

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Agrárias
Departamento de Aqüicultura

**Técnicas laboratoriais relacionadas ao estudo da ecologia dos
microorganismos marinhos e suas aplicações na aqüicultura**

Natália de Moraes Rudorff

Florianópolis / SC
2005

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Agrárias
Departamento de Aqüicultura

**Técnicas laboratoriais relacionadas ao estudo da ecologia de microorganismos
marinhos e suas aplicações na aqüicultura**

Relatório de Estágio Supervisionado II do Curso de Engenharia de Aqüicultura

Aluna: Natália de Moraes Rudorff
Orientador: Dr. Luís Vinatéia Arana
Supervisor: Dr. Paulo César Abreu

Instituição: Fundação Universidade de Rio Grande (FURG)
Laboratório de Ecologia do Fitoplâncton e Microorganismos Marinhos

Florianópolis / SC
ANO 2005
SEMESTRE 1

RUDORFF M., NATÁLIA

TÉCNICAS LABORATORIAIS RELACIONADAS AO ESTUDO DA ECOLOGIA DE
MICROORGANISMOS MARINHOS E SUAS APLICAÇÕES NA AQÜICULTURA

RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO II

CURSO DE ENGENHARIA DE AQÜICULTURA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

FLORIANÓPOLIS / SC – BRASIL

NO. PÁGINAS 62.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por tudo que Ele me proporcionou durante a realização desse estágio, colocando pessoas maravilhosas no meu caminho. Dentre elas estão:

o meu orientador Luis Vinatéia Arana que me apoiou e incentivou na realização deste estágio e pelo qual sempre cultivei muita admiração por seu vasto conhecimento e pela sua ampla dedicação aos alunos; para mim, o que mais me engrandece é sua humildade apesar de ser um pesquisador altamente qualificado;

o meu supervisor, Dr. Paulo César Abreu, que desde o início do estágio mostrou muita atenção e disposição para tudo que eu precisasse; esteve sempre de prontidão para me auxiliar e orientar; além disso, ele me proporcionou a oportunidade de aprender muito com seu imenso conhecimento aumentando ainda mais o meu fascínio sobre temas referentes à ecologia microbiana e o meu interesse pela pesquisa científica;

os meus maravilhosos familiares que sempre me transmitiram muita força e paz nos momentos difíceis e com os quais também pude ter várias partilhas de amor e afeto nos momentos felizes;

a Sônia, o Christian, a Ândria, o Silas e a Renata que me acolheram com muito amor na chegada em Rio Grande e continuaram sempre ótimos amigos;

a minha grande amiga Amália, companheira admirável, que se tornou eterna em meu caminho pela sua maravilhosa acolhida e amizade que pudemos cultivar nesse curto, mas intenso, tempo em que dividimos o mesmo teto;

todos do Laboratório com os quais cultivei grandes amizades e que sempre me ajudaram: Márcio, Giuliano, Carlos, Caru, Lissandra, Maria Luíza, Bianca, Bia, Valnei, Clarisse, Virgínia, Marli, Marinês, e também os amigos do Laboratório de Zooplâncton: Duda, Valdemar, Charles.

Por fim, expresso também a minha gratidão aos "cassinenses", em especial ao Pedro, grande companheiro, e à Cíntia, à Carol, à Aline, ao Scoobi, ao Jason, ao Leo, ao Val e a todos que não mencionei, mas que tenho no coração.

ÍNDICE

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	vi
1. Introdução.....	1
2. Descrição da Instituição.....	4
3. Atividades desenvolvidas.....	6
3.1 Atividades Gerais.....	6
3.1.1 Monitoramento de qualidade de água.....	6
3.1.1.1 Coleta de água em campo.....	8
3.1.1.2 Análise dos nutrientes dissolvidos ($\text{NH}_{3,4}$, NO_2 , NO_3 , PO_4^{3-} e SiO_3)	9
3.1.1.3 <i>Seston</i>	19
3.1.1.4 Determinação de clorofila- ^a	19
3.1.2 Isolamento e cultivo de Microalgas.....	21
3.1.2.1 Manutenção das cepas.....	24
3.1.2.2 Criopreservação das cepas.....	25
3.1.2.3 Estimativa de produtividade pelo método do O_2 e C^{14}	27
3.1.3 Identificação e determinação da abundância de microorganismos planctônicos em microscópio de luz invertida.....	31
3.1.4 Determinação da abundância de microorganismos em microscópio de epifluorescência.....	34
3.2 Atividades específicas.....	37
3.2.1 Determinação da abundância de microorganismos em biofilme de substratos artificiais utilizados em cercados de camarão.....	37
3.2.1.1 Introdução.....	37
3.2.1.2 Metodologia.....	38
3.2.1.3 Resultados preliminares.....	40
4. Considerações finais.....	47
5. Bibliografia.....	49
6. Análise crítica.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 : Desembocadura da Lagoa dos Patos e início da praia do Cassino. Fonte : www.peld.furg	6
Figura 2 : Bloom de <i>Asterionellopsis glaciares</i> na praia do Cassino	7
Figura 3 : <i>Asterionellopsis glaciares</i> em microscópio invertido (Axiovert) Fonte : Clarisse Odebrecht.....	7
Figura 4 : Fluorímetro Turner modelo TD-700	21
Figura 5 : Banco de cultivos de microalgas na Câmara Ambiente de Germinação-Modelo 347. Fonte: Borges, 2004	25
Figura 6 : Frascos do experimento de produtividade com métodos de determinação do O ₂ e C-14, incubados no aquário. Fonte: (Borges, 2004) ...	28
Figura 7 : Microscópio Zeiss Axioplan de epifluorescência	36
Figura 8: Distribuição da abundância dos microorganismos: a) bactérias; b) flagelados; c) vorticídeos; d) tintinídeos; e) náuplios de copepodo; f) copépodos; g) rotíferos (1); h) rotíferos (2); i) NID (1); j) NID (2); k) nematóides.....	41
Figura 9 : 16° dia de experimento – 60 cam/m ²	43
Figura 10 : 16° dia de experimento – 60 cam/m ²	43
Figura 11 : 16° dia de experimento – 60 cam/m ²	43
Figura 12: 58° dia de experimento – 60 cam/m ²	43
Figura 13 : Náuplio de copépodo	44
Figura 14 : Copépodo Harpaticoida	44
Figura 15 : Vorticiliodeo	44
Figura 16 : Tintinídeo	44
Figura 17 : Rotífero (1)	45
Figura 18 : Rotífero (2)	45
Figura 19 : NID (1)	45
Figura 20 : NID (2)	45
Figura 21 : Nematóide A	46
Figura 22 : Nematóide B	46
Figura 23 : Diatomácia cêntrica em colônia	46

Figura 24: Diatomácea penada grande46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 : Concentrações de Cl a ($\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$) em diferentes condições tróficas, em ambientes marinhos. Fonte: Nixon, 1995.....	20
Tabela 2. Tempo de sedimentação recomendado como mínimo (Edler 1979).....	32

RESUMO

O presente estágio foi realizado no Laboratório de Ecologia do Fitoplâncton e de Microorganismos Marinhos do Departamento de Oceanografia Biológica da Fundação Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS. Este Laboratório desenvolve projetos, que abrangem estudos científicos e aplicações tecnológicas nas mais diversas áreas relacionadas à ecologia do fitoplâncton e de microorganismos marinhos, que se viabilizam por meio de parcerias com outros laboratórios e órgãos de fomento à pesquisa científica.

As atividades desenvolvidas durante a realização do estágio foram divididas em atividades gerais e específicas. As atividades gerais englobaram: a) o monitoramento de qualidade de água que consistiu na coleta de água em campo; análise de nutrientes inorgânicos dissolvidos ($\text{NH}_{3,4}$, NO_2 , NO_3 , PO_4^{3-} e SiO_3), na quantificação do *seston* e na análise de clorofila-*a* para determinação da biomassa de microalgas; b) isolamento e cultivo de microalgas, com experimentos de criopreservação de cepas e estimativa de produtividade primária pelos métodos do oxigênio e do C^{14} ; c) identificação e determinação da abundância de microorganismos planctônicos em microscópio invertido; e d) determinação da abundância de bactérias, flagelados e ciliados por meio de microscopia de epifluorescência. As atividades específicas consistiram em aplicar algumas dessas técnicas aprendidas por meio da determinação da abundância de microorganismos no biofilme de substratos artificiais utilizados num experimento com cultivo do camarão *Farfantepenaeus paulensis* em cercados.

Durante a realização do estágio foi proporcionada a oportunidade de participar em ciclos de seminários promovidos pelo Laboratório para ampliar a comunicação entre pesquisadores e alunos visando estimular a participação direta ou indireta das equipes no andamento dos projetos e atividades em desenvolvimento.

A elevada qualificação técnica e científica dos pesquisadores e colaboradores lotados no Laboratório propiciou um ambiente de contínuo aprendizado e de grande valor nas diversas áreas de pesquisa que englobam os temas de ecologia microbiana marinha. As técnicas aprendidas foram de grande valia no âmbito da pesquisa aplicada e das noções de uso de microorganismos para as mais diversas

finalidades, principalmente em tecnologias de melhoria e otimização de sistemas de produção em aqüicultura.

1. INTRODUÇÃO

O estágio foi realizado no Laboratório de Ecologia do Fitoplâncton e de Microorganismos Marinhos do Departamento de Oceanografia Biológica da Fundação Universidade Federal de Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, durante o período de 07 de março a 24 de maio de 2005, sob a orientação do Dr. Paulo César Abreu.

O Laboratório desempenha pesquisa nas mais diversas áreas que abrangem a ecologia de microorganismos em ambientes naturais e de cultivos de aquicultura. A compreensão da ecologia desses ambientes é essencial para a avaliação das condições tróficas e das possíveis aplicabilidades com intervenções tecnológicas.

Pesquisas recentes têm apresentado novos conceitos sobre a ecologia desses microorganismos, abrindo novas linhas de pesquisa com uma abordagem bem mais ampla. É o caso da nova percepção da importância de organismos do protozooplâncton (flagelados e ciliados) nos processos biogeoquímicos na natureza, sendo estes responsáveis pela remineralização dos nutrientes absorvidos pelas bactérias, devido à predação exercida sobre elas e tornando-os disponíveis aos níveis tróficos mais elevados (Caron, 1994).

As técnicas aprendidas no estágio, vão desde o monitoramento da qualidade ambiental dos fatores bióticos e abióticos até o desenvolvimento de cultivo de espécies nativas de microalgas, testando sua produtividade em larga escala, e do uso de biotecnologias aplicadas ao estudo de microorganismos em sistemas de cultivo de camarão para otimizar a produção.

O desenvolvimento do cultivo de espécies nativas de microalgas é muito apropriado, pois estas já estão adaptadas às condições climáticas da região, não necessitando do uso de recursos tecnológicos e financeiros adicionais para manutenção das condições das espécies importadas de países ou regiões de climas diferentes daqueles encontrados no Brasil. Por exemplo, o Laboratório de Cultivo de Moluscos (LCMM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), importa as microalgas cultivadas do banco de cepas do *Provassoli-Guillard National Center for Culter of Marine Phytoplankton* (CCMP) dos Estados Unidos (Silva *et al.* 2004). Isto exige um maior controle, principalmente das condições de temperatura, elevando o

custo de manutenção dos cultivos. Outra desvantagem na importação das cepas é o cumprimento dos vários procedimentos burocráticos da legislação para a importação de espécies exóticas.

Os testes de produtividade aplicados às diferentes espécies de microalgas são também de fundamental importância para gerar informações sobre o potencial de cultivo em larga escala, buscando espécies mais produtivas que visem aumentar o rendimento e reduzir os custos de produção (Borowitzka, 1997, *apud*. Borges, 2004).

O estudo da ecologia dos microorganismos tem gerado inúmeras informações, ampliando a gama de aplicações nos sistemas de aquicultura. Os microorganismos podem ser manipulados no ambiente de cultivo promovendo melhorias na alimentação, qualidade de água e controle de doenças (Abreu *et al.* 1998).

O biofilme é uma comunidade microbiana associada a uma matriz orgânica aderida às superfícies submersas. Essa comunidade é rica na diversidade de espécies e nos grupos de organismos que desempenham diferentes funções nos ciclos biogeoquímicos. Além disso, essa comunidade é um importante competidor e predador natural (protozooplâncton) de organismos oportunistas tais como muitas das bactérias patogênicas (Abreu *et al.*, 1998).

O uso de substratos artificiais para formação de biofilme como fonte de alimento natural vem se apresentando como uma alternativa eficiente em sistemas de larvicultura, berçário e engorda dos camarões *Farfantepenaeus paulensis* e *Litopenaeus vannamei* (Pissette, 2004; Moss and Moss, 2004). Esses biofilmes também exercem um papel importante na redução dos níveis de amônia e fosfato, melhorando a qualidade da água nos sistemas de cultivos aquáticos (Thompson *et al.*, 2002).

O biofilme pode ser formado com espécies desejáveis ao cultivo, utilizando inóculos de *BCAs* (agentes de biocontrole), que são microorganismos que promovem o crescimento e a sobrevivência dos organismos cultivados (Maeda, 2002). Estas condições podem permitir um maior controle do crescimento de microorganismos desejáveis ao cultivo. Contudo, cabe ressaltar a necessidade de uma boa diversidade de *BCAs*, pois o uso de probióticos mono-específicos torna o ambiente susceptível ao aparecimento de bactérias oportunistas.

O uso de probióticos (ou *BCAs*), substratos com comunidades naturais de biofilme, dentre outras tecnologias de manipulação de microorganismos podem proporcionar a melhoria das três condições básicas de bem estar do cultivo ao mesmo tempo, que são: a qualidade do ambiente, a imunoresistência dos organismos cultivados e a inibição do crescimento de microorganismos patogênicos. Evitando, assim, o uso de antibióticos que são extremamente agressivos ao meio ambiente e aos próprios organismos cultivados, destruindo sua flora bacteriana natural e promovendo o surgimento de bactérias resistentes aos antibióticos. Além de evitar gastos excessivos na manutenção da qualidade de água por meio de tratamentos químicos e sistemas de filtragem e uso de suplementos alimentícios para melhoria da imunoresistência dos organismos cultivados.

