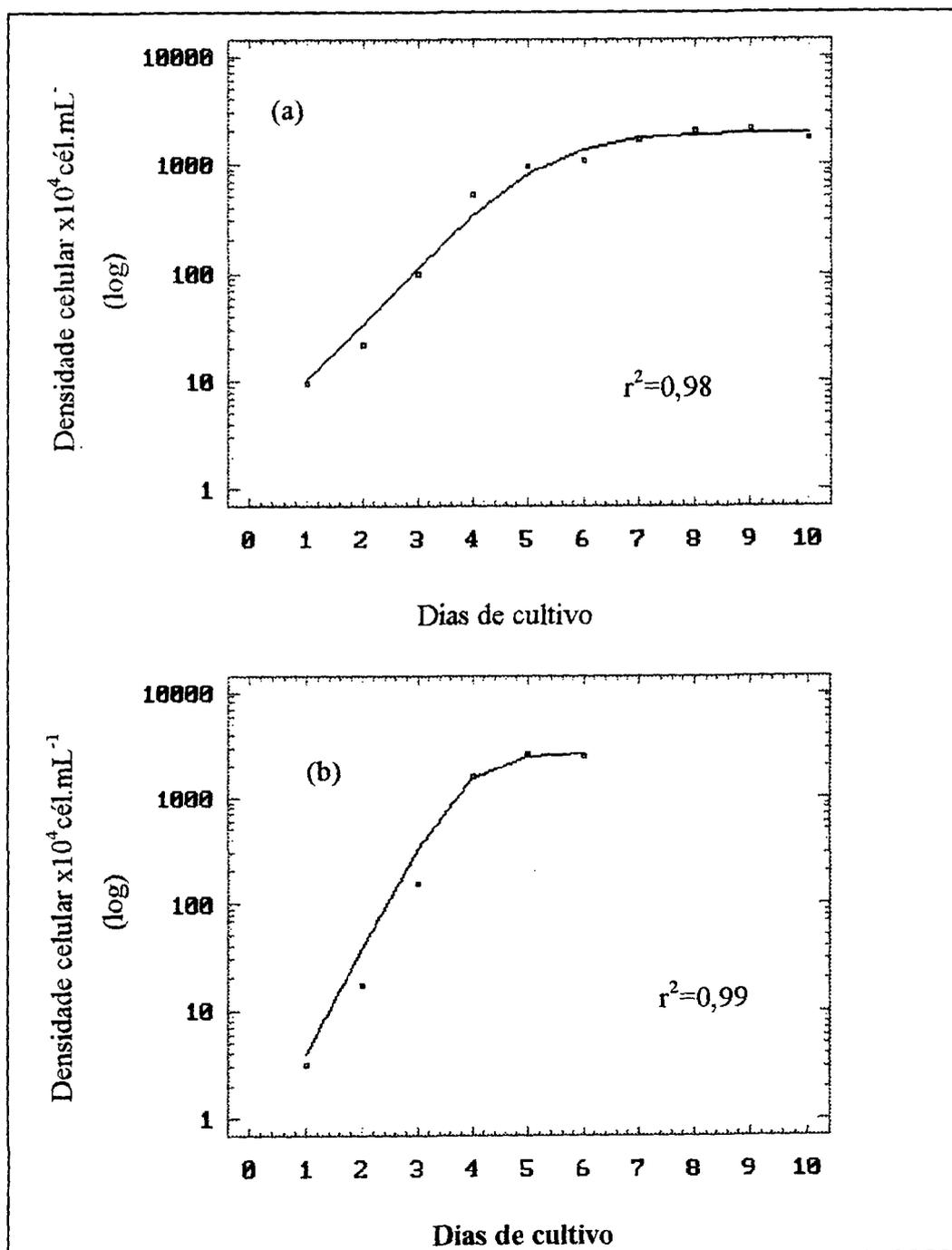


Figura 3 - Curva de crescimento da microalga *Skeletonema sp.* para os tratamentos sem CO₂ (a) e com CO₂ (b).

Observa-se que em todas as combinações as curvas são do tipo exponencial e que os coeficientes de determinação (r^2) foi de 0,98 no tratamento sem CO₂ e de 0,99 no tratamento com CO₂.

