



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Centro de Ciências Agrárias
Departamento de Aquicultura
Curso de Engenharia de Aquicultura

Cultivo *in vitro* da macroalga *Gracilaria domingensis* usando efluente do cultivo super-intensivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos

FLORIANÓPOLIS

2014

Eduardo Gomes Caleffi de Souza

Cultivo *in vitro* da macroalga *Gracilaria domingensis* usando efluente do cultivo super-intensivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao Curso de Graduação de Engenharia de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Título de Engenheiro de Aquicultura. Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leila Hayashi.

TCC elaborado de acordo com as normas da revista Aquaculture

FLORIANÓPOLIS

2014

Eduardo Gomes Caleffi de Souza

Cultivo *in vitro* da macroalga *Gracilaria domingensis* usando efluente do cultivo super-intensivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema de bioflocos

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado e adequado para obtenção do Título de Engenheiro de Aquicultura, e aprovado em sua forma final pelo curso de Engenharia de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 01 de Dezembro de 2014.

Prof. Luis Alejandro Vinatea Arana Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a, Dr.^a Leila Hayashi,
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr.^a Fernanda Ramlov,
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Luis Alejandro Vinatea Arana,
Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), cujo foi o fomentador da pesquisa.

À minha orientadora professora Dra. Leila Hayashi, peça chave de minha pesquisa, tanto na execução quanto na escrita do trabalho de conclusão de curso, fundamentando minhas idéias e complementando o trabalho com informações indispensáveis e é claro por toda sua paciência e leveza ao me orientar, mesmo com muitos outros projetos em andamento e alunos para orientar. Sempre manteve o profissionalismo e bom humor, tenho muito orgulho de ter sido orientado por este exemplo de pessoa e profissional.

Aos meus pais, Celso Augusto Caleffi de Souza e Mônica Rodrigues Gomes de Souza, que me proporcionaram esta oportunidade de estudar fora de minha cidade natal e na área em que sou simplesmente apaixonado, a Aquicultura, sempre me apoiando e incentivando nos momentos difíceis da vida, a eles minha eterna gratidão que jamais poderei pagar.

Aos colegas de laboratório Mathias Pchara, Anna Gabrielle, Ana Luiza, Clóvis Pires, Fábio Fialho, Mariane Pallaoro, Marina Calinowski, Vitor Pontinha, Filipe Neves, Silvano Grimm, Marco Zanetta e Ticiane Rover por estarem sempre dispostos a ajudar quando me foi necessário, mesmo que fosse para fazer o café (Fábio), rodar o programa estatístico (Filipe), corrigir o interminável Tcc (Mari, Tici e Leila) ou até mesmo nos manejos.

Aos meus amigos de faculdade Thiago Gil, Ana Carolina, Thais Lisboa, Ana Clara, Filipi Andrade, Darly Neto, Rodrigo Mansano, Robson Cardoso, Gislaine Figueiredo, Raniere Lima, Barbara Othero, Chico Pchara, Bernardo Ramos, Marco Shizuo e Tiago Martins, onde caminharam comigo durante todos estes anos realizando coisas memoráveis em minha vida e é claro a Amábil Boppré em especial.

À nossa inestimável Jussara Orige Bach Gonçalves, heroína de toda a graduação do curso, mostrando sempre a melhor saída para os problemas que em nossa visão não havia soluções, sem palavras pelo seu empenho e alegria trazida todos os dias de minha graduação. Ao Departamento e a Coordenação do curso de Engenharia de Aquicultura, que sempre passou muita confiança e dedicação quanto ao trabalho que vêm sendo realizado dentro da universidade.