O entendimento sobre o papel dos microorganismos nos ambientes aquáticos em termos de suas interações tróficas e suas participações nos processos biogeoquímicos vem promovendo novas linhas de pesquisa na aquicultura com a finalidade de propiciar cultivos menos agressivos ao meio ambiente e mais equilibrados em termos do relacionamento entre os microorganismos e os cultivos. O estudo sobre a manipulação dos microorganismos em sistemas de cultivos busca a melhoria da qualidade ambiental e nutricional dos cultivos tornando-os mais imunoresistentes. O presente estágio permitiu participar efetivamente nesta linha de pesquisa inovadora que busca alternativas ecologicamente sustentáveis e benéficas para os sistemas de cultivo na aquicultura por meio de uma série de procedimentos vistos neste estágio.

2. DESCRIÇÃO DA INSTITUIÇÃO

O Laboratório de Ecologia do Fitoplâncton e de Microorganismos Marinhos da Universidade Federal de Rio Grande (FURG) fica na cidade de Rio Grande, RS, no campus universitário e faz parte do Departamento de Oceanografia.

As linhas de pesquisa do Laboratório são: ecologia do fitoplâncton, proozooplâncton e de bactérias; bio-ótica e produção primária; eutrofização e fitoplâncton; maré vermelha e florações de algas nocivas; cultivo e ecofisiologia de microalgas; ecologia de microorganismos e aqüicultura e microorganismos na decomposição bacteriana. A maioria dos projetos está voltada aos ambientes marinhos e costeiros do sul do Brasil.

A equipe do Laboratório é formada pelos professores acadêmicos, técnicos laboratoriais, bolsistas de projetos e alunos da graduação e pós-graduação em Aqüicultura e Oceanografia Biológica. Os pesquisadores lotados no Laboratório são de alta qualificação científica, sendo referências nacionais e internacionais no campo em que atuam.

O Laboratório dispõe de uma sala com ambiente propício para processamento e armazenamento das amostras analisadas, uma sala com equipamentos de uso mais restritos (fluorímetro, fotocolorímetro) e uma sala de microscopia com os microscópios de epifluorescência Zeiss (Axioplan) e de luz invertida (Axiovert e NIKON) e ainda outros de uso rotineiro. Essa sala dispõe também de uma ampla coleção bibliográfica para estudos de ecologia e identificação morfológica de microorganismos aquáticos. Há, também, uma sala climatizada para o cultivo de microalgas, onde ficam as incubadoras, uma sala com capela para manipulação de produtos químicos, autoclaves e estufas e uma sala de depósito para armazenamento de materiais e produtos de estoque. Todos esses ambientes possuem controle de temperatura com uso de ar condicionados, exceto na sala das autoclaves e estufas. A sala de microscopia e de equipamentos possui também controle de umidade através do uso de dissecadores.

Visando a melhoria do ambiente de trabalho para otimizar o uso dos recursos disponíveis, o Laboratório também emprega um programa de melhoria contínua (5S), que são os 5 “Sensos”: Utilização, Ordenação, Limpeza, Saúde e Autodisciplina.

Esses programas são amplamente empregados em empresas e auxiliam na ordenação das atividades para otimizar o espaço e promover a reutilização dos materiais a fim de evitar desperdícios. A equipe do Laboratório participa no desempenho de diversas funções dentro do programa para promover um ambiente de cooperação entre os integrantes.

Os ciclos de seminários promovidos pelo Laboratório também fazem uma integração entre os pesquisadores e os alunos incentivando a participação de todos nos projetos em andamento com críticas construtivas para ampliar o campo de visão de todos.

Entre os projetos desenvolvidos no Laboratório citamos:

- Projeto Ecológico de Longa Duração: monitoramentos de qualidade ambiental na região do Estuário da Lagoa dos Patos;
- Desenvolvimento de técnicas de identificação de microalgas;
- Isolamento e cultivo de espécies nativas de microalga;
- Projeto PETROBRÁS: a) produção de biodiesel por meio de lipídeos extraídos de microalgas e b) tecnologias de desenvolvimento limpo a fim de encontrar espécies de microalgas que possam ser empregadas em sistemas de cultivos ao ar livre para absorção do CO₂ atmosférico;
- Ecologia microbiana aplicada à aqüicultura: a) qualidade ambiental e nutricional com uso de biofilme em cultivo de camarão *Farfantepenaeus paulensis*; b) uso de probióticos; c) manipulação do crescimento de microorganismos desejáveis através de limitações de N:P; d) quantificação e qualificação da incidência de vírus em camarões livres e de cultivo na região da lagoa dos Patos;
- Projeto da Antártica: análises e caracterização de associações fitoplanctônicas do ambiente de amostragem realizadas pela expedição de pesquisadores brasileiros no início de 2005 (PROANTAR XV).

3. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

3.1 Atividades Gerais

As atividades gerais englobaram: a) o monitoramento de qualidade de água que consistiu na coleta de amostras, análise de nutrientes dissolvidos, quantificação do *seston* e análise de clorofila-*a* para determinação da biomassa de microalgas; b) o isolamento e cultivo de microalgas com experimentos de criopreservação de cepas e estimativa de produtividade primária pelos métodos do oxigênio e do C¹⁴; c) identificação e determinação da abundância de microorganismos planctônicos em microscópio invertido; e d) determinação da abundância de bactérias, flagelados e ciliados por meio de microscopia de epifluorescência.

3.1.1 Monitoramento para controle da qualidade da água

O monitoramento da qualidade da água faz parte do Programa Ecológico de Longa Duração, que faz a integração com vários outros laboratórios e grupos de pesquisa para promover um estudo detalhado da ecologia e dinâmica da região da Lagoa dos Patos e da praia do Cassino (Figura 1).



Figura 1: Desembocadura da Lagoa dos Patos e início da praia do Cassino. Fonte : www.peld.furg.

A Lagoa dos Patos é um complexo lagunar de alto valor econômico para a comunidade local, a indústria pesqueira e atividade portuária. Alguns pescadores locais, além de tirarem o sustento do ambiente por meio da pesca artesanal, também desenvolvem práticas de cultivo do camarão nativo, *Farfantepenaeus paulensis*. Essa prática foi difundida na comunidade por meio do incentivo de pesquisadores da Estação Marinha de Aqüicultura da FURG (EMA), que desde 1994, desenvolvem pesquisas para promoção dessa atividade com a produção de pós-larvas e melhorias de técnicas de cultivo. O objetivo é oferecer aos pescadores uma alternativa de renda adicional com o cultivo de camarões em estruturas de baixo custo (Pissetti, 2004).

A praia do Cassino é a mais extensa do Brasil, de quase 300 quilômetros, com início no molhes oeste da desembocadura da Lagoa dos Patos e término na Barra do Chuí, na fronteira com o Uruguai. Ela está sujeita a fenômenos de resuspensão do sedimento, principalmente pela ocorrência de fatores meteorológicos de larga escala, alterando a composição da biomassa fitoplanctônica, com a resuspensão de microalgas bentônicas. Um exemplo é a ocorrência do *bloom* de uma diatomácea bentônica, *Asterionellopsis glaciaris*, na zona de arrebentação (Figura 2), principalmente em passagens de frente frias.



Figura 2: Bloom de *Asterionellopsis glaciaris* na praia do Cassino

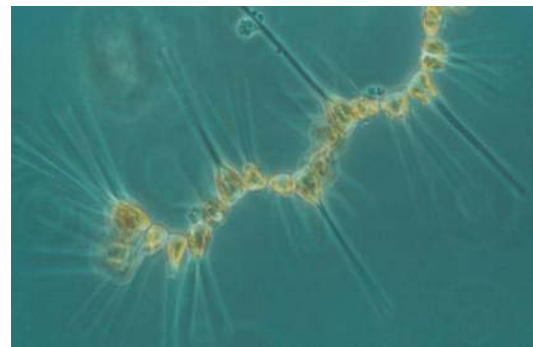


Figura 3: *Asterionellopsis glaciaris* em microscópio invertido Zeiss (Axiovert). Foto cedida por Clarisse Odebrecht

Os monitoramentos são, portanto, amplamente utilizados em programas de alarme para a ocorrência de blooms de fitoplâncton, sendo possível a sua prevenção ou detecção em tempo curto (Horner, 2002). Os blooms de espécies bioindicadoras

podem ser indicativos da condição trófica do ambiente e de perigos relacionados à saúde pública, quando se tratar de algas nocivas. A prevenção desses *blooms* é importante tanto para banhistas como para produtores aquícolas.

A atividade do monitoramento da qualidade da água consistiu na coleta das amostras, na análise de nutrientes dissolvidos, na quantificação do *seston* e na análise de clorofila-a para determinação da biomassa de microalgas. As etapas do monitoramento da água são descritas a seguir.

3.1.1.1 Coletas de água em campo

As coletas de água são realizadas mensalmente em três pontos de amostragem: um próximo ao Museu Oceanográfico, na Lagoa dos Patos, outro próximo aos molhes, na desembocadura da laguna, e o último em frente à Estação Marinha de Aquicultura da FURG (EMA), na praia do Cassino.

Para a coleta de água são utilizadas garrafas de plástico escuras, que comportam um volume adequado para a realização das análises laboratoriais, e que são utilizadas para o seu transporte até o Laboratório.

Em geral, essas amostragens são utilizadas para análises físico-químicas e análises quantitativas de microorganismos presentes na amostra. Para as análises qualitativas de microorganismos, presentes na região, são utilizadas as redes de plâncton que facilitam a observação, aumentando a região de captura e as chances de obter maior diversidade de microorganismos na amostra coletada. O tamanho ideal dessas redes é de 25 cm de diâmetro da boca, 60 cm de comprimento com uma garrafa de coleta no final com rede de 20 μm (Horner, 2002). A rede é arrastada por um determinado tempo abrangendo a região da coleta e depois o conteúdo da garrafa é transferido para as garrafas de transporte.

Os parâmetros do local, onde foram feitas as coletas, são anotados nas fichas de campo registrando: condições climáticas, vento, correnteza, maré, estado do mar, presença de manchas (*blooms*), presença de lama, disco de secchi e temperatura do ar e da água. A salinidade é medida em laboratório com o termosalinômetro ou espectrofotômetro.

Ao chegar no Laboratório as alíquotas das amostras são separadas de acordo com as análises a que serão submetidas. As amostras para as análises de nutrientes são filtradas e estocadas em frascos plásticos. As amostras para análise do plâncton, tanto as de rede quanto as de garrafas, são transferidas para frascos de vidro com um fixador e posteriormente armazenados à temperatura ambiente até a análise microscópica. O vidro é mais recomendado para esse tipo de estocagem devido à sílica que ajuda as diatomáceas a se conservarem, além de evitar que as células se prendam nas paredes do frasco.

Os fixadores utilizados pelo Laboratório são a formalina a 37%, que diluída na amostra deve obter uma concentração de 4%, e o lugol neutro a 1%. Utiliza-se uma alíquota para cada fixador, pois alguns microorganismos se conservam melhor em um ou outro, dependendo da sua composição bioquímica. O lugol pode deformar algumas espécies dificultando a identificação das mesmas. Em geral as diatomáceas não ficam coradas devido à carapaça com sílica e os dinoflagelados, flagelados e ciliados ficam bem corados (avermelhados). É recomendado, também, que se faça a análise de uma sub-amostra fresca, para encontrar detalhes nos organismos ainda vivos que podem facilitar a sua identificação, como tipo de movimentação, coloração, forma, etc.

3.1.1.2 Análise de nutrientes inorgânicos dissolvidos

Os nutrientes inorgânicos dissolvidos são: amônia total, nitrito, nitrato, fosfato e silicato. Para sua determinação são utilizadas subalíquotas das amostras coletadas da água, para cada nutriente, previamente filtradas com bomba de pressão à vácuo, em membranas de porosidade controlada (0,45µm). Isso se faz necessário para a eliminação de interferências causadas pelo material em suspensão na leitura das análises. Essas subalíquotas são congeladas e conservadas à -20°C até o momento da análise com exceção da amônia total, cuja análise é feita imediatamente após a filtração. As análises são realizadas através da metodologia analítica de espectrofotometria, na faixa de luz visível, com métodos descritos por diversos autores para cada nutriente (amônia total, nitrito, nitrato, fosfato e sílica) conforme descrito a seguir.

Amônia total

O nitrogênio amoniacal está presente sob duas formas dissolvidas: a amônia (NH_3) e o íon amônio (NH_4^+), cujas proporções relativas dependem do pH, da temperatura e da salinidade do meio. Sua forma mais tóxica é a não ionizada (NH_3), ocorrendo normalmente em baixas proporções no ambiente (Bumgarten *et. al.*, 1996). Para águas costeiras não poluídas e no oceano, as concentrações geralmente são da ordem de 1uM (Aminot e Chaussepied, 1983). Quanto ao NH_3 , o limite máximo estipulado é de 0,02 mg/l, a partir do qual a toxicidade é mais significativa (Train. 1979).

A amônia presente nos ambientes aquáticos possui diversas origens, dentre elas, a excreção dos organismos, a mineralização da matéria orgânica por bactérias heterotróficas e fontes externas como descargas de efluentes orgânicos e fertilizantes (Russo, 1985). Em situações de anoxia há interrupção do processo de nitrificação, acumulando esse composto no ambiente e aumentando a toxicidade do mesmo para os organismos aquáticos. Essa relação da toxicidade da amônia com o a concentração do oxigênio dissolvido é descrito por Russo (1985) entre outros.