5.2. Densidade Celular Máxima (DCM)

Na Tabela 01 estão apresentados os valores das densidades celulares obtidos no decorrer do experimento para os dois tratamentos. Pode-se observar que a densidade celular máxima para os cultivos sem CO₂ foi obtida somente no nono dia de cultivo, tendo sido de $2128,61 \times 10^4 \pm 156,670 \times 10^4$ céls.mL⁻¹, enquanto que para os cultivos tratados com CO₂ a densidade máxima foi obtida no quinto dia do experimento, tendo alcançado concentração de $2676,55 \times 10^4 \pm 220,644 \times 10^4$ cél.mL⁻¹. Para o mesmo período, a densidade obtida no tratamento sem CO₂ foi de $1060,53 \times 10^4$ cél.mL⁻¹. Os resultados de densidade celular máxima no decorrer do experimento não mostraram diferenças significativas na interação dos tratamentos ($p > 0,05$) como apresentado na Tabela 02.

Tabela 01 - Valores médios de densidade celular diárias e seus respectivos desvios padrões.

Dias de cultivo	Média e desvio padrão das densidades celulares			
	Tratamento sem CO ₂		Tratamento com CO ₂	
	Media (10 ⁴ cél.mL ⁻¹)	DP	Media (10 ⁴ cél.mL ⁻¹)	DP
0	1	0	1	0
1	9.66	±2,432	3.16	±1,607
2	22.16	±5,698	17.46	±3,326
3	98.316	±27,533	157.26	±34,375
4	526.11	±139,896	1581.66	±387,201
5	969.44	±156,670	2676.55	±220,644
6	1060.53	±166,988	2483.44	±530,373
7	1693.883	±332,874		
8	2013.867	±505,629		
9	2128.61	±406,325		
10	1757.11	±551,476		

Tabela 02 – Análise de variância para densidade celular máxima em ambos tratamentos

Tratamentos	Contagem	Soma	Média	Variância
Com CO ₂	3	8621.66	2873.88	316333.2
Sem CO ₂	3	6430.83	2143.61	183312.7

Tratamentos	SQ	Gl	MQ	F	Valor-P	F crítico
Entre grupos	799956	1	799956	3,202092	0,14807	7,70865
Dentro dos grupos	999291,8	4	249823			
Total	1799248	5				

5.3– Tempo de cultivo (dias)

Na Tabela 01 estão apresentados os dados referentes ao tempo (dias) para obtenção da densidade celular máxima (DCM) dos cultivos em estudo. Pode-se observar, por meio da tabela 03 que houve diferença significativa do tempo de cultivo entre os tratamentos para alcançar a DCM, sendo de 05 dias para o tratamento com CO₂ e de 09 dias para o tratamento sem CO₂.

Tabela 03 – Análise de variância para o tempo de cultivo em relação à densidade celular

Tratamentos	Contagem	Soma	Média	Variância
Com CO ₂	3	15	5	0
Sem CO ₂	3	26	9	0,333333

Tratamentos	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	20,16667	1	20,16667	121	0,000388	7,70865
Dentro dos grupos	0,666667	4	0,166667			
Total	20,83333	5				

5.4 Velocidade de crescimento

Os valores de velocidade de crescimento (K) em número de divisões da população por dia, para os dois tratamentos estão apresentados na Tabela 04. Conforme é apresentado na Tabela 05, os resultados de velocidade de crescimento para o dia de cultivo mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$). Sendo de 2,270969 para o tratamento com CO₂ e de 1,285473 para o tratamento sem CO₂.

Tabela 04 – Médias de velocidade de crescimento(k) na fase exponencial dos cultivos de *Skeletonema sp.* com CO₂ e sem CO₂.

Tratamentos	Velocidades médias e desvios padrão
Com CO ₂	2,276646 ± 0,023271
Sem CO ₂	1,280818 ± 0,118089

Tabela 05 - Análise de variância para velocidade de crescimento em ambos tratamentos

Tratamentos	Contagem	Soma	Média	Variância
Com CO ₂	3	6,829939	2,276646	0,000542
Sem CO ₂	3	3,842454	1,280818	0,014587

Tratamentos	SQ	gl	MQ	F	Valor-P	F crítico
Entre grupos	1,487511	1	1,487511	196,6527	0,00015	7,70865
Dentro dos grupos	0,030257	4	0,007564			
Total	1,517768	5				

5.5 Parâmetros ambientais

A temperatura da sala de cepas manteve-se constante a 21°C no decorrer do experimento. Os valores de T°C e pH estão apresentados na Tabela 06. A temperatura dos cultivos variou de 20,86 a 21,9°C nos cultivos com CO₂ e de 20,36 a 22,76°C nos cultivos sem CO₂.

Os valores de pH estão apresentados na Tabela 06, nas culturas com CO₂ este parâmetro variou de 6,51 a 7,05 e nas cultura sem CO₂ variou de 7.24 a 9.08.