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	6
2. INTRODUÇÃO.....	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 Biomassa da macroalga.....	9
3.2 Efluentes do Biofoco.....	9
3.3 Determinações da Concentração de Efluentes	10
3.4 Determinação do período de fertilização.....	10
4. ANÁLISES	11
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	11
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16

1. RESUMO

O gênero *Gracilaria* possui um alto valor comercial devido ao seu subproduto, o ágar, importante ficocolóide utilizado como agente espessante e estabilizante em diversos ramos da indústria. Em ambientes de cultivo controlados, seu cultivo é feito com o uso de soluções nutritivas, o que tem um alto custo produtivo tornando seu cultivo em larga escala inviável. O descarte do efluente da carcinicultura no sistema em meio heterotrófico ou bioflocos (Biofloc Technology System - BFT) tem causado prejuízos ao meio ambiente e de certa forma vem sendo desperdiçado quando é considerado a qualidade de nutrientes provenientes de seus dejetos. O presente trabalho testou o uso do efluente do cultivo em bioflocos como possível fertilizante para *Gracilaria domingensis* em diferentes concentrações (25, 50 e 100%). Essas concentrações foram comparadas com água do mar enriquecida com solução von Stosch a 25%, comumente utilizado no cultivo em laboratório da espécie, e um controle contendo somente água do mar esterilizada. Apesar de não haver diferenças significativas entre as diferentes concentrações, a que obteve a maior taxa de crescimento foi a 25%. Posteriormente, foi determinado o melhor período de fertilização, utilizando como padrão 25% de efluente de BFT. Nesta etapa foram analisados um, três e sete dias de fertilização. O melhor período de fertilização usando BFT 25% foi de três dias. Sendo assim, indicamos para a fertilização da *Gracilaria domingensis* uma concentração de BFT de 25% durante três dias para um maior acréscimo de biomassa.

Palavras-chave: *Gracilaria domingensis*, *Litopenaeus vannamei*, Bioflocos, macroalga, fertilização.

2. INTRODUÇÃO

O cultivo de macroalgas no cenário da produção mundial em aquicultura está posicionado em segundo lugar, demonstrando interesse em novos investimentos por parte de grandes empresas. Segundo os dados estatísticos da FAO, a produção de macroalgas cresceu aproximadamente 25 vezes mais entre os anos de 1970 até 2012, o que rendeu aproximadamente US\$ 6.4 bilhões neste último ano (FAO, 2014). A maior parte destas algas é destinada para as indústrias alimentícias e de hidrocolóides. A grande importância destas algas nestes setores tem aumentado a demanda da produção de ficocolóides (colóides extraídos de macroalgas marinhas), como o ágar e a carragenana, por serem uma das principais fontes de matéria prima em diversos tipos de alimentos, remédios, cosméticos entre outros produtos industrializados (Bixler e Porse, 2011).

A *Gracilaria* pertence ao grupo das algas vermelhas, é um dos gêneros mais utilizados para a produção de ágar, muito comercializada na Ásia e no Pacífico. A substância obtida a partir destes organismos é muito famosa na cozinha oriental e em meios de culturas bacterianas (Glenn et al., 1996). Com o crescimento das indústrias, os cultivos expandiram para suportar tal demanda de biomassa, chegando a um valor de 2.023.190 toneladas de *Gracilaria* no ano de 2012 e totalizando um valor de 656.385.000 dólares (FAO, 2012).

Quase todo estoque de *Gracilaria* usada nas indústrias brasileiras é proveniente da exploração de bancos naturais, o que requer medidas drásticas em curto prazo para o desenvolvimento do seu cultivo por ser matéria prima finita (Glenn et al, 1996). Pelo mercado de algas estar aumentando exponencialmente, várias tentativas de cultivo massivo deste gênero no Brasil tem sido realizadas, porém sem muito sucesso quando em escala comercial, principalmente pela falta de informação e dados técnicos de manejo (Oliveira e Miranda, 1998, Costa e Plastino, 2011).

O gênero vem sendo estudado e tem apresentado bons resultados quando se trata da absorção de nutrientes de efluentes da carcinicultura, o que poderia ser uma substituição do uso de soluções nutritivas para seu cultivo, viabilizando o negócio em larga escala (Marinho-Soriano et al, 2009). Há algum tempo, novas idéias e pesquisas na área da carcinicultura vieram à tona devido ao decréscimo da produção, uma delas

foi produzir camarões em sistemas fechado, ou seja, minimizando os gastos excessivos com água, este sistema ficou conhecido por sistema bioflocos. (Sampaio et al., 2010).