A amônia é também um fator limitante para o crescimento do fitoplâncton, pois é a forma na qual o nitrogênio é mais facilmente absorvido, podendo ser causador de processos de eutrofização quando há elevações da sua concentração no ambiente.

O método adotado pelo Laboratório para detecção da amônia total ($\text{NH}_3 + \text{NH}_4^+$) é o de Carlberg (1972) que se baseia no princípio de que, em meio ligeiramente básico (pH entre 10,8 e 11,5), a amônia reage com o ácido diclorocíariúrico, formando uma monocloraruina. Esta, em presença de fenol e de um excesso de hipoclorito, além do nitroprussiato de sódio como catalizador, forma o azul de indofenol, absorvido no comprimento de onda de 630nm. Para evitar a precipitação dos íons alcalinos terrosos em meio básico, o citrato de sódio é adicionado como complexante. Os reagentes e o procedimento de análise se encontram descritos a seguir.

a) Reagentes

Reagente A:

- diluir 35g de fenol e 400mg de nitroprussiato de sódio dihidratado em 1000ml H₂O destilada.

Reagente B:

- diluir 20g de hidróxido de sódio e 2g de ácido diclorocítrico em 1000ml de H₂O destilada.

Tampão:

- diluir 66,7g de citrato trissódico, 34g de ácido bórico, 30g de hidróxido de sódio e 19,4g de ácido cítrico em 1000ml de H₂O destilada.

b) Procedimento

A amostra, separada para quantificação da amônia, é redistribuída em tubos de ensaio com tampa, colocando 15ml em cada um, com triplicatas. Nestes são adicionados mais 1 ml de cada reagente sendo o primeiro o tampão, o segundo o A e por último o B. Em seguida são agitados para a homogeneização, e guardados no escuro por 24 horas até a leitura. A leitura é realizada no fotocolorímetro. Primeiro coloca-se o filtro correspondente ao comprimento de onda da reação da amônia no aparelho. Depois se faz o branco com água destilada, zerando o aparelho e calibrando toda vez que colocar nova amostra. O leitor é analógico e quando é colocada uma nova amostra o ponteiro sai do zero e move-se de acordo com a leitura. Manualmente se faz girar o ponteiro de volta ao zero e registra o valor do quanto girou, que é dado em transmitância. Esse valor é então convertido para absorbância através de uma tabela, que é plotada na reta padrão da amônia para se achar a concentração.

Nota: Esse cálculo da concentração, através da plotagem na reta padrão é utilizada para todos os nutrientes, utilizando concentrações conhecidas de cada um (soluções padrões) e relacionando com a leitura obtida para cada concentração. Uma vez que se faz a reta padrão do nutriente (leitura x concentração), podem-se obter as concentrações de todas as leituras das análises. Esse procedimento é realizado apenas uma vez para início das análises, ou para fins de calibração o aparelho.

Nitrito

O nitrito está normalmente presente no ambiente em concentrações traço, devido a sua rápida oxidação a nitrato por bactérias nitrificantes, é o composto intermediário da reação da nitrificação da amônia. Nas águas oceânicas, as concentrações normalmente são menores que $0,1\mu\text{M N-NO}_2^-$ e nas águas costeiras elas são da ordem de $0,01\mu\text{M}$ a $1\mu\text{M}$ (Bumgarten *et al.*, 1996). O nitrito pode ser encontrado em concentrações mais elevadas, quando a reação de nitrificação é afetada por uma série de fatores como pH, temperatura, oxigênio dissolvido, número de bactérias nitrificantes e presença de compostos inibidores (Russo, 1985). Neste caso, pode chegar a níveis tóxicos para os organismos aquáticos, podendo ser letal. No caso dos peixes, o nitrito se liga com a hemoglobina formando um composto de metahemoglobina, tornando-a incapacitada para o transporte de oxigênio e provocando morte por asfixia (Poli e Vinatéia, 2004).

O método de análise está baseado na reação de Griess, e foi aplicado à água do mar por Benschneider e Robinson (1952) e descrito por Aminot et Chaussepied (1983). Os íons nitrito formam um diazóico com a sulfanilamida (reagente 1) em meio ácido (pH menor que 2) e depois o diazóico reage com o N-naftil-etilenodiamina (reagente 2) formando um corante. A preparação dos reagentes e o procedimento de análise se encontram descritos a seguir.

a) Reagentes

- Reagente 1 - Solução de Sulfanilamida:

- diluir 50ml de ácido clorídrico concentrado ($d = 1,18$) em aproximadamente 300ml de água destilada.
- dissolver 5g de sulfanilamina, na solução anterior e completar até 500ml.

- Reagente 2 - Solução de N-naftil-etilenodiamino:

- dissolver 0,5g de diclorohidrato de N- (1- naftil etilenodiamino em 500ml de água destilada.

b) Procedimento

- Lavar uma proveta de 50ml com água destilada e analisar $50\pm 1\text{ml}$ de amostra.
- Colocar 1ml do reagente 1 e agitar.
- Deixar em repouso por 2 a 8 minutos.

- Adicionar 1ml do reagente 2 e agitar
- Esperar ao menos 10 minutos, mas não mais que 2 horas e fazer a leitura no fotocolorímetro a um comprimento de onda de 543nm.

Nitrato

O íon NO_3^- é o composto formado pela reação completa da nitrificação, ou seja a oxidação da amônia pelas bactérias nitrificantes. Pode ser encontrado em altas concentrações no ambiente sendo que existem poucos estudos em relação a sua toxicidade para os organismos aquáticos. No entanto, há trabalhos que indicam que ele pode exercer um efeito sobre a osmorregulação e o transporte de oxigênio nos organismos (Poli e Vinatéia, 2004). Em ambientes costeiros as concentrações normais são da ordem de 10 a $15\mu\text{M}$ (Aminot e Chaussepied, 1983).

O método de análise está baseado na dosagem dos íons nitrito (NO_2^-) obtidos por redução quantitativa (aproximadamente 95%), dos íons nitrato (NO_3^-). A amostra passa por uma coluna de cádmio redutora, para transformar todos os nitratos em nitrito, e depois se faz a quantificação do nitrito presente na amostra (reduzida) com o mesmo método descrito no item anterior de dosagem de nitritos. A concentração da leitura que se obtém, é o somatório dos íons nitrito e nitrato na amostra, portanto para calcular a concentração do nitrato (que foi reduzido), basta descontar o valor do nitrito obtido pela análise feita na amostra antes de passar na coluna redutor.

A coluna redutora de cádmio é tratada por uma solução cúprica (Wood *et al*, 1967) e método é descrito por Strickland and Parsons (1972) com uma pequena modificação que consiste na utilização do cloreto de amônia e não EDTA como ativador (Bumgarten *et al.*, 1996). A preparação dos reagentes e o procedimento de análise se encontram descritos a seguir.

a) Reagentes:

- Reagente 1: Solução de Sulfanilamida: a mesma usada para os nitritos
- Reagente 2: Solução de N-naftil-etilenodiamina. (idem ao anterior)
- Solução concentrada de cloreto de amônia:
 - dissolver 125g de NH_4Cl p. a em 500ml de água destilada
- Solução diluída de cloreto de amônia:

- diluir 40 vezes a solução anterior com água destilada (25ml/L de solução)
- Solução de sulfato de cobre:
 - dissolver 10g de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) em 500ml de água destilada.

b) Procedimento

Para realizar a análise desses nutrientes é preciso primeiro preparar a coluna redutora (preparação do cádmio, enchimento e tratamento da coluna e manutenção), mas uma vez preparada pode se manter por várias análises. Mas, ainda assim antes de cada análise é preciso fazer a lavagem da coluna como segue:

Preparação da coluna para análise:

- lavar em HCL 2N
- lavar c/ H_2O destilada
- - lavar rapidamente c/ HNO_3 0,3N
- lavar c/ H_2O destilada
- lavar novamente c/ HCl 2N
- lavar abundantemente c/ H_2O destilada
- tratar c/ solução de sulfato de cobre até solução se descolorar
- lavar com água destilada

Análise da soma Nitrato + Nitrito:

- a uns 100ml +/- 2ml da amostra, adicionar 2 ml de solução concentrada de cloreto de amônia e misturar cuidadosamente;
- colocar aproximadamente 5ml desta solução na coluna e deixe escoar (para diminuir os riscos de interferência nas amostras sucessivas);
- colocar então o resto da amostra;
- rejeitar os primeiros 30ml;
- lavar uma proveta graduada de 50ml com alguns mililitros da solução que sai da coluna e coletar 50ml;
- adicionar logo 1ml de solução de sulfalamina (reagente 1) e misturar;
- deixe em repouso por 2 a 8 min;
- adicionar 1 ml de solução de N-naftil-etilenodiamino e misturar;
- espere ao menos 10 min, mas não mais que 2h e faça a leitura.

Análise dos íons Nitrito:

- a uns 50ml +/- 1ml da amostra, adicionar 1ml de solução concentrada de NH₄Cl e misturar; seguir a dosagem como se fosse 50ml de efluente da coluna.

O cálculo da concentração se faz através da seguinte fórmula:

$$[\text{NO}_3] \text{ em } \mu\text{M} = \text{C}/\text{R} \{ r/\text{R} \times [\text{NO}_2] \}$$

em que:

- [NO₂⁻] é a concentração original do nitrito, previamente analisada em outra alíquota da amostra.
- Os valores dos rendimentos R (rendimento da redução) e r (percentual dos NO₂⁻ já presentes na amostra), são os referentes à coluna na qual a amostra foi passada.
- O valor de C é o somatório das concentrações de nitrito original dosado mais nitrato reduzido

Fosfato

O fósforo é um elemento essencial à vida aquática e aos sistemas biológicos. É geralmente, reconhecido como nutriente chave na fertilização dos lagos, e o suprimento deste elemento muitas vezes regula a produtividade natural da água, desempenhando um papel limitante e que pode determinar a abundância do plâncton (Poli e Vinatéia, 2004).

As fontes de fósforo podem ser de origens naturais, através do intemperismo de rochas fosfatadas, mineralização da matéria orgânica, ou de origem antropogênico decorrente de atividades agrícolas (fertilizantes) e pela poluição de detergentes (polifosfatados), podendo acarretar processos de eutrofização no ambiente.

Os teores de fosfato são normalmente fracos na superfície dos oceanos e zonas costeiras não-poluídas: variam de 0 a 1μM P- PO₄³⁻ (Bumgarten, *et al.*, 1996).

O método de análise foi adaptado de Murphy e Riley (1968) e descrito em Aminot e Chaussepied (1983) sendo simples e rápido para dosagem de íons ortofosfato (PO₄³⁻ e HPO₄²⁻), em água salgada. Os íons fosfato reagem com o molibdato de amônia para formar um complexo (de cor amarela) que é reduzido pelo ácido ascórbico. Esta forma reduzida fica de coloração azul, a um máximo de

absorção de 885nm. A reação de redução é catalizada pelo antimônio. A preparação e mistura dos reagentes, e o procedimento de análise se encontram descritos a seguir.

a) Reagentes

- Solução de Amônio Heptamolibdato (Molibdato de amônia):

- dissolver 15g de paramolibdato de amônia p.a, de preferência em pó fino, em 500 ml de água destilada;
- conservar em frasco plástico e ao abrigo da luz.

- Ácido sulfúrico 5N:

- diluir pouco a pouco 140ml de ácido sulfúrico p.a (densidade= 1,83) em 900ml de água destilada;
- deixar esfriar e conservar em garrafa de vidro.

- Solução de ácido ascórbico:

- dissolver 27g de ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) em 500ml de água destilada;
- guardar em frascos de plástico no congelador ou na geladeira ao abrigo da luz.

- Solução de Potássio e Antimônio Tartarato (Tartato emético):

- dissolver 0,34g de tartarato de potássio e antimônio (emético) em 250ml de água destilada e aquecida se necessário.

b) Mistura de reagentes:

- 100ml de solução de molibdato de amônio

- 250ml de ácido sulfúrico 5N;
- 100ml de solução de ácido ascórbico;
- 50ml de solução de emético.

Essa mistura deve ser preparada antes de cada série de análises e a quantidade descrita é suficiente para 50 amostras.

c) Procedimento

Para 100ml da amostra, adicionar $10 \pm 0,5$ ml de mistura de reagentes e misturar.

Espera 5 min e efetua a medição no fotocolorímetro seguindo as mesmas instruções que o anterior (amônia). A única mudança é no filtro a ser utilizado.

Sílica

O silício é um elemento nutritivo para algumas espécies planctônicas, pois faz parte da composição de frústulas, espículas e outras estruturas celulares.

A concentração no oceano é baixa, chegando a cerca de $1\mu\text{M}$ de Si. Em zonas costeiras e em regiões estuarinas, as concentrações são maiores, em média cerca de $150\mu\text{M}$ (Bumgarten, *et al.*, 1996). O silício não apresenta um poluente potencial (Aminot e Chaussepied, 1983). Sua principal fonte é do intemperismo de rochas provocada pela drenagem continental. 95% do silício dissolvido que se encontra na água do mar ($\text{pH} \cong 8,2$), está sob forma de ácido ortosilício $\text{Si}(\text{OH})_4$, e 5% sob forma iônica $\text{Si}(\text{OH})_3^-$ (Bumgarten, *et al.*, 1996).

O método de análise utilizado é o de Mullin e Riley (1955), adaptado por Strickland e Parsons (1972), que se baseia na formação de um complexo silicomolibdato (com o reagente 1, ficando amarelo) e que é reduzido (com o reagente 2) para obter uma coloração azul intensa (810nm). Esse método é apenas para dosagem do silício reativo, já que alguns polímeros não reagem com o molibdato (apenas os mono e dímeros). As análises preparadas para a dosagem do silício devem ter o cuidado de não utilizar frascaria de vidro, para não interferir nos resultados da amostra. A preparação dos reagentes e soluções, e o procedimento de análise estão descritos a seguir.

a) Reagentes

- Reagente 1 – Molibdato:

- dissolver 4 g de paramolibdato de amônia, em pó fino $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, em aproximadamente 300ml de água destilada;
- adicionar 12ml de ácido clorídrico concentrado (misturar até completar à 500ml com água destilada);
- conservar ao abrigo da luz.