Tabela 06 –Valores diários de pH e temperatura (°C) dos cultivos de *Skeletonema sp.* tratados com CO₂ e sem CO₂.

Dias de cultivo	Tratamento com CO ₂		Tratamento sem CO ₂	
	pH	T°C	pH	T°C
0				
1	7,49	20,86	8,04	20,46
2	6,55	20,53	7,89	21,7
3	6,51	21,4	7,80	19,8
4	7,02	20,66	8,14	20,86
5	6,88	21,9	8,22	20,36
6	6,83	20,8	8,68	22,76
7			8,54	21,26
8			9,01	20,5
9			9,02	19,16
10			8,96	22,46

6.0. DISCUSSÃO

Embora o uso de CO₂ em cultivos de microalgas seja uma técnica utilizada internacionalmente, inclusive para os cultivos em grande escala, poucos são os trabalhos que falam sobre o efeito deste gás na produtividade dos cultivos de microalgas. Neste trabalho este efeito foi observado onde a média de densidade celular máxima no quinto dia do experimento dos cultivos tratados com CO₂ foi 2,76 vezes maior do que a do cultivo que não recebeu o enriquecimento com gás. O incremento na densidade celular com o uso do CO₂ também foi relatado por HERNANDEZ-MOLEJON et al. (1997) e LAING (1991), que verificaram um aumento de produtividade de 1,9 e de 5 vezes, respectivamente, nos cultivos. De acordo com CANOZZI et. al. (2000) em experimentos também realizados no LCMC a adição de CO₂ nos cultivos de *Chaetoceros calcitrans* e *C. muelleri* proporcionou um incremento de 43% e 130% na densidade celular máxima, respectivamente.

Segundo McVEY (1986) a curva de crescimento pode ser dividida em 5 fases ou etapas de desenvolvimento, no entanto neste trabalho, nas curvas ajustadas, podemos observar somente as fases exponencial e estacionária. Sendo a exponencial do dia 1 ao dia 5 no tratamento com CO₂ e do dia 1 ao dia 6 sem CO₂. Cultivos de microalgas com volumes de 2 L geralmente são usados para iniciar cultivos de maiores volumes, sendo assim, aplicando aos resultados da curva de crescimento, metodologias de produção, poderíamos propor baseados em MORALES (1991), que as repicagens para volumes maiores devem ser feitas um ou dois dias antes que as microalgas entrem na fase estacionária, portando os dias ideais de repicagem são o quinto para o tratamento sem o uso de CO₂ e o terceiro para o tratamento com este gás.

O pH nos cultivos sem CO₂ variou de 7,8 a 9,02, estando dentro da amplitude de pH indicada para cultivo de microalgas (COUTTEAU, 1996). Nos cultivos com CO₂ o pH variou de 6,51 a 7,49, de acordo com GOMES (1996), BOURNE (et al, 1989) a faixa de pH ideal para um cultivo de microalgas é de 7,2 a 8,5, o que indica que neste cultivos o pH esteve um pouco abaixo da faixa ideal, sendo assim é difícil utilizar o parâmetro pH para avaliar os resultados obtidos neste experimento. Poderíamos propor o que o que pode ter influenciado os cultivos tratados com CO₂ tenha sido o uso de carbono como nutriente. De acordo com Morales (1991) o carbono é citado como um dos macronutrientes necessários par ao crescimento e reprodução das microalgas (STEIN, 1993; KURANO, 1998)

De acordo com FULKS (et al., 1991), o uso de CO₂ melhora a qualidade nutricional das microalgas, esta citação juntamente com os resultados positivos de aumento da produtividade e redução do tempo de cultivo justificam o uso de CO₂ na produção de microalgas, mesmo sendo este um custo adicional. De acordo com ROSA (1999), um litro de microalga cultivada na sala de cepas do LCMM custa R\$ 13,61 com adição de CO₂ e R\$ 12,68 sem a adição de CO₂. A utilização do CO₂ eleva os custos em aproximadamente 7%, no entanto o incremento na produtividade seria de 276% sobre a densidade máxima do cultivo, o que indica um aumento da eficiência produtiva.

Não foram encontrados trabalhos que descrevessem a utilização desta espécie em laboratórios de produção de moluscos, no entanto sabe-se por meio de comunicação pessoal (PEREIRA, 2001) que esta espécie é utilizada com sucesso na alimentação de larvas e sementes de moluscos em laboratórios do Canadá e Estados Unidos. Um dos pontos positivos desta espécie, na visão do algocultor, é a facilidade de cultivo, conseguindo-se altas concentrações em tanques do massivo, e na visão do larvicultor, é a possibilidade de introduzir nos primeiros dias de larvicultura mais uma espécie, uma vez que esta microalga é pequena e pode ser utilizada na dieta de larvas em estágios iniciais, proporcionando uma dieta mais nutritiva e diversificada.

