



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA

Avaliação do crescimento de microalgas importantes para aquicultura
cultivadas com diferentes concentrações de nutrientes

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura do Centro
de Ciências Agrárias da Universidade
Federal de Santa Catarina, como requisito
parcial à obtenção do título de Mestre em
Aquicultura.

Orientador: Luis Alejandro Vinatea Arana
Co-orientador: Roberto Bianchini Derner

Isabel Campos Portugal

Florianópolis / SC
2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

P853a Portugal, Isabel Campos

Avaliação do crescimento de microalgas importantes para aquicultura cultivadas com diferentes concentrações de nutrientes [dissertação] / Isabel Campos Portugal ; orientador, Luis Alejandro Vinatea