- Solução de Metol- Sulfito:

- dissolver 6g de sulfito de sódio anidro, Na_2SO_3 , em 500ml de água destilada e adicionar 10g de metol (sulfato de p-metilamina-fenol); a dissolução do metol pode ser lenta;
- filtrar a solução com papel Whatman no. 1;

- essa solução se conserva por apenas 2 ou 3 semanas.
- Solução Saturada de ácido oxálico:
 - agitar 50g de ácido oxálico p.a [(COOH)₂, 2H₂O], e 500ml de água destilada. Deixe decantar e tome o sobrenadante.
- Solução de ácido Sulfúrico a 50% em volume:
 - adicionar, com precaução e misturando gradativamente, 250ml de ácido sulfúrico concentrado p.a (d= 1,18) com 250ml de água destilada.
- Reagente 2 - Redutor:
 - É a mistura dos outros reagentes na ordem descrita:
 - 100ml de solução de metol- sulfito.
 - 60ml de solução de ácido oxálico
 - 60ml de ácido sulfúrico a 50%
 - completar com 300ml de água destilada.
 - esta solução deve ser preparada antes de cada análise e não estocada.

b) Procedimento

Em uma proveta de polietileno de 50ml introduzir 10ml do reagente 1.

Adicionar com uma pipeta, 25ml da amostra, tampar e misturar.

Esperar no mínimo 10 min e anotar esse tempo com uma precisão de ½ minuto para operar sempre de forma idêntica.

Adicionar rapidamente o reagente 2 (preparado antes do uso) para completar 50ml e misturar logo.

Esperar de 2 a 3 horas e fazer a leitura no fotocolorímetro.

A concentração é dada através da plotagem da leitura sobre a reta padrão. Se necessário, fazer a correção da salinidade.

Nota: No momento das análises, todas as amostras devem estar descongeladas com temperatura entre 15 e 30°C. Os reagentes devem ser conservados de preferência em geladeira, ao abrigo de luz, e cada um possui um determinado tempo de prateleira que varia de semanas a meses.

3.1.1.3 Seston

O *seston*, ou material particulado em suspensão, é toda partícula presente na água que possui um diâmetro maior que 0,45µm. Ele pode ser de caráter orgânico (matéria orgânica inerte ou seres planctônicos) ou inorgânico (mineral ou sedimento).

As concentrações na água dependem da hidrodinâmica do sistema, da constituição do substrato e margens, de fatores meteorológicos, entre outros (Bumgarten *et al.*, 1996). Em geral as águas oceânicas profundas são pobres variando em média 50 µg/l, enquanto as continentais, principalmente as estuarinas são mais enriquecidas (Ivanoff, 1972).

O método de análise do *seston* foi adaptado de Srickland e Parsons (1972) com modificações citadas por Sharp (1974) e v. Bodungen *et al.* (1991). O princípio se baseia na gravimetria de volatilização.

O procedimento de análise para determinação do *seston* consiste na filtragem de 500ml da amostra em filtros de membrana de 0,45µm de porosidade, com peso seco conhecido (previamente secados em estufa e pesados). Após a filtragem, eles são retirados e colocados em placas de vidro (petri) e deixadas em estufa à 60°C por 24h. Depois são pesados em balança digital com 4 casas decimais. O resultado é obtido através da diferença do peso seco inicial e final do filtro e a extrapolação desse valor para o volume da amostra filtrada, no caso 500ml.

3.1.1.4 Análise de clorofila-a

A concentração da clorofila-a é muito utilizada como medida de determinação da biomassa fitoplanctônica por ser um pigmento comum a todos os organismos fotossintéticos, constituindo em média 1,5% do peso da matéria orgânica das algas (Poli A. *et al.*, 2004). Pode ser também uma medida de determinação da condição trófica do ambiente (Tabela 1). No entanto, esta não pode ser a única medida para determinação da biomassa fitoplanctônica visto que as microalgas possuem diferentes concentrações de clorofila-a na célula e diferentes tamanhos de célula.

Tabela 1: Concentrações de Cl a ($\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$) em diferentes condições tróficas, em ambientes marinhos. Fonte: Nixon, 1995.

Cl a (mg m^{-3})	Costeiro	Oceânico
Oligotrófico	<1	<0,05
Mesotrófico	1-5	0,05-0,1
Eutrófico	5-10	0,1-0,2
Politrófico(Hipertrófico)	>10	>0,2

O método utilizado na determinação da clorofila-a está descrito em Strickland e Parson (1972) e se baseia na extração dos pigmentos com solventes orgânicos (acetona, éter ou metanol) e leitura da densidade óptica a comprimentos de onda de 750, 665, 645 e 630 nanômetros da solução contendo clorofila.

No procedimento de clorofila-a são separados 50ml de água para filtragem em um filtro de membrana de acetato de celulose de 55mm de diâmetro e $0,2\mu\text{m}$ de porosidade. A filtragem é feita com o ambiente escurecido a fim de não alterar a concentração de clorofila-a da amostra. Os filtros são guardados em frascos pequenos de vidro (vials) com 10ml de solvente acetona (90%), embrulhados com alumínio e estocados na geladeira (-12°C) para ser medido no dia seguinte (após 24h). A leitura é feita no fluorímetro Turner modelo TD-700 (Figura 4). A calibração é feita com acetona 90% (branco da amostra), já que as amostras estão conservadas com essa solução. Coloca-se, então, 10ml da amostra no frasco e faz-se a leitura. Se necessário diluir. O resultado é dado pela equação: $\text{Cl } \mu\text{g/l} = L \times (v/V)$, em que L é a leitura, v o volume de acetona usado na diluição e V o volume da amostra.

A calibração desse equipamento não é rotineira, portanto há duas concentrações conhecidas em sólido no qual faz-se a leitura para conferir a calibração antes do uso do equipamento.



Figura 4: Fluorímetro Turner modelo TD-700.

3.1.2 Isolamento e cultivo de microalgas

O Laboratório também dispõe de um banco de espécies nativas de microalgas, que são isoladas das amostras coletadas durante os monitoramentos. Logo que as amostras chegam no laboratório, uma parte é separada e colocada em meio de cultivo (Guillard, 1975), e condições de cultivo que serão detalhadas mais adiante. Dessa cultura, são isoladas, espécies de interesse do laboratório, a serem identificadas, para testes de cultivo e determinação de produtividade.

Existem vários métodos para se fazer este isolamento, depende das condições do laboratório, do tipo de espécie que se quer isolar (flagelado, ciliado, diatomácea) e das condições da amostra a ser utilizada (muito ou pouco material). Os métodos podem ser: 1) Coleta com capilar de vidro: Geralmente utilizado para células maiores de $30\mu\text{m}$ ou em cadeias; 2) Diluição seriada: através de diluições sucessivas, pretende-se terminar com uma única célula ou pelo menos células da mesma espécie num tubo; 3) Inoculação em placa de ágar utilizado para células pequenas, menores de $10\mu\text{m}$ e consiste em inocular uma placa de Petri contendo o meio de cultivo + ágar e colocar na incubadora; quando estiver com colônias visíveis, deve-se resuspendê-las em meio de cultivo líquido; 4) Migração fotolítica: utilizado para flagelados que possuem fototactismo positivo que consiste na atração destas células que migram para um ponto luminoso, facilitando seu posterior isolamento com capilar. O Laboratório utiliza o método por capilaridade o qual é descrito a seguir.

Materiais:

Microscópio, tubos de ensaio com meio de cultura estéril (f/10 com a salinidade ajusta à amostra), pipetas pauster, mangueira fina de silicone.

Procedimento:

a) Coloca-se 1 gota da amostra no canto da lâmina + 6 gotas de meio de cultivo ao longo da lâmina; b) Esquentar a ponta da pipeta de vidro (no bico de bunsen) até esticar (segurando com uma pinça) e quebra essa ponta para ficar com uma abertura fina; c) Mergulhe a pipeta em água fervente sempre que iniciar; d) Prenda com a língua numa ponta do tubo de silicone e tenta colocar a ponta da pipeta na alga que se quer isolar e transfira para a gota seguinte (de meio estéril); e) Repete-se a operação até que se tenha conseguido isolar uma única célula; f) Ao final transfira a gota com a alga isolada para um tubo de ensaio, previamente preparado com meio de cultura (f/10) e incubar.

Nota-se que para o isolamento, o meio de cultivo é mais diluído (f/10) do que o normalmente utilizado em cultivos monoalgais (f/2), ou seja, 5 vezes mais diluído. Isso se faz necessário para que não haja um choque de composição de nutrientes do meio preparado com o meio do ambiente de qual foi coletada a amostra. Fazendo então uma aclimação das espécies coletadas para depois colocá-las em meio f/2.

O preparo do meio de cultivo é feito de acordo com as exigências das espécies cultivadas. O meio de cultivo f/2 de Guillard (1975) é um dos mais utilizados em cultivos monoalgais, pois tem se provado adequado para um grande número de espécies de fitoplâncton. A composição do meio de cultivo segue descrito a seguir:

Para 1L de água do Mar:

NaNO₃.....75mg

NaH₂PO₄.H₂O.....5mg

Na₂SiO₃.9H₂O.....10-30mg

Metais traços:

Na₂. EDTA+.....4,36mg

FeCl₃. 6H₂O+...3,15 mg

CuSO₄.5H₂O.....0,01 mg

ZnSO₄.7H₂O....0,022 mg

CoCl₂.4H₂O...0,18 mg

Na₂MoO₃.2H₂O.....0,006 mg

Vitaminas:

Tiamina. HCl....0,1 mg

Biotina....0,5 mg

B12....0,5 mg

Os principais nutrientes são preparados em soluções de estoque 100 vezes mais concentrados, de modo que possa ser adicionado 1 ml da solução por litro do meio de cultivo cada vez que este for preparado. Os metais traços (menos EDTA) são preparados separadamente em estoques concentrados 106 vezes (estoque primário). A partir deste se prepara o estoque de trabalho, adicionando 4,36g de Na₂EDTA e 1 ml de cada solução primária, completando-se a 1 L com água destilada. Utiliza-se 1 ml deste estoque de trabalho para cada litro de meio de cultivo. A esterilização do meio de cultivo é comumente realizada por autoclavagem, o que pode causar mudanças no pH da solução. Para manutenção do pH em torno de 7,2, pode-se adicionar tampões orgânicos como TRIS (hidroximetil amino-metano). A solução de TRIS é preparada na concentração 50g/200ml, de água destilada, e adicionado 25 ml de HCL para manter o pH entre 7,1 e 7,3. As vitaminas são adicionadas após a autoclavagem dos meios, para que não haja a desnaturação das mesmas e são preparadas a partir de soluções primárias, da seguinte maneira:

- Biotina: prepara-se solução concentrada 0,1 mg/ml
- B-12: prepara-se solução de concentração 1 mg/ml

A solução de trabalho de vitaminas é preparada com 1 ml da solução de biotina, 0,1 ml da solução de B-12 e adiciona-se 20 mg de tiamina HCl, completando-se a 100 ml. Utiliza-se 0,5 ml desta solução por litro de meio de cultivo.

Dependendo da espécie deve-se também fazer algumas alterações na composição do meio, de acordo com sua exigência, como no caso das cianobactérias onde é adicionado o cloreto de amônio.

3.1.2.1 Manutenção das Cepas

A manutenção das cepas isoladas no Laboratório é realizada por meio do processo de repicagem, que consiste na transferência de um meio concentrado de cultivo monoalgal, a um meio de cultivo estéril com volume maior, a fim de oferecer condições favoráveis à continuação do crescimento algal: maior disponibilidade de nutrientes, luz, etc. A repicagem deve ser feita na fase exponencial de crescimento da cultura. As curvas de crescimento das microalgas dependem da espécie e das condições de cultivo a que ela é submetida, variando de acordo com as condições do laboratório e a metodologia empregada (Silva *et al.*, 2004). Sendo assim, seria necessário fazer a curva de crescimento para cada espécie isolada, mas o Laboratório adotou um padrão de repicagem de 15 em 15 dias para todos os cultivos em volumes pequenos de 10 a 200 ml, fazendo um controle do crescimento das microalgas expondo às diferentes intensidades de luz: a de intensidade mais baixa com 36,5 μM para as espécies que tem um crescimento rápido, a intermediária com 66,5 μM , e a intensidade mais alta com 166,5 μM , onde ficam as espécies com um crescimento mais lento. Isso facilita o procedimento laboratorial e até onde se sabe, não interferiu na qualidade de manutenção das cepas.

As cepas são incubadas em Câmara Ambiente de Germinação – Modelo 347-CDG (Figura 5) a 19- 20 °C de temperatura controlada e às diferentes intensidades luminosas como citado anteriormente. Todas com fotoperíodo de 12 h no claro e 12 h no escuro, o que auxilia numa sincronia da divisão celular das células algais. São cerca de 39 espécies isoladas desde 2003, algumas ainda a serem identificadas. O Laboratório também possui cepas do Rio Grande do Norte, do Projeto Petobrás, que são mantidas a 24,5-25 °C, separadas numa única incubadora. Estas cepas são em sua maioria de cianobactérias, mas há muitas ainda a serem identificadas.



Figura 5: Banco de cultivos de microalgas na Câmara Ambiente de Germinação- Modelo 347. Fonte: Borges, 2004.

3.1.2.2 Criopreservação das Cepas de Microalgas

Este procedimento não faz parte da rotina laboratorial, está apenas em fase de experimentação, portanto o laboratório ainda não dispõe de uma metodologia definida para essa aplicação tecnológica. O objetivo principal é fazer a criopreservação das cepas do banco de espécies do Laboratório, a fim de otimizar o espaço físico, custo, material e trabalho da manutenção dos cultivos. Citarei, aqui, o experimento realizado durante o período do estágio.