7.0 – CONCLUSÕES

A utilização de CO₂ nos cultivos da microalga *Skeletonema sp.* proporcionou:

- Maior Densidade celular máxima (DCM) no quinto dia de cultivo.
- Maior Velocidade de crescimento na fase exponencial
- Redução de 04 dias no Tempo de cultivo para obtenção da DCM

8.0 – RECOMENDAÇÕES

- Avaliar a composição química dos cultivos da microalga *Skeletonema sp.*, com o uso do CO₂ e sem o uso deste..
- Verificar o efeito do uso de CO₂ nas microalgas sobre a sobrevivência larval de moluscos produzidos no LCMM.
- Realizar outros experimentos com o objetivo de avaliar a melhor faixa de pH para o incremento da densidade celular assim como para a melhor composição química nos cultivos de *Skeletonema sp.*

9.0 –REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ALVEAL, K.; FERRARIO, M.E.; OLIVEIRA, E.C.; *Manual de métodos ficológicos*.
Universidad de Concepción, Concepción, Chile, 1995.
- BARNABÉ, G.; *Aquaculture and fisheries support*. Vol. 1, England, 1999. 528p.
- BEARDALL, J.; JOHNSTON, A .; RAVEN, J.; *Environment regulation of CO₂-
concentrating mechanisms of microalgae*. *Can. J. Bot.* 76:1010 -1017(1998).
- BORGNE, Y. LE. *Aquaculture: Ellis Horwood Series in Aquaculture and fisheries
support*. Ed. Gilbert Barnabé. Vol. 01. England, 1990. 528p.
- BOURNE, N; HODGOSON, C.A; WHYE, C. A . *Manual for scallop culture in British
Columbia. Canadian technical report of fisheries and aquatic science*. Nanaimo, n.
1694, 215p. 1989.
- BROWN, M.R.; JEFFREY, J.K; VOLKMAN, G.A.; DUNSTAN, G.A. *Nutrition
properties of microalgae for mariculture*. *Aquaculture* Vol. 151. 1997.
- COUTTEAU, P. Micro-algae In: P. LAVENS; P. SORGELOOS *Manual on the
production and use of live food for aquaculture*. FAO Fisheries Technical Paper,
361. Rome, 1996. 269p.
- COSTA NETO, 1977. *Apud DERNER (1995)*.
- DERNER, R.B. *Crescimento da microalga Thalassiosira fluviatilis (classe
Baccillariophyceae) sob diferentes regimes de iluminação, na região sul do Brasil*.
Florianópolis, UFSC, 1995. 108p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura),
Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, 1995.
- ESTEVES, F. A. *Fundamentos de Limnologia*. Ed. Interciência/FINEP- RJ, 1988. 575p.
- FULKS, W.; MAIN, K.L. *Rotifer and microalgae culture system*. Proceedings of US –
Asia Workshop. Honolulu, Hawaii. January 28-31, 1991. 364p.
- GOMES, L.A . O. *Cultivo de crustáceos e moluscos*. Nobel, São Paulo, 226p. 1986.
- HERNANDEZ MOLEJÓ, O G; ALVAREZ LAJONCHERE, L; COMAS GONZALES,
A MARTINEZ ALMEIDA, V. *Efectos del CO₂ en la productividad del cultivo en
agua salgada de la microalga Nannocloropsis oculata (Droop) Hibberd*, 1981.
Ver. Invest. Mar. V.18 (1):58-64, 1997.
- HOEK, C. D. D; MANN, D.G.; JAHNS, H.M.; *Algae-An introduction to phycology*.
Cambridge University Press, 1993. 627p.
- HOFF, F. H. & SNELL, T.W. *Plankton Culture Manual*. Published by Florida Aqua
Farms, 1987.130p.