O biofoco gerado neste tipo de cultivo consiste na interação de flocos microbianos com bactérias heterotróficas, além de outros microorganismos (Schryver et al., 2008), que além de manter bons parâmetros físico químicos da água, servem de alimento aos camarões por possuírem alto valor nutricional (Castille e Lawrence 1989, Martínez-Córdova *et al.* 1999, 2002, Córtes-Jacinto *et al* 2003).

Atualmente, os cultivos de camarões têm sido adaptados para este sistema, que tem apresentado bons resultados onde consiste em um cultivo sem renovação de água, visando aumentar a produtividade por metro quadrado e diminuir o impacto ambiental, uma vez que o efluente que seria gerado na renovação de água não volta ao corpo receptor imediatamente. Neste tipo de sistema, a formação de flocos microbianos, com bactérias, ciliados, flagelados, pequenos metazoários e microalgas é otimizado, podendo conter detritos orgânicos (Wasiolesky Junior et al., 2006) e sendo assim um possível fertilizante para macroalgas.

Em laboratório, uma das soluções nutritivas comumente utilizadas para o crescimento de macroalgas, é conhecida como solução von Stosch (VS), que possui substâncias essenciais para o bom desenvolvimento das algas além de reduzir as populações bacterianas, tornando o meio mais propício para o cultivo (Andersen, 2005). Entretanto, seu custo é elevado, inviabilizando sua utilização em cultivos em larga escala.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o crescimento *in vitro* da macroalga *Gracilaria domingensis*, quando submetida a diferentes concentrações e períodos de fertilização do efluente do biofoco do camarão *Litopenaeus vannamei* em sistema super intensivo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Esse trabalho foi realizado na Seção de Macroalgas do Laboratório de Camarões Marinhos (LCM) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), testando diferentes concentrações e períodos de fertilização da *Gracilaria domingensis* por meio do uso de efluente de bioflocos do cultivo de camarões marinhos *Litopenaeus vannamei*.

3.1 Biomassa da macroalga

As algas foram coletadas na Praia do Forte (27°25'59.35"S e 48°31.10'98"O) localizada na Baía Norte de Florianópolis, Ilha de Santa Catarina. Em laboratório, as algas foram lavadas em água destilada e limpas com papel toalha eliminando possíveis epífitas e outros organismos incrustantes. Na sequência, as algas passaram por um processo de aclimação, onde foram cultivadas em água do mar esterilizada (salinidade 35‰), em fotoperíodo de 12h, irradiância de 200 (± 10) $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, temperatura de 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) e aeração constante. Os talos foram cultivados na densidade média de 5g L⁻¹, durante 5 semanas.

3.2 Efluentes do Bioflocos

Para avaliar a influência de diferentes concentrações de efluentes no crescimento da macroalga, foi utilizado efluente oriundo do cultivo super-intensivo de *Litopenaeus vannamei* em sistema bioflocos (BFT) coletado no Laboratório de Camarões Marinhos (LCM/UFSC).

O tanque escolhido para a coleta do BFT era de 45m³ e abrigava reprodutores de 28g \pm 3g (média \pm desvio padrão) com aproximadamente 3000 indivíduos alimentados com 1,6 kg ração dia⁻¹ com 35% de proteína bruta. A salinidade era de 35,8 ‰, pH 7,61, alcalinidade 110 mg L⁻¹, amônia 0,07 mg L⁻¹, nitrito 0,24 mg L⁻¹, nitrato 1,91 mg L⁻¹, Sólidos Suspensos Totais (SST) 425 mg L⁻¹.

Após a coleta, houve a remoção de sólidos por meio de decantação por 30 min, filtragem tipo bag de 20 micrômetros e posteriormente o congelamento para prevenção do lote e correção da salinidade para 35‰.

3.3 Determinações da Concentração de Efluentes

Três concentrações foram avaliadas: 25% (BFT25%) e 50% (BFT50%) de efluentes diluídos em água do mar esterilizada e 100% de efluente (BFT 100%). Um tratamento adicional foi utilizado somente com água do mar esterilizada e enriquecida com solução de nutrientes von Stosch a 25% (VS) (Ferreira et al, 2006). Como controle (C) foi utilizado apenas água do mar esterilizada.