As espécies selecionadas para o primeiro experimento foram aquelas que obtiveram os melhores resultados num experimento de estimativa de produtividade, que foram *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira fluviatilis* e *Nanochloropsis oculata* (todas de interesse para uso na aquicultura). O experimento objetivou avaliar a viabilidade de estocagem em nitrogênio líquido (-180 °C) e freezer convencional (-20

°C) das cepas, utilizando três diferentes crioprotetores: metanol, glicerina e água de coco, e o tempo de prateleira para cada método e espécie.

Os cultivos utilizados para a experimentação estavam na fase estacionária. Para cada espécie, foi preparada uma solução com o seu respectivo cultivo e os crioprotetores, separadamente com duas diluições cada, de 5 e 10 %. Essas soluções foram então distribuídas em ampolas com 1ml, e foram feitas duplicatas para cada tratamento. As ampolas foram colocadas primeiramente em congelador convencional por algumas horas e depois emersas em nitrogênio líquido à $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$, num botijão com capacidade de armazenamento dessas ampolas por 30 e 90 dias.

Foi deixada uma leva do experimento apenas para estocagem no freezer, para avaliação do tempo de prateleira, também com esse método. No caso, estes foram retirados após 6 meses de estocagem para avaliação da viabilidade com os diferentes tratamentos. Depois do tempo decorrido tanto do experimento com o nitrogênio líquido, como do freezer convencional, as ampolas foram retiradas e colocadas em banho maria para descongelar, por cerca de 5 minutos. Feito isso, elas foram colocadas em centrífuga e centrifugadas por 10 minutos à 4rpm para retirar o sobrenadante. Este pode se tornar tóxico devido aos crioprotetores. Adicionou-se então 1 ml de meio de cultura na própria ampola a fim de facilitar a retirada das células e transferí-las para todos de ensaio com meio de cultivo f/2, previamente preparado (4 ml). Estes foram, então, incubados no escuro por 1-2 dias, e depois transferidos para o claro, onde ficaram em observação para análise do crescimento (contagem de células no microscópio).

Os resultados obtidos não tiveram muito sucesso, com apenas algumas cepas tornando-se novamente viáveis em meios de cultivo. As sugestões foram que, seria mais adequada a utilização de biocongeladores, que abaixam a temperatura gradativamente até $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ para depois transferir para o nitrogênio líquido. Isso evita com que haja a formação de cristais de gelo que rompem a célula tornando-a inviável. No caso, eles apenas as deixaram no congelador convencional até a transferência. Além disso, o crioprotetor mais adequado é o DMS-O (dimetil-sulfeto oxidado), substância extraída de alguns grupos de microalgas marinhas, mas este é muito caro.

Outros experimentos serão realizados buscando outras metodologias alternativas que se enquadrem na disponibilidade do laboratório e buscando espécies que sejam mais resistentes a esse procedimento.

3.1.2.3 Estimativa de produtividade primária pelos métodos de produção de oxigênio dissolvido e absorção de ^{14}C :

As espécies mantidas no Laboratório que foram isoladas e identificadas são também submetidas a este experimento para investigar o potencial de produção em larga escala e possível valor comercial (aquicultura, indústria, biotecnologia), como mencionado anteriormente. Quando a produção primária é determinada pelos dois métodos, ou seja, absorção do C e liberação de O_2 , pode-se estimar o quociente fotossintético (PQ), que é a RAZÃO MOLAR entre o O_2 liberado (prod. Bruta) e o C absorvido durante a fotossíntese ($\text{PQ} = \text{mol O}_2/\text{mol CO}_2$). Com base nas reações fotossintéticas, cada mol de carbono assimilado é equivalente a um mol de O_2 liberado, o que valeria a um $\text{PQ} = 1$.

Para a realização do experimento o cultivo da microalga deve estar na fase logarítmica com um volume de pelo menos 5 L, em meio de cultivo f/2. O cultivo é repassado para frascos de vidro de 250 ml, para determinação do DBO, e de 110 ml, para a absorção do C-14. Estes são incubados em um aquário com temperatura controlada (mesma do cultivo) e uma fonte de luz (lâmpada halogênica de 250 W) colocada em uma das extremidades do aquário. Os frascos são dispostos enfileirados de acordo com o distanciamento da fonte de luz (da mais próxima a mais distante) a fim de avaliar a produtividade de acordo com as diferentes intensidades luminosas (Figura 6). Antes da realização dos experimentos, são tiradas amostras de 5 ml para análises de clorofila-a e contagem celular. O tempo de incubação é de 3 horas.



Figura 6: Frascos do experimento de produtividade com os métodos de determinação do O_2 e C-14, incubados no aquário. Fonte: Borges, 2004.

Avaliação da produção de O_2

O método foi introduzido por Gaarder and Gran (1927) e apesar das modificações introduzidas com o tempo, seu princípio permanece o mesmo. Baseia-se na determinação da concentração de oxigênio dissolvido em uma amostra num tempo inicial e depois de transcorrido um tempo de incubação à luz, durante o qual deve ter ocorrido fotossíntese e, conseqüentemente, produção de oxigênio.

A determinação do oxigênio dissolvido (OD) pode ser feita por métodos químicos (método de Winkler) ou eletroquímicos, por meio de eletrodos. O método de Winkler (Strickland and Parsons, 1972) é ainda universalmente utilizado pelo bom nível de precisão, mas, por outro lado os eletrodos de oxigênio têm a vantagem de rapidez e simplicidade. No caso, o laboratório utilizou um oxímetro Microprocessador Oximeter OXI 196.

São utilizados, então, 17 frascos para a medição do DBO, sendo 14 transparentes (Cc) e 3 escuras (Ce), e antes da incubação são tiradas as medidas de O_2 dissolvido em 7 dessas garrafas, marcando o início do experimento (Ci). As garrafas são então colocadas, para incubar no aquário, dispostas em 7 fileiras, com 2 frascos transparentes por fileira (duplicatas). A intensidade luminosa de cada fileira é medida através de um Li-Cor (Datalogger Modelo LI-1400). Ao final do período de incubação (3 horas), é feita novamente a medição do oxigênio nos frascos.

Por fim, aplica-se a fórmula para determinação da produção bruta, respiração e produção líquida.

Cálculo:

$$\text{Produção bruta (ugO}_2\text{/L/h)} = (\text{Cc} - \text{Ce})/\text{n.horas}$$

$$\text{Respiração (ugO}_2\text{/L/h)} = (\text{Ci} - \text{Ce})/\text{n.horas}$$

$$\text{Produção líquida (ugO}_2\text{/L/h)} = (\text{Cc}-\text{Ci})/\text{n.horas}$$

O decréscimo no teor de OD durante o período de incubação no escuro (Ci-Ce) representa uma medida da respiração da comunidade total presente. O acréscimo no teor de OD (Cc-Ci) representa uma medida da produção líquida. A variação total de OD (Cc-Ce) represente uma medida da produção total ou bruta.

Estes dados podem ser expressos em produção por hora (levando em conta o número de horas de incubação) ou por dia, levando-se em conta as horas de luz e de escuro (respiração).

Como as amostras que estão sendo tratadas são de cultivos monoalgais o emprego dessa técnica permite avaliar a produção primária líquida, já que estamos falando apenas de organismos fotossintetizantes. Se fosse coletada de um ambiente natural a comunidade presente na amostra seria composta também por organismos heterotróficos (bactérias, zooplâncton), contribuindo somente com a respiração. Neste caso, o método permite avaliar a produção bruta da comunidade biológica.

Método do C-14

O método do C-14 foi desenvolvido por Steeman-Nielsen (1952), e é baseado na quantificação do carbono absorvido pelas algas durante o processo fotossintético, e é bastante utilizado para determinação da produtividade primária.

A produtividade é calculada através do C-14 que é incorporado na produção primária particulada (incorporado pelas células), dissolvida (incorporado na matéria orgânica exudada pelas células do fitoplâncton) e total (particulada +dissolvida) e é dada em dpm (desintegrações por minuto). O C-14 que não é absorvido é eliminado através da agitação da amostra logo após a incubação com adição de HCL, que reaciona com o carbono dando H₂O e ¹⁴CO₂ (gasoso) e se volatiliza.

É feito o mesmo procedimento da transferência dos frascos que no anterior (produção de O₂) com garrafas claras e escuras. Mas desta vez são em frascos

menores (110 ml) e em cada frasco é adicionado 1 ml de bicarbonato de sódio C-14 ($\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$) radioativo com 1 $\mu\text{Ci/ml}$ de atividade. Antes da incubação separam-se 6 amostras de 50 μL , de alguns frascos, para o cálculo do conteúdo de carbono inicial.

Os frascos são, então, incubados e dispostos da mesma maneira que aqueles de produção de O_2 (expostos a diferentes intensidades de luz) e pelo mesmo período de 3 horas. Ao final do tempo de incubação, adiciona-se 1ml de formalina 37% nos frascos para interromper a fotossíntese, matando as células. Separam-se, então, 8 ml de cada frasco para a determinação do DBOC-14 total e filtram 10 ml de duas amostras, com filtros Whatman GF/F e auxílio de bomba a vácuo (pressão de $<5\text{pol. Hg}$), para a determinação do DBOC-14 particulado. Do filtrado retiram-se, duas amostras de 8 ml de cada, para a determinação da DBOC-14 dissolvida. Os filtros são colocadas em vials (de 20 ml) contendo 1 ml de HCl 6N e borbuhados por 20 min e deixados em dessecador por 24 h, para eliminar o C-14 inorgânico (Schindler 1972). Depois desse período, as amostras são neutralizadas com 1 ml de NaOH 6N, e completa-se o volume dos vials com o líquido de cintilação para a posterior leitura da radiatividade. A leitura é feita no cintilômetro Beckman - LS 6500.

A radioatividade inicial pode ser determinada em forma teórica, considerando 1 μCi equivalente a 222×10^4 dpm.

Por fim, então, pode-se calcular:

$$\text{Produção Primária (mg C/l/h)} = (A \times C \times k_1 \times k_2 \times k_3) / (B \times D)$$

Sendo:

As variáveis:

A = C-14 incorporado como COP, COD ou TOTAL (total na água, retido no filtro e no filtrado)

B = C-14 inicial disponível para ser incorporado (dpm iniciais da solução de incubação)

C = Carbono total na água do local de coleta = CO_2 mM/l x 12 (PM)

D = Tempo de incubação (h)

As constantes:

K1 = 1,05 compensação por a maior afinidade de C-14 a ser incorporado

K2 = 1,06 correção pela respiração de matéria orgânica durante o experimento

K3 = correção da subamostra (a proporção da garrafa que se filtrou ou separou, ex. 30 ml de 120 ml= 120/30)

A fórmula é aplicada para todas as medidas obtidas (dpm), tanto das garrafas claras como das escuras. As garrafas escuras são utilizadas para descontar a radioatividade adsorvida, mas não incorporada, assim o resultado final é calculado através da diferença de cada garrafa clara com a média das garrafas escuras.

Sendo então:

Produção primária = mg C//h médio de garrafas claras – mg C//h médio garrafas escuras

Além do quociente fotossintético (PQ), com os resultados obtidos de produção primária através desses experimentos, pode-se calcular o índice de assimilação do C dividindo-se as taxas de produção primária pela biomassa fitoplanctônica, o rendimento quântico (inclinação inicial da curva Pxl) calculado pela fórmula $\Delta P/\Delta I$, a máxima taxa da fotossíntese ($P_{m\acute{a}x}$) e a intensidade luminosa neste ponto (I_c $P_{m\acute{a}x}$) (Borges, 2004).

3.1.3 Identificação e determinação de abundância de microorganismos planctônicos em microscópio invertido

Como já dito anteriormente as amostragens realizadas na água com garrafas de coletas são para análises quantitativas e qualitativas dos microorganismos presentes na amostra, e as de rede de plâncton são apenas para análises qualitativas, a fim de aumentar o número de microorganismos coletados e facilitar a identificação e a compreensão da sua dinâmica no ambiente.

Para análise de microorganismos maiores, entre 3-50 μ m, pode-se utilizar o método de Utermöhl (1958) que consiste na utilização de câmaras especiais de sedimentação para observação em microscópio invertido. A vantagem desse método é que evita muito manuseio da amostra, preservando a integridade dos organismos ali presentes. As câmaras de sedimentação são nada mais que lâminas expeças com uma região que permite o acúmulo de um determinado volume da amostra (de 2 a 10 ml), permitindo assim uma concentração maior de organismos a serem observados.

Para a preparação da câmara, os frascos contendo as amostras previamente fixadas em lugol ou formalina, são agitados com movimentos consecutivos de cima para baixo, até se obter a melhor homogeneização possível. Aí, então, se coloca o volume desejado para análise sobre câmara de sedimentação, podendo ter o auxílio de um cilindro, se esse volume exceder a capacidade da câmara, e deixando-o descansar para o material sedimentar no fundo da câmara. O tempo de sedimentação vai de acordo com o volume colocado e o tipo do fixador (lugol ou formalina) O volume a ser sedimentado depende do ambiente e do tipo de água: amostra de água costeira normalmente requer menor volume (2 a 50 ml) do que as amostras de águas oceânicas (50 a 100 ml).

Tabela 2: Tempo de sedimentação recomendado como mínimo (Edler 1979).