- KURANO, N.; SASAKI, T.; MIYACHI, S.; *Carbone dioxide and microalgae*. Advances in chemical conversions for mitigating carbon dioxide. Studies in surface science and catalysis, vol. 114. Elsevier Science B.V., 1998.
- LAING, I *Cultivation of marine unicellular algae*. Lab. Leaflet. MaMAFF Direct.Fish. Res, Lowestoft, n. 67:31p., 1991.
- LAING, I & HELM, M.M. *Factors affecting the semi-continuous production of Tetraselmis suecica (Kyllin) Buth*. In 200L vessels. *Aquaculture* v.22, p137-148, 1981.
- LAING, I.; CHANG, R. *Hatchery cultivation of Pacific oyster juveniles using algae produced in outdoor bloom-tanks*. *Aquaculture International*, vol. 06, 1998.
- LEVINTON, J. S. *Marine Biology – Function, biodiversity and ecology*. Oxford University Press, NY, 1995. 420p.
- LITTLEPAGE, J.L. & FINNIGAN, P.J. *A laboratory and shipboard manual of oceanographic techniques*. Victoria, University of Victoria, Biology 311/450 - 1993-94. 121p, 1991.
- McVEY, J. P. *CRC- Manual of Mariculture -Crustacean Aquaculture, Vol.I* CRC Press, Boca Raton, Florida, 1986. 442p.
- MORALES, J. C. *Acuicultura Marina Animal*. Ed. Mundi-Prensa, 3^a ed. Madrid, 1991. 671p.
- OLIVEIRA, J. M. O . *Efeitos da densidade populacional e renovação da água no crescimento e sobrevivência larval da ostra Crassostrea gigas (THUNBERG, 1793)*. Florianópolis, UFSC, 1998. 122p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, 1998.
- OLIVERA, A G. *Crescimento das diatomáceas Bacillariophyceae Chaetoceros sp, Skeletonema costatum e Thalassiosira fluviatilis em diferentes meios de cultivo e em condições controladas de temperatura e salinidade*. Florianópolis, UFSC, 1993. 204p. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Departamento de Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, 1993.
- PINDICH & RUBENFELD, 1981. *Apud, DERNER, 1995*.
- RICHMOND, A. *CRC – Handbook of microalgas mass culture*. CRC Press, Florida, 1990. 528p.
- ROSA, F.S. *Apuração dos custos da produção se sementes de ostras do Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos da UFSC/SC*. Trabalho de Conclusão de curso para

- obtenção do grau de bacharel em Ciências Contábeis. Florianópolis, 70p, 1999 (Monografia).
- SMITH, G.M. *Botânica criptogâmica - algas e fungos*. Vol.I. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1979. 530p.
- STEIN, J. *Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press, 447p, 1973.
- THOMPSON, P.A.; GUO.M.; HARRISON, P.J. *Effects of variation in temperature. I-on the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton*. Journal of Phycology, Vol. 28. 1992.
- THOMPSON, P.A.; HARRISON, P.J. *Effects of monospecific algal diets of varying biochemical composition on the growth and survival of Pacific oyster (Crassostrea gigas) larvae*. Marine Biology. Vol. 113, 1992.
- THOMPSON, P. A.; GUO, M.; HARRISON, P.J. *The influence of irradiance on the biochemical composition of three phytoplankton species and their nutritional values for larvae of the Pacific Oyster (Crassostrea gigas)*. Marine Biology, 1993. 259 –268p.
- TZOVENIS, I.; PAUW, N.D; SORGELOOS, P. *Effect of different light regimes on the docosahexanoic acid (DHA) content of Isochrysis aff. Galbana (clone T-ISO)*. Aquaculture International, vol. 05, 1997.
- TZOVENIS, I.; PAUW, N. De; SORGELOOS, P.; *Effect of different light regimes on the docosahexanoic acid (DHA) content of Isochrysis aff. Galbana (clone T-ISO)*. Aquaculture Internacional 5, 1997. 489-507p.
- URIBE, T. E. *tecnologia de cultivo de microalgas*. In: 10^o Curso internacional em cultivo de moluscos. Coquimbo, Chile, U.C. del Norte, JAIICA, p.12-42, 1997.
- Provasoli-Guillard National Center of Culture of Marine Phytoplankton (<http://ccmp.bigelow.org>)

b) Densidades celulares ($\times 10^4$ cél/mL) para as três repetições sem uso do CO_2

Dias de cultivo	Rep. 01	Rep. 02	Rep. 03	Média	DP
0	1	1	1	1	0
1	7.08	10	11.91	9.66	2,432536
2	17.416	20.66	28.5	22.19	5,698599
3	71.6	96.75	126.6	98.316	27,53345
4	368.33	635	575	526.11	139,896
5	793.33	1021.67	1093.33	959.44	156,6707
6	961.6	966.66	1253.33	1060.53	166,9889
7	1393.33	1636.66	2051.66	1693.883	332,8746
8	1531.6	1970	2540	2013.867	505,6292
9	1707.5	2160	2518.33	2128.61	406,3254
10	1685	1023	2118	1608.667	551,4765