Cada tratamento e controle possuíam três repetições. As algas foram fertilizadas no intervalo de uma semana em erlenmeyers de 500 mL nos seus respectivos tratamentos e analisadas visualmente para observar possíveis alterações quanto à coloração e morfologia.

Após esse período, as algas foram mantidas nos Erlenmeyers contendo somente água do mar esterilizada, com trocas de água e pesagem três vezes na semana, durante quatro semanas, para avaliar a taxa de crescimento.

3.4 Determinação do período de fertilização

Uma vez determinada a concentração mais adequada, foram testados diferentes períodos de fertilização de 1, 3 e 7 dias. Para esta etapa do estudo, foram escolhidos e cortados 21 talos de *G. domingensis* com 1,14 g cada. Os diferentes períodos de fertilização foram conduzidos em erlenmeyers de 500 mL, contendo dois dados comparativos, um com BFT25%, e outro somente em água marinha esterilizada enriquecida com solução nutritiva von Stosch 25% (VS25%). No controle, as algas foram cultivadas sem adição de nutrientes. Todos os parâmetros físicos e químicos da água foram os mesmos da primeira etapa.

Em cada tratamento foram utilizados três repetições (n=3). O experimento teve duração de 4 semanas após o período de fertilização, com renovação da água e pesagem das algas três vezes na semana.

4. ANÁLISES

Os dados foram obtidos pela taxa de crescimento diária, conforme a fórmula:

$$TCR (\% \text{ diário}) = \left[\left(\frac{B_f}{B_i} \right)^{1/t} - 1 \right] \times 100, \text{ onde } B_f = \text{biomassa final, } B_i = \text{biomassa}$$

inicial, e t = tempo (Lignell e Pendersén, 1989).

A análise estatística foi feita por meio ANOVA unifatorial para determinação da concentração e determinação do período (dias) seguida de teste Fisher e Newman Keuls, respectivamente, com auxílio do programa Statistica 7.0 (considerando $p < 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na escolha da melhor concentração do efluente do biofoco (BFT) de camarões marinhos para fertilizar a *Gracilaria domingensis*, não foram observadas diferenças significativas entre as taxas de crescimento do controle e os demais tratamentos, sendo que as maiores taxas foram observadas no tratamento VS ($2,10 \pm 0,36\% \text{ dia}^{-1}$ - média \pm intervalo de confiança), seguida de BFT25% ($1,91 \pm 0,27\% \text{ dia}^{-1}$).