Vol. Amostra MI	Altura do cilindro cm	Fixador	
		Solução de lugol	Formol 0,5%
2		3 h	12 h
10	2	8 h	24 h
50	10	24 h	48 h
100	20	48 h	96 h

Após o tempo determinado, com auxílio de uma lamínula expeça arrasta-se o cilindro, cobrindo a região de sedimentação, com cuidado para evitar a formação de bolhas que possam prejudicar a homogeneidade da amostra. A lamínula fica presa à câmara pela tensão da água que fica aderida entre as duas partes. Assim está pronta a câmara para ser observada no microscópio. O microscópio invertido permite a utilização dessas câmaras de sedimentação, pois, como o próprio nome sugere, as objetivas são dispostas de baixo para cima, ou seja, ficam em baixo da lâmina. A luz é emitida pela própria objetiva e há um kit de filtros (de luz) que se pode aplicar de acordo com a necessidade da visualização dos microorganismos e da objetiva que está sendo usada.

O microscópio, Axiovert, do Laboratório também possui uma câmara fotográfica digital aclopada, permitindo a visualização da amostra no computador e o registro de fotos das imagens para auxiliar na identificação.

Contagem

A contagem através da observação direta no microscópio é trabalhosa e exige qualificação técnica, mas é essencial para o estudo da ecologia dos microorganismos, oferecendo informações sobre a composição taxonômica, tamanho e concentração no ambiente. Para fazer a contagem, deve-se levar em consideração o número mínimo de organismos a serem contados que garanta uma margem de erro satisfatória. A distribuição dos organismos na câmara, também deve ser bem homogênea.

Em termos de praticidade recomenda-se utilizar o seguinte procedimento:

- Contar as espécies grandes ($> 50 \mu\text{m}$), em objetiva de menor aumento (5x ou 10x), em toda a câmara.
- Contar as espécies de tamanho médio (10 - 50 μm) em objetiva intermediária (10x, 20x), em uma área menor - faixas ou campos – de acordo com a concentração presente. A contagem em campos é mais aconselhada, pois possibilita verificar o coeficiente de variação (CV) a partir do valor médio (m) e o desvio padrão (dp) obtido entre os campos, para os organismos mais abundantes ($CV = dp * 100/m$). Para tal, dispõem-se os campos semi-aleatoriamente, cobrindo de forma representativa o fundo de toda a câmara. Em geral, são analisados entre 10 e 50 campos, sendo que o número pode ser reduzido se o coeficiente de variação for baixo (<20 ou 30%). A contagem em faixas também pode ser utilizada, e tem como vantagem a observação do diâmetro de toda a câmara, atenuando possíveis irregularidades de distribuição. O número de faixas analisadas normalmente varia entre uma e quatro, de acordo com o número de indivíduos contados;
- Contar os organismos menores ($< 10 \mu\text{m}$) no maior aumento disponível (mínimo 40x), em campos dispostos semi-aleatoriamente. O número de campos e os organismos contados seguem os critérios mencionados acima

Ao final da contagem, obtém-se, o valor do número de organismos/ml da amostra, multiplicando o número de organismos contados pelo fator de conversão correspondente à área de visualização da objetiva usada, o número de faixas ou campos contados, a área da câmara de sedimentação e o volume de amostra sedimentado. Esse fator varia de acordo com o microscópio utilizado e normalmente já vem junto com o equipamento em forma de tabela.

3.1.4 Determinação da abundância de bactérias, flagelados e ciliados por microscopia de epifluorescência;

As bactérias e muitos flagelados e ciliados menores ($\leq 3 \mu\text{m}$), necessitam de um tratamento especial com uso de corantes e fixação em filtros ($0,2 \mu\text{m}$) para sua observação em microscópio de epifluorescência.

O Laboratório utiliza metodologias com três tipos de corantes: o laranja de acridina (AO, *Acridina Orange*), o DAPI e o FISH (*Fluorescent In-Situ Hybridization*). O laranja de acridina faz ligações com toda matéria presente, corando todo material da amostra (organismos e material inerte ou particulado). Já o DAPI faz ligações com o RNA e o DNA das células, corando apenas os organismos presentes na amostra. O FISH é utilizado para corar grupos específicos de bactérias, utilizando probes fluorescentes, que se ligam com os ribossomos citoplasmáticos das bactérias. Cada grupo de bactérias possui um tipo de probe específico para ser usado. Esse último método é de custo bastante elevado e trabalhoso, sendo praticado apenas em pesquisas bem específicas. O método a ser utilizado vai depender, então, do tipo da amostra e do objetivo da análise (tipos de organismos). O método utilizado no laboratório para a realização da contagem dos microorganismos durante o período do estágio foi aquele com o uso do AO (0,1% w/v), de acordo com o método descrito por Hobbie *et al.* (1977), com algumas adaptações (Tompson *et al.*, 1999), sendo este o procedimento detalhado a seguir.

Preparação de lâminas com Laranja de Acridina (AO):

- 1) Colocar o filtro escurecido em cima do aparato de filtração, com o lado brilhante para cima
- 2) Colocar a torre de filtração e acrescentar a amostra com o volume desejado. Se necessário acrescentar algumas gotas de água destilada filtrada, para homogeneizar a distribuição da amostra na superfície do filtro.
- 3) Filtrar com a bomba de vácuo a no máximo 5 atm de pressão
- 4) Fechar o registro do bucal e acrescentar 1 ml de acridina laranja, deixar atuar por 10 a 15 minutos e filtrar
- 5) Com a bomba ainda ligada lavar o filtro com água destilada filtrada

- 6) Após a filtração completa, retirar o filtro e secá-lo ao ar, com auxílio de uma pinça
- 7) Colocar uma gota de óleo mineral (Nujol) sobre a lâmina
- 8) Colocar o filtro (totalmente seco) sobre a gota e acrescentar uma gota de óleo mineral sobre o filtro
- 9) Colocar a lamínula e fixar os cantos com esmalte

Se a amostra foi fixada com lugol, acrescentar à amostra dentro da torre de filtração duas gotas de tiosulfato de sódio e deixar descolorir, só então filtrar e continuar do passo 3.

Os filtros são de membrana de policarbonato, (Nuclepore-0,2um de poro), previamente escurecidos com irgalan black. Estes devem ser escuros para não emitir fluorescência durante a observação no microscópio. Existem, no mercado, filtros já escuros, mas são muito caros, por isso vale a pena corá-los em laboratório. Basta deixar os filtros de molho no corante (irgalan black) por 24h e depois lavá-los com água destilada e secar em estufa a 60°C por 15 minutos. Após a filtração, o filtro deve ser secado bem, antes de fixá-lo na lâmina senão a fluorescência é alterada prejudicando a observação da amostra. Finalizado este processo, pode-se guardar a lâmina em freezer convencional (-20°C) até o momento da análise. A amostra conserva-se por vários meses.

O microscópio de epifluorescência, Zeiss Axioplan, possui uma luz ultravioleta que é emitida pela própria objetiva, reflete na lamina e volta para a objetiva para visualização. Este possui também um kit de filtros que emitem diferentes comprimentos de onda da fluorescência. O filtro adequado para a visualização da amostra vai depender do corante utilizado na fixação da amostra e do tipo de organismos que se queira observar. Dentre os filtros estão os que emitem a luz azul: para organismos corados com AO e DAPI, a luz verde: para distinção de seres autotróficos e heterotróficos, pois esta realça os pigmentos fotossintéticos, e têm um filtro para observação do FISH.

Contagem

Para a contagem desses microorganismos menores ou iguais a 3 μm , é necessário utilizar um aumento de 100x e recomenda-se contar seguindo a metodologia dos campos semi-aleatórios. O número de campos também vai de acordo com a homogeneidade da amostra e número de organismos contados, podendo variar de 20 a 50 campos distribuídos uniformemente na área da lâmina. Dentro desses campos pode-se contar apenas a área que abrange a quadrícula visualizada pela ocular esquerda. A quadrícula possui 50 x 50 μm de área e subdividi-se em quadrados menores, para facilitar a contagem. Ao final da contagem, obtém-se o número médio dos campos e multiplica-o pelo fator de conversão correspondente à área de visualização da objetiva (com ou sem quadrícula) e a área do filtro com amostra (descontando as margens da torre de filtração). Depois divide pelo volume de amostra filtrada com o respectivo fator de diluição usado no fixador (formalina ou lugol). O resultado é dado em número de organismo/ml.

A contagem também pode ser feita por captura de imagens, quando há uma câmara fotográfica digital acoplada ao microscópio. Neste caso tiram-se as fotos nos campos semi-aleatório, como descrito anteriormente, e registra-as no computador. Utilizam-se programas de software para fazer o tratamento das imagens (com aplicação de filtros) facilitando a visualização dos organismos. Esses programas podem fazer a contagem automática de número, largura e comprimento dos organismos, de acordo com as determinações configuradas pelo usuário (como a escala). Através dessas medidas pode-se também determinar o biovolume desses organismos presente na amostra.



Figura 7: Microscópio Zeiss Axioplan de epifluorescência.

3.2 Atividades Específicas

As atividades específicas consistiram em aplicar algumas das técnicas aprendidas e descritas no item 3.1 para a determinação da abundância de microorganismos no biofilme de substratos artificiais utilizados num experimento com cultivo do camarão *Farfantepenaeus paulensis* em cercados. O objetivo do trabalho é avaliar o efeito do consumo do biofilme no crescimento do camarão e relacionar com os microorganismos presentes no biofilme que estariam contribuindo efetivamente no ganho de biomassa do camarão, além de identificar se existe predação seletiva do camarão sobre determinados grupos desses organismos que podem servir de atrativo para o camarão no biofilme. Esse trabalho é uma continuidade de um experimento realizado numa dissertação de mestrado que avaliava o efeito do uso de substratos artificiais no crescimento e sobrevivência do camarão em cultivo de cercados com diferentes densidades (Pissette, 2004). A minha função no desenvolvimento do trabalho foi quantificar os microorganismos de valor protéico elevado, colhidos nas amostras de biofilme do experimento. Os resultados do trabalho serão fruto da integração dos dados adquirido no experimento (taxas de crescimento, consumo do biofilme) com os dados elaborados na determinação dos microorganismos do biofilme, estando, portanto, ainda em processo de avaliação.

3.2.1 Determinação da abundância de microorganismos em biofilme de substratos artificiais utilizados de cercados de camarão

3.2.1.1 Introdução

A determinação da abundância dos microorganismos do biofilme de substratos artificiais utilizados em cultivos de cercados de camarão, foi realizada a partir de amostras colhidas de um experimento de Mestrado realizado no estuário da Lagoa dos Patos, Rio Grande, RS, entre os meses de janeiro e abril de 2004, pelo então mestrando Tito Luís Pissetti.

Seu experimento visou avaliar os efeitos da densidade de estocagem e do substrato artificial no cultivo do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* em cercados, testando 4 densidades diferentes: 10cam/m², 20cam/m², 40cam/m² e

60cam/m² (com 3 repetições). Para isso foram utilizados 12 cercados com 50 m² de área de fundo, feitos com rede de poliéster revestida de PVC (malha de 5,0 mm e altura de 2,1 m) e sustentados por bambus. Em cada unidade experimental foram utilizados 25 m² de substrato vertical (tela de polietileno com malha de 1,0 mm e cor verde) para a formação do biofilme. Os cercados foram povoados com juvenis de peso médio (\pm DP) de $0,80 \pm 0,28$ g e despesado ao final de 86 dias de cultivo. A alimentação oferecida era de uma ração comercial, em bandejas, duas vezes ao dia.

As telas de substrato, para a formação do biofilme, foram colocados na água 25 dias antes da estocagem dos camarões, propiciando assim uma pré-fixação do biofilme (Pissette, 2004 *apud*. Santos, 2003). As amostragens do biofilme foram feitas de 14 em 14 dias, iniciando a partir do dia do povoamento das pós-larvas e terminado no dia da despesca. Para estas, foram coletados recortes da tela de 2 x 2 cm, a uma altura de 35 cm do fundo, como indicado por Santos (2003). Para cada tratamento, foram fixados 3 recortes, com formalina (4%v/v) diluído em água filtrada da própria amostra. Mas para a contagem dos microorganismos foram utilizadas apenas duas amostras (com os recortes) por tratamento.

3.2.1.2 Metodologia

Tratamento das amostras

Para a realização das contagens, as amostra tiveram, primeiramente, que ser passadas por um homogenizador ultrasônico (4710 Series, Cole Parmer), para desprender o biofilme das telas e suspendê-lo na solução. O homogenizador foi aplicado a uma frequência de 20 kHz de 15 em 15 segundos até todo o material desprender da tela. Este procedimento é eficiente e não rompe com as células dos microorganismos (Tompson, 2002).

Contagem

A contagem das bactérias (cocoides e bastonetes) e dos flagelados foi realizada no microscópio de epifluorescência utilizando o filtro de luz azul (BP 450-490; FT 510; LT 520). Para isto, foram preparadas lâminas com 0,1 ml, de cada amostra e fixadas em filtros de membrana de policarbonato (Nucleopore-0,2um de poro)

escuras, com acridina laranja (0,1%w/v), segundo a metodologia descrita anteriormente.

Foram contados 30 campos por lâmina, escolhidos semi-aleatoriamente, buscando a melhor distribuição possível dos campos sobre superfície do filtrado. Ao final calculou-se a média (\pm DP) dos campos por amostra e depois a média (\pm DP) entre as réplicas dos tratamentos. Nesse valor, aplicou-se o fator de conversão para número de organismo por ml, e depois ainda dividiu-o pela área da tela (frente e verso) para expressar o resultado em número de organismos por área de biofilme.

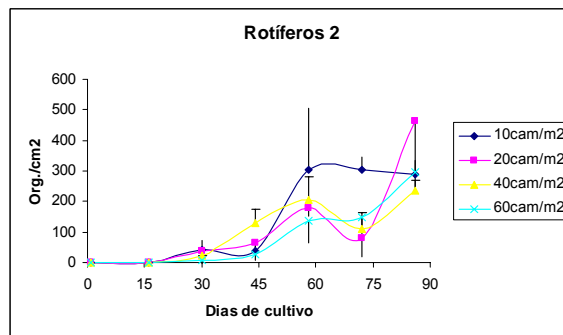
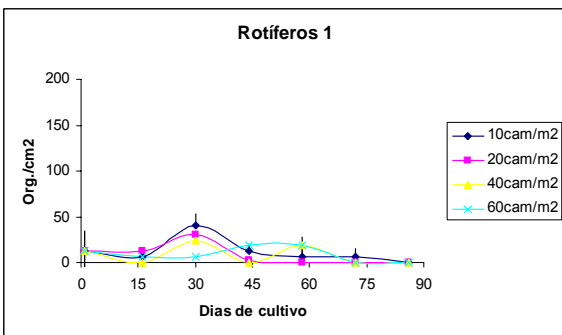
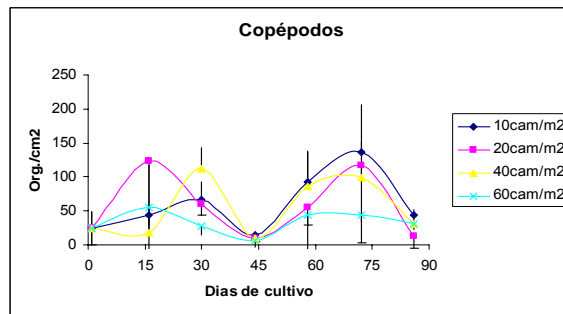
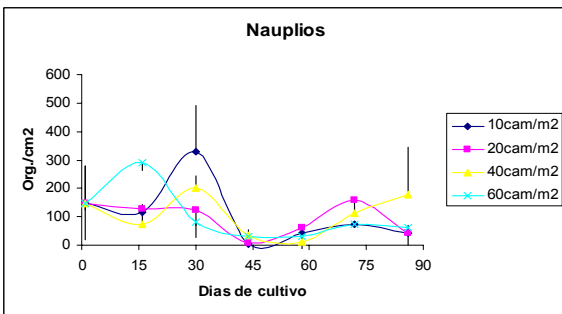
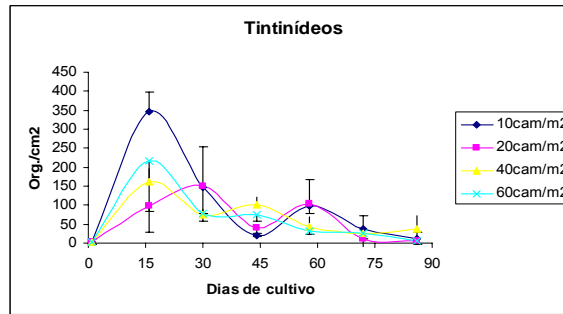
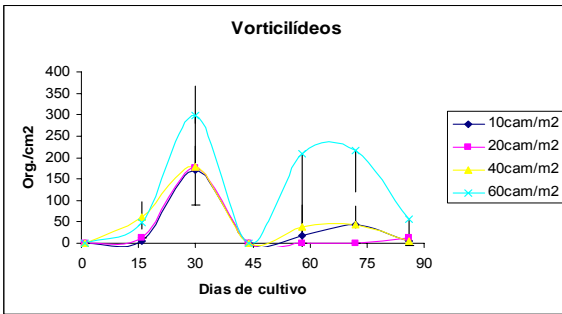
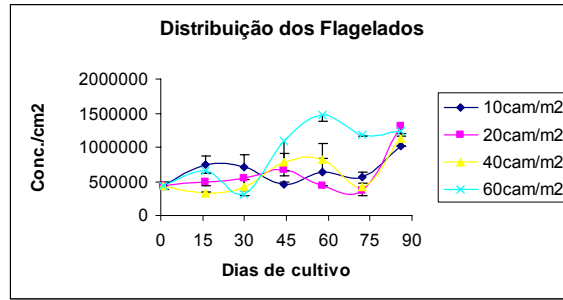
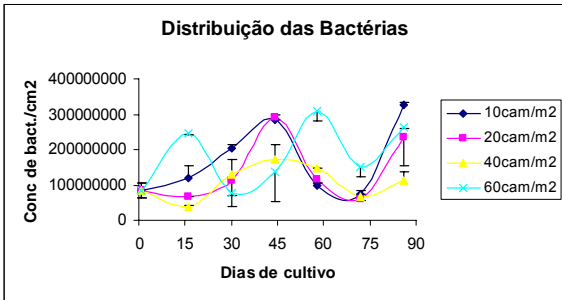
Já os microorganismos maiores que 3 μ m foram contados no microscópio de luz invertida (Uttermohl, 1958), utilizando as câmaras de sedimentação de 2 ml. Foram avaliados apenas os microorganismos com alto valor protéico e que foram encontrados em maior abundância (ciliados, nematóides, rotíferos, etc.). As câmaras foram preparadas com 0,5 ml da amostra e diluídas em água marinha filtrada (para completar o volume da câmara), pois a amostra já vinha com bastante material. Nos casos em que a amostra apresentava maior quantidade de material, dificultando a visualização dos microorganismos, foram, também, preparadas câmaras com diluição de 0,3 ml de amostra. Após o preparo das câmaras, esperaram-se apenas alguns minutos para a sedimentação, pois como a amostra tinha muito material particulado que tende a se agrupar pelo fenômeno de absorção das partículas, isso afetaria a homogeneidade da amostra. A contagem foi realizada por faixas com 4 faixas cruzadas por amostra, duas da extremidade superior à inferior e duas percorrendo as laterais da lâmina. Ao final, as faixas contadas foram somadas e multiplicadas pelo fator de conversão do microscópio. Calculou-se a média (\pm DP) entre réplicas e dividiu-a pela área do recorte para a expressão dos resultados em número de organismos por área de biofilme.

A distribuição da abundância dos microorganismos ao longo do experimento foi interpretada em forma de gráficos gerados no Excel, para pré-análises dos resultados do trabalho. Os microorganismos foram também registrados por meio de fotografias em ambos os microscópios, para posterior análises de medidas de tamanho, comprimento, biovolume e trabalhos de identificação detalhada.

3.2.1.3 Resultados Preliminares

Como dito anteriormente, durante as contagens, os microorganismos que estivessem sendo encontrados em maior frequência e tivessem um valor protéico elevado (de origem animal), teriam que ser incluídos nas avaliações. Dessa forma, ao final, foram determinados 11 grupos de microorganismos dentre eles: as bactérias cocoides e bastonetes (contadas juntas); os flagelados (sendo principalmente nanoflagelados); os ciliados: vorticilídeos e tintinídeos; copépodos e náuplio de copépodos, da ordem Harpacticoida; rotíferos, sendo estes encontrados em dois tipos, divididos em rotífero (1) e rotífero (2); organismos não identificados denominados de NID (1) e NID (2); e por fim, os nematóides (Figura 8).

Em geral, as curvas de distribuição da abundância dos microorganismos ao longo do experimento, apresentaram padrões oscilatórios semelhantes nas diferentes densidades, com apenas algumas exceções. As bactérias apresentaram um crescimento populacional, do dia 15 a 45, com posterior diminuição até o dia 72, à exceção do tratamento de 60 cam/m² que começa a cair só no dia 58. Mas logo recuperam-se, crescendo novamente até o último dia do experimento (Figura 8). Os flagelados apresentaram o ápice da sua curva, no último dia do experimento, com exceção do tratamento de 60 cam/m², que já teve o pico máximo já no dia 58 (Figura 8). Os vorticilídios, tintinídios, náuplios de copépodos, copépodos, rotíferos (1) e NIDs (1) apresentaram curvas de diminuição do dia 30 a 44, tornando novamente a crescer até os dias 58 e 72, e tendo uma posterior queda no dia 86. Com exceção do NID (1) que cai já no dia 72 e volta a crescer no dia 86 (Figura 8). O rotífero (2) apresentou uma curva de crescimento mais ou menos linear, aumentando até o dia 60 e caindo no dia 75, mas logo recuperou atingindo seu maior pico no dia 86 (Figura 8). Na curva do NID (2), todos os tratamentos apresentaram uma queda do dia 45 ao 75, com um posterior aumento até o dia 86, à exceção do tratamento de 10 cam/m² que apresentou uma curva inversa (Figura 8). Os nematóides tiveram um aumento nítido em todos os tratamentos do dia 30 a 45 e uma seguinte queda no dia 60. Mas, voltou a crescer até o último dia, menos o tratamento de 10cam/m² que apresenta uma queda no dia 86 (Figura 8).



Continua...

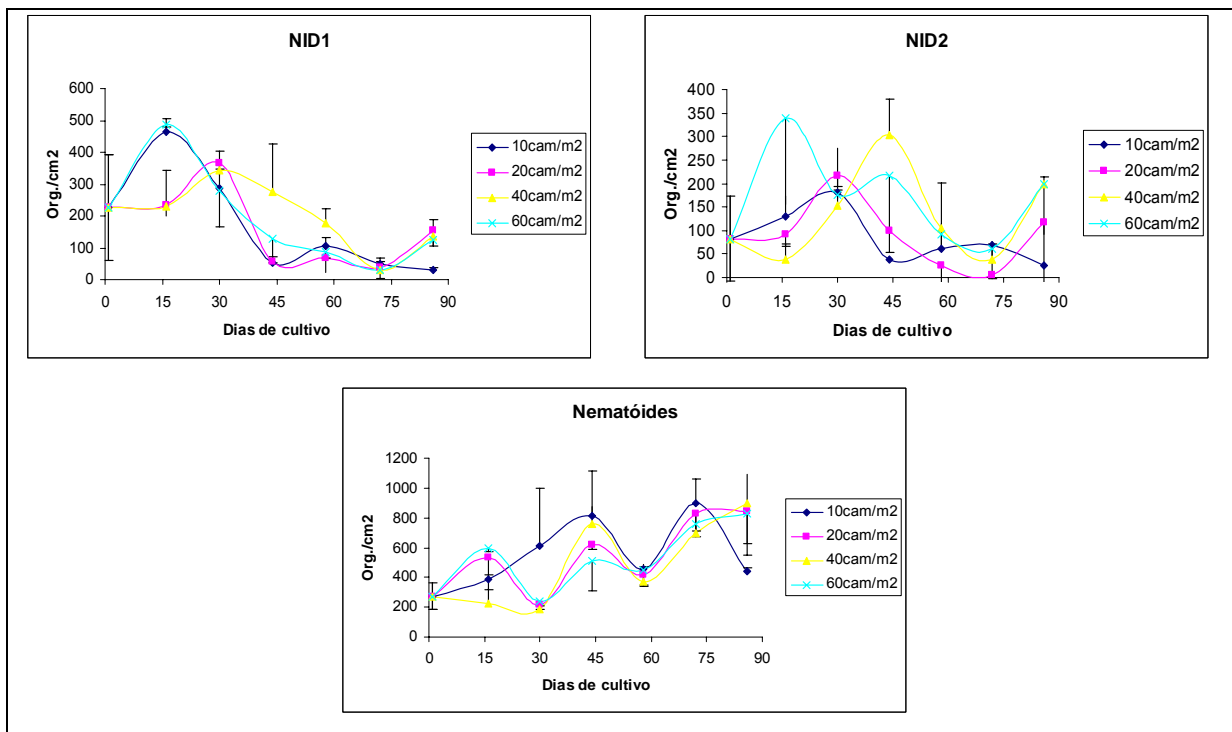


Figura 8 Distribuição da abundância dos microorganismos; a) bactérias; b) flagelados; c) vorticídeos; d) tintinídeos; e) náuplios de copepodo; f) copépodos; g) rotíferos (1); h) rotíferos (2); i) NID (1); j) NID (2); k) nematóides.

As Figuras 9 a 12 são fotografias das amostras de biofilme fixadas em lâmina com acridina laranja, tiradas no microscópio Axioplan de epifluorescência com aumento de 100x. As fotos estão em preto e branco, por isso não se pode observar a fluorescência, mas pode-se ter uma noção da diversidade e abundância dos microorganismos presentes na amostra. Os objetos de estudo são as bactérias cocoides e bastonetes (0,3 a 3 μ m), que são os mais abundantes na amostra e os flagelados ($\geq 3 \mu$ m) que são menos, mas podem ser observados em todas as fotos. Outros organismos que estão em destaque nas fotos são as cianobactérias filamentosas nas Figuras 9, 10 e 12; uma diatomácea pennada na Figura 10 (canto superior direito) e bactérias filamentosas na Figura 11.

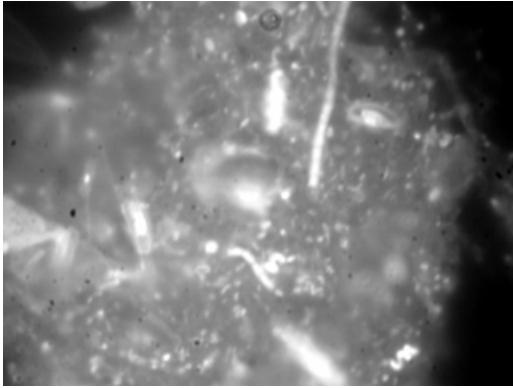


Figura 9: 16° dia de experimento – 60 cam/m².

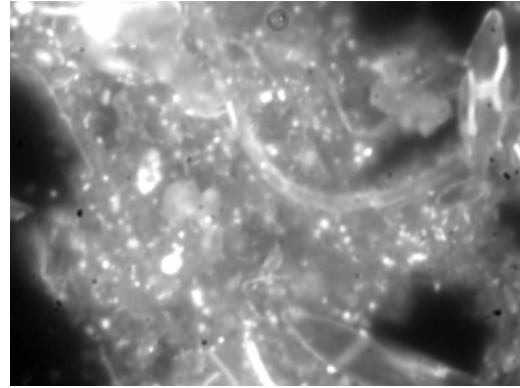


Figura 10: 16° dia de experimento – 60 cam/m².