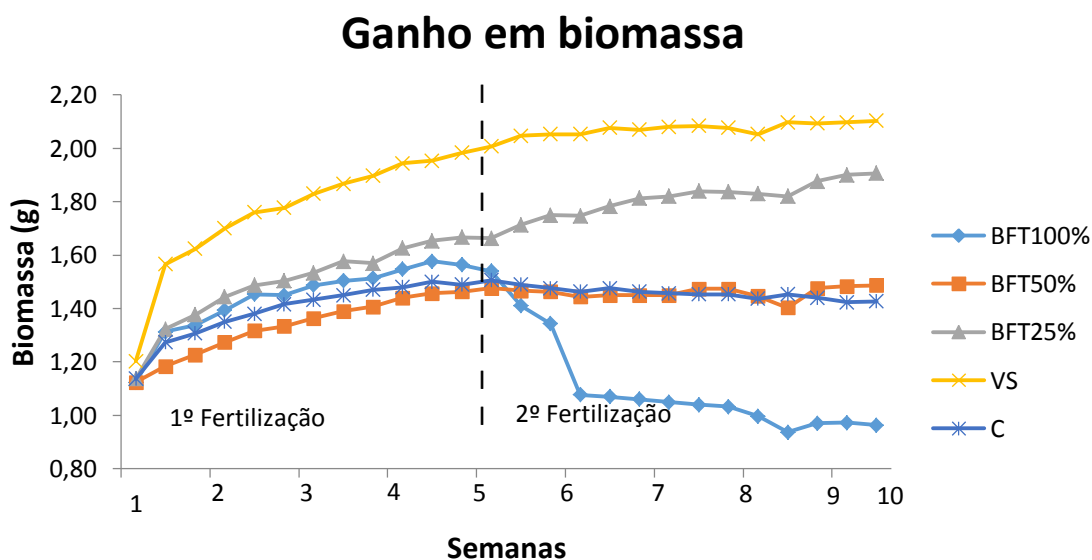


Fig. 01. Ganho de biomassa da *G. domingensis* após duas fertilizações em diferentes concentrações de Biofoco: 100% (BFT100%, 50% (BFT50%) e 25% (BFT25%), solução von Stosch 25% (VS) e Controle (C).

No tratamento BFT100%, foi observada uma queda brusca de biomassa após a segunda fertilização devido a contaminação da alga no tratamento controle (C) que não suportou o estresse e morreu (Fig. 01). Também após a segunda fertilização, algas do controle perderam tanto em biomassa quanto em coloração, tornando-se mais amarelada (Fig. 01 e 02). No tratamento BFT50%, o ganho de biomassa foi similar ao controle, porém a alga apresentou aspecto saudável, com boa coloração, e formação de novas ramificações. Algas do tratamento VS, como esperado, apresentaram ganhos de biomassa e coloração avermelhada ao final do experimento. Como não houve diferença significativa entre os tratamentos, o BFT25% foi escolhido como a melhor concentração, por apresentar melhores resultados quanto ao ganho de biomassa e qualidade dos talos tanto no aparecimento de ramificações novas e à coloração, além de não apresentar indícios de contaminações por excesso de nutrientes (Fig. 01 e Fig. 02).