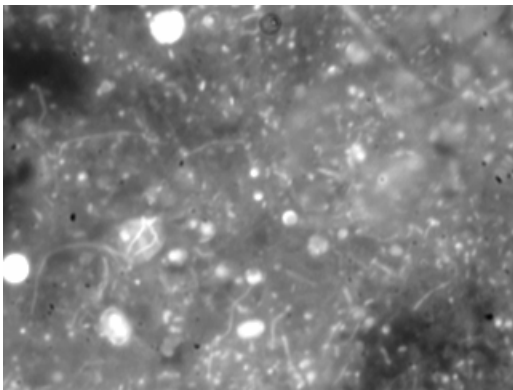


Figura 11: 16° dia de experimento – 60 cam/m².

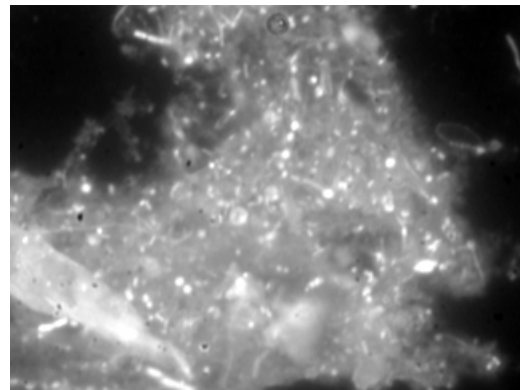


Figura 12: 58° dia de experimento – 60 cam/m².

As Figuras 13 a 22 são fotografias tiradas dos microorganismos visualizadas no microscópio e luz invertida, Axiovert. A Figura 13 é de um vorticídeo e a 14 de um tintinídeo. Ambos são ciliados muito encontrados no biofilme, mas são de dimensões bem diferentes como mostra a escala das fotos.



Figura 13: Vorticilídeo



Figura 14: Tintinídeo

O organismo da Figura 15 foi classificado como rotífero (1). Pode-se visualizar bem a lorica (carapaça) e o pé bifurcado. A Figura 16 é do rotífero (2), que foi assim classificado por possuir estruturas típicas de rotíferos, o mástax, sendo este provavelmente um rotífero bentônico pela sua forma alongada.



Figura 15: Rotífero (1).



Figura 16: Rotífero (2).

O náuplio de copépodo da Figura 17 está de ponta-cabeça, mas pode-se, ver bem as antenas na parte de baixo da foto. A Figura 18 mostra uma fêmea adulta do copépodo, com um saco de ovos. Esses copépodos são da ordem Harpaticoida

(copépodos bentônicos), mas ainda estão em processo de identificação e classificação específica.



Figura 17 : Náuplio de copépedo



Figura 18 : Fêmea ovada de copépedo Harpaticoida.

Os organismos abaixo (Figuras 19 e 20), são aqueles que ainda não haviam sido identificados. Foi levantada uma hipótese do primeiro ser uma larva de inseto (díptero), por apresentar uma cauda bem segmentada, mas para se ter certeza, seria necessário fazer a dessecação para avaliação detalhada da sua e morfologia e composição bioquímica.



Figura 19: NID (1).



Figura 20: NID (2).

As Figuras 21 e 22 mostram dois tipos de nematóides encontrados. O primeiro foi tirado de uma amostra do 16º dia do cultivo, na densidade de 60 cam/m², e o segundo do 44º dia, na densidade de 10 cam/m². Os nematóides apresentaram muitas diferenças entre as classes de tamanho ao longo do cultivo.

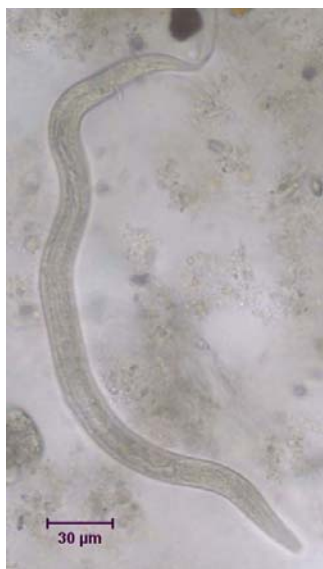


Figura 21: Nematóide A



Figura 22: Nematóide B.

As fotografias a abaixo (Figuras 23 e 24), são apenas ilustrativas, para demonstrar alguns grupos de microalgas muito encontradas no biofilme, que são as diatomáceas cêntricas e as pennadas. Mas estas não foram objeto de estudo nesse trabalho, pois possuem baixo valor protéico, ou seja, o seu valor nutricional é em termos de conversão de energia e não em ganho de biomassa, para os camarões.



Figura 23: Diatomácea cêntrica em colônia.

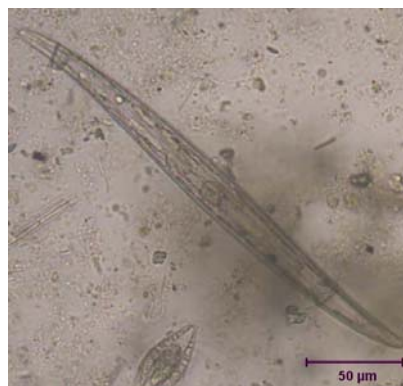


Figura 24: Diatomácea pennada grande

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados adquiridos ao longo das atividades realizadas neste estágio são complementares aos projetos que estão sendo desenvolvidos no Laboratório. Portanto, os resultados apresentados ainda não apresentam uma discussão e conclusão em função da necessidade de se realizar uma análise em conjunto com dados dos outros projetos. Alguns dos organismos contados ainda estão em processo de identificação como o caso do copépodo Harpaticoida e dos organismos não identificados (NID1 e NID2). Foi observado que a contagem dos nematóides deverá ser refeita em função da necessidade de classificá-los por tamanho a fim de avaliar a predação do camarão sobre essas diferentes classes de tamanho. Averiguando se os nematóides maiores servem de atrativo alimentar para os camarões no biofilme.

O trabalho foi muito válido em termos de demonstração da diversidade microbiana nesses sistemas, e a avaliação do crescimento populacional desses organismos, ao longo do ciclo de cultivo. Ele forneceu uma base de dados para as posteriores análises sobre as relações tróficas existentes entre os próprios microorganismos do biofilme e com os camarões cultivados. Por fim, podendo determinar os microorganismos que efetivamente contribuem para o crescimento do camarão e que podem servir de atrativo no biofilme. Os resultados finais desse trabalho podem servir para indicar a importância do biofilme na alimentação do camarão e abrir nossas frentes de pesquisas sobre o uso direto de alguns desses microorganismos (através do seu cultivo) como fonte alternativa de alimento vivo ao camarão cultivado.

Todas as outras atividades realizadas durante o estágio, inseridas no item de atividades gerais, serviram de base para a compreensão da dinâmica desses microorganismos no ambiente e para a percepção da gama de aplicações das técnicas utilizadas pelo Laboratório no que range o estudo dos microorganismos marinhos. As técnicas utilizadas pelo laboratório são trabalhosas mas permitem análises detalhadas do meio estudado com resultados altamente confiáveis.

A experiência do estágio no Laboratório de Ecologia do Fitoplâncton e de Microorganismos Marinhos proporcionou aliar a pesquisa científica com aplicações

tecnológicas para a aqüicultura, nas áreas de qualidade ambiental, cultivo de microalgas e uso de microorganismos para promoção de sistemas de aqüicultura.

5. BIBLIOGRAFIA

- Abreu, P.C., Thompson, F.L., Wasielesky, W., Cavalli, R.O., 1998. New perspectives in the use of microorganisms in shrimp culture: food source, water quality and diseases control. Anais do Aqüicultura Brasil'98, 2 - 6 de novembro de 1998. Recife, Pernambuco. 703 - 709.
- Aminot, A., Chaussepied, M., 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. Brest: CNEXO. 395p.
- Baumgarten, M.G.Z., Rocha, J.M.B, Niencheski, L.F.H., 1996. Manual de Análises em Oceanografia Química. Editora da furg. Rio Grande, RS.
- Borges L., 2005. Caracterizacao do potencial de microalgas estuarinas e costeiras como mecanismo de desenvolvimento limpo (mdl) para absorção do dióxido de carbono atmosférico. Tese de Mestrado, Univ Rio Grande, Brasil
- Caron, D.A., 1994. Inorganic nutrients, bacteria and the microbial loop. Microb. Ecol. 28: 295-298.
- Edler, L., 1979. Recommendations on methods for marine biological studies in the Baltic Sea. Phytoplankton and chlorophyll. The Baltic Marine Biologists Publ. nr.5, 38p.
- Guillard, R.R.L., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrate animals. Pp. 29-60 em Smith, W.L., Chanley, M.H. editors. Culture of Marine Invertabrate Animals. Plenum Press.
- Horner R. A., 2002. A taxonomic Guide to Some Common Marine Phytoplankton. Biopress Ltd, England
- Ivanoff, 1972. Introduction à l'Océanographie: propriétés physiques et chimiques des eaux de mer. Paris: Librairie Vuibert. 209p.
- Maeda M., 2002. Microbial Communities and their use in aquaculture. Pp. 61 – 78 em: Lee, C.S., O'Bryen, P. editors. Microbial Approaches to Aquatic Nutrition Within Environmentally Sound Aquaculture Production Systems. The world Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, United States.

- Moss, K.R.K., Moss, S.M., 2004. Effects of artificial substrate and stocking density on the nursery production of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of the World Aquaculture Society 35, 536 - 542.
- Nixon, S.W., 1995. Coastal marine eutrofication: a definition, social causes, and future concerns. Ophelia 41: 199-219.
- Pissette T. L., 2004. Efeitos da densidade de estocagem e do substrato artificial no cultivo do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez – Farfante, 1967) em cercados. Tese de Mestrado, Univ Rio Grande, Brasil. 44pp.
- Poli, A.T.B., Gálvez, A.O., Oliveira, J.M., 2004. Produtividade aquática em aqüicultura. Pp 73 – 92 em: Poli, C.R., Poli, A.T.B., Andreatta, E., Beltrame, E. organizadores. Aqüicultura, Experiências Brasileiras. Multitarefa Editora Ltda. Florianópolis, SC.
- Poli, C.R., Vinatéia, L., 2004. Qualidade de água em aqüicultura. Pp 45 – 72 em Poli, C.R., Poli, A.T.B., Andreatta, E., Beltrame, E. organizadores. Aqüicultura, Experiências Brasileiras. Multitarefa Editora Ltda. Florianópolis, SC.
- Russo R. C., 1985. Ammonia, Nitrite and Nitrate. Pp. 455-471 em: Fundamentals of aquatic ecotoxicology Methods and applications. Ed. by Raud; Gary M., Petrocalli, Sam R.
- Santos, M.H.S., 2003. Alimentação do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante, 1967) (Decapoda-Penaeidae) cultivado. Tese de Doutorado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Rio Grande do Sul. 229pp.
- Silva, F.C., Pereira, A., Canozzi, M.B., Araújo, S.C., 2004. Cultivo de Microalgas Marinhas. Pp 93 – 120 em: Poli, C.R., Poli, A.T.B., Andreatta, E., Beltrame, E. organizadores. Aqüicultura, Experiências Brasileiras. Multitarefa Editora Ltda. Florianópolis, SC.
- Steeman-Nielsen, E., 1952. The use of radioactive, car sea. J. Cons. Perm. Int. Expl. M bom (C-14) for measuring organic production in the er 18, 117-140.

Stein, J., 1984. Handbook of Phycological Methods; Culture Methods and Growth Measurements. Ed. Cambridge Univ. Press

Strickland, J.D.H., Parsons, T.R., 1972. A practical handbook of seawater analysis. Bull. Fish. Res. Bd. Can.

Thompson, F.L., Abreu, P.C., Wasielesky, W., 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. Aquaculture 203, 263 - 278.

Thompson, F.L. 1999. A importância dos microorganismos na aquacultura do camarão rosa, *Penaeus paulensis* (Perez-Farfante, 1967). Mestrado, FURG, Rio Grande, Brasil.

Utermohl, H., 1958. Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton Methodik. Mitt. Int. Ver. Limnol. 9

Sites visitados: <http://www.labfito.furg.br/index.html>; www.peld.furg

6. ANÁLISE CRÍTICA DO ESTÁGIO – CONCLUSÃO

O Laboratório de Ecologia do Fitoplâncton e de Microorganismos Marinhos ofereceu um excelente suporte para as atividades desenvolvidas, mostrando e detalhando as diversas etapas envolvidas. Todos os recursos necessários para a melhor aprendizagem e aplicação das técnicas foram integralmente disponibilizados. A oportunidade oferecida pelo supervisor, Dr. Paulo César Abreu, na participação do desenvolvimento desse trabalho científico foi de grande valor, não apenas na aprendizagem e experiência adquirida durante a realização das atividades, mas também na participação da publicação como um dos co-autores que será brevemente submetido a um evento científico da área. Tanto a supervisão quanto o apoio técnico de todos os integrantes do Laboratório foram excelentes e se deram sempre dentro de um ótimo ambiente de trabalho.

A descoberta da amplitude de estudos na área da ecologia de fitoplâncton e microorganismos marinhos e suas aplicações em aquicultura serviu de grande incentivo para seguir com estudos e projetos nessa linha que é muito promissora e está cada vez mais requisitada.

A interação entre os locais de realização dos estágios, com o curso da graduação em Aquicultura da UFSC, trazidas pelos alunos, é excelente para ampliar as visões do campo de atuação da aquicultura, oferecendo um panorama das atividades que estão sendo realizadas em diversos locais do Brasil e do mundo, por pesquisadores e empresários (produtores). Além de ser uma via de se firmar parcerias com as empresas e instituições envolvidas.

Sendo assim, além de oferecer ótimas oportunidades para o aluno desenvolver trabalhos profissionalizantes na área em que escolheu, preparando para a atuação no mercado de trabalho, o programa de estágios de conclusão de curso também trás benefícios para todo o curso da graduação e pós em Aquicultura.