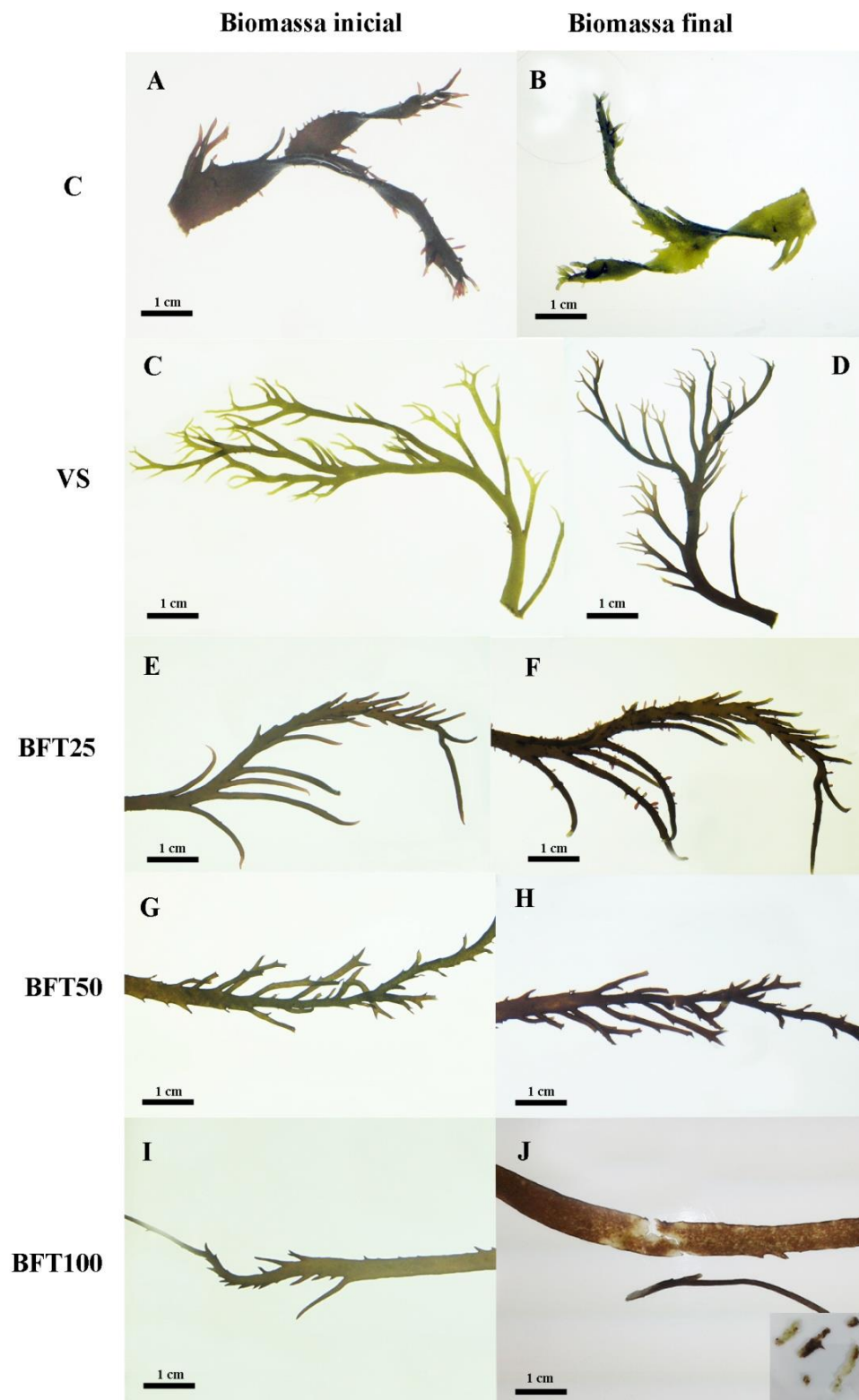


Fig. 02. Talos de *G. domingensis* no primeiro e no último dia de experimento em seus tratamentos: Controle (C), von Stosch (VS), biofloc (BFT 25, 50 e 100 %).

Na escolha do melhor período de fertilização, as taxas de crescimento de algas tratadas com efluente do BFT apresentaram diferenças significativas com as algas fertilizadas em VS no período de três dias. Na fertilização em um dia, não foram observadas diferenças significativas entre tratamentos e controle. Em três dias, o uso de VS foi maior que o controle, porém menor que o tratamento BFT, que apresentou a maior taxa de crescimento com média de $1,45 \text{ \% dia}^{-1}$. Quando fertilizada em sete dias, algas cultivadas tanto em VS quanto em BFT apresentaram taxas de crescimento significativamente maiores que o controle (Fig. 03).

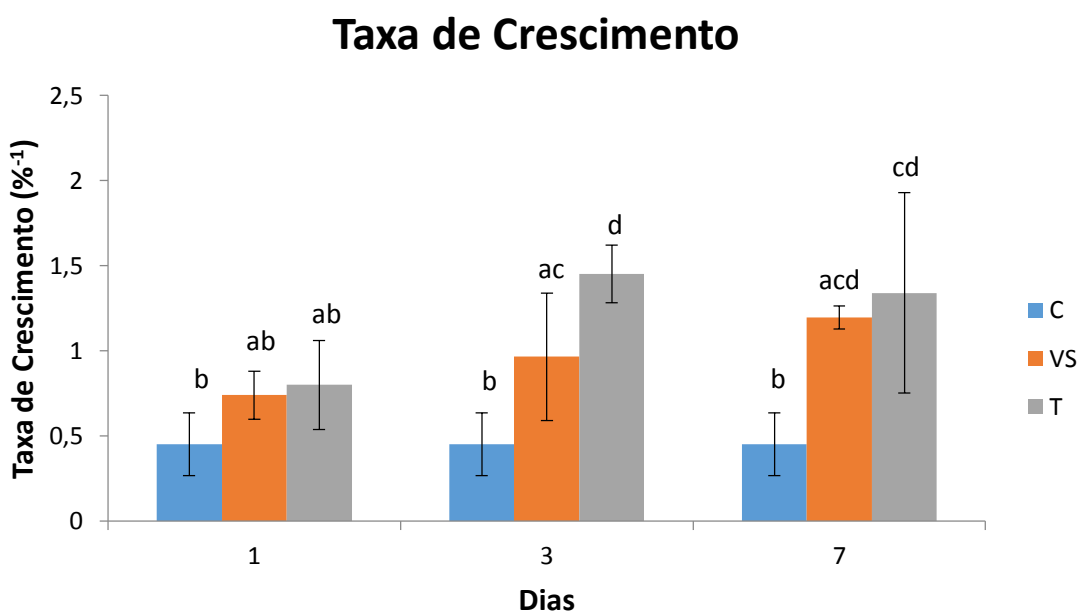


Fig. 03. Taxa de crescimento média de *G. domingensis* na fertilização com 25% de biofloco (T) em diferentes períodos, um (T1), três (T3) e sete (T7) dias. Algas cultivadas em solução von Stosch (VS) e somente em água do mar (controle - C), serviram de base para análise comparativa. As barras verticais indicam o intervalo de confiança, e as letras as diferenças estatísticas, considerando $p < 0,05$.

Quando o ganho de biomassa é considerado, o tratamento que demonstrou o maior ganho foi o BFT25% com duração de três dias de fertilização (Fig.04).

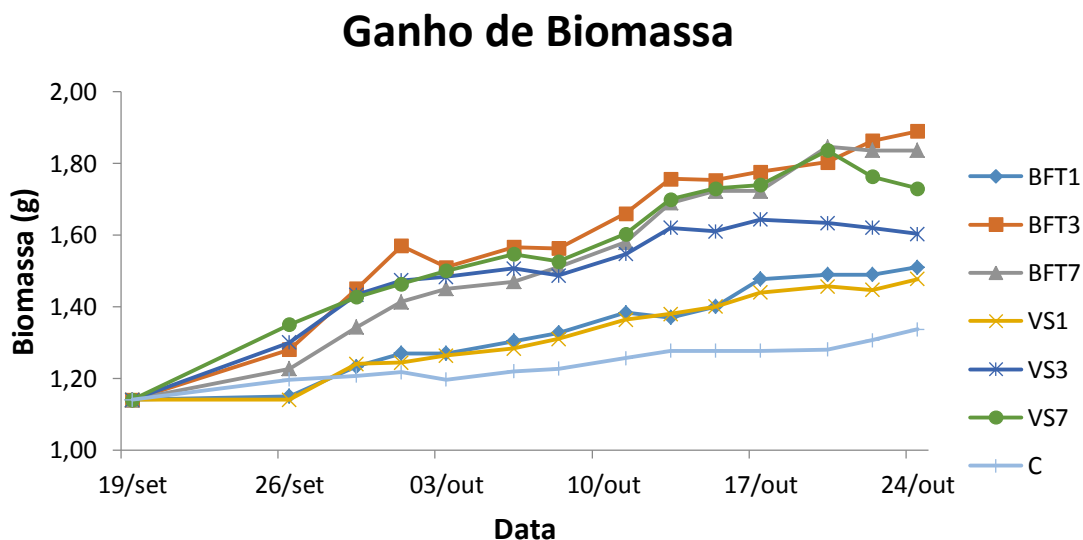


Fig. 04. Ganho de biomassa da *G. domingensis* na fertilização com 25% de biofloco (BFT 25%) nos diferentes períodos, um (BFT1), três (BFT3) e sete (BFT7) dias. O von Stosch (VS) e o controle (C), serviram de base para análise comparativa.

Com base nesses resultados, foi possível concluir que o uso da solução von Stosch como fertilizante para a *G.domingensis* poderia ser substituído pelo efluente da carcinicultura em sistema BFT, na concentração de 25% por um período de três dias em regime de pulso, sem que haja danos a macroalga e transformando um possível efluente em nutrição para a alga marinha.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andersen, R.A., 2005. Algal Culturing Techniques. Phycological Society of America. 1, 518.
- Avnimelech, Y., 2009. Biofloc technology: a practical guide book. Baton Rouge: The World Aquaculture Society., 182.
- Bixler, H.J., Porse, H., 2011. A decade of change in seaweed hydrocolloids industry. J. Appl. Phycol. 23, 321-335.
- Castille, F.L., A.L, Lawrence., 1986. Relationship between maturation and biochemical composition of the gonads and digestive glands of the shrimps *Penaeus aztecus* and *Penaeus setiferus* (L.). Journal of Crustacean Biology 9: 202-211.
- Cortés-Jacinto E, H Villarreal-Colmenares, R Civera-Cerecedo & LR Martínez-Córdova. 2003. Effect of dietary protein level on growth and survival of juvenile freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). Aquaculture Nutrition 9: 207-213.
- Costa VL, Plastino., 2011. Color inheritance and pigment characterization of red (wild-type), greenish-brown, and green strains of *Gracilaria birdiae* (Gracilariales, Rhodophyta). J Appl Phycol 23, 599–605.
- Ferreira, B.L., Barufi, B.J., Plastino, M.E., 2006. Growth of red and green strains of the tropical agarophyte *Gracilaria córnea* J. Agardh (Gracilariales, Rhodophyta) in laboratory Revista Brasil. Bot., 29, 1, 187-192.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2014. Disponível em: [HTTP://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/work/FIGIS/prod/webapps/figis/temp/hqp_1890558287407329207.xml&outtype=html](http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/work/FIGIS/prod/webapps/figis/temp/hqp_1890558287407329207.xml&outtype=html). Acesso em 13/10/2014
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2014. Disponível em: [HTTP://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/work/FIGIS/prod/webapps/figis/temp/hwp_270255681029869132.xml&outtype=html](http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/work/FIGIS/prod/webapps/figis/temp/hwp_270255681029869132.xml&outtype=html). Acesso em 13/10/2014
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2014. Disponível em: [HTTP://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/work/FIGIS/prod/webapps/figis/temp/hwp_270255681029869132.xml&outtype=html](http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/work/FIGIS/prod/webapps/figis/temp/hwp_270255681029869132.xml&outtype=html). Acesso em 05/05/2014
- Hanisak M.D. 1990. The used of *Gracilaria tikvahiae* (Gracilariales,

- Rhodophyta) as a model system to understand the nitrogen nutrition of cultured seaweed. *Hydrobiologia*. 204/205: 79-87
- Glenn, E. P. et al. Atlas of *Gracilaria* Spore Culture, Portland, Oregon, United States. Atlas of *Gracilaria* Spore Culture, Tucson, p. 01, 1996.
- Lignell, A., Pendersén, M., 1989. Agar composition as function of morphology and growth rate. Studies on some morphological strains of *Gracilaria secundata* and *Gracilaria verrucosa* (Rhodophyta). *Bot. Mar.*, 32, 219-227.
- Marinho, S.E., Panucci R.A., Carneiro M.A.A., Pereira D.C., 2009. Evaluation of *Gracilaria caudata* J. Agardh for bioremediation of nutrients from shrimp farming wastewater. *Bioresour Technol.* 100, 6192–6198.
- Martínez-Córdova L, A Campaña-Torres & M Porchas-Cornejo. 2003. Dietary protein level and food management in the culture of blue shrimp (*Litopenaeus stylirostris*) and white shrimp (*L. vannamei*) in microcosms. *Aquaculture Nutrition* 9: 155-160.
- Oliveira, E.C., Miranda, G.E.C., 1998. Aspectos sociais e econômicos da exploração de algas marinhas no Brasil. *In Anais do IV Congresso Latinoamericano de Ficologia*, Volume II Reunião Ibero-americana, VII Reunião Brasileira de Ficologia (E.J. Paula, M. Cordeiro-Marino, D.P. Santos, E.M. Plastino, M.T. Fujii, & N.S. Yokoya, eds). Sociedade Ficológica da América Latina e Caribe Sociedade Brasileira de Ficologia, São Paulo, v.z p.359-369.
- Oliveira, E.C. 1981. A exploração de algas marinhas no Brasil: situação atual e perspectivas futuras. *Phycologia Latino-Americana*. 1, 5-17.
- Sampaio, L.A.; Tesser, M. B.; Wasielesky Júnior, W. Avanços da maricultura na primeira década do século XXI: piscicultura e carcinocultura marinha. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.39, p.102-111, 2010.
- Schryver, P.D., Crab, R., Defoirdt, T., Boon, N., Verstraete, W. 2008. The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture*. 227, p. 125-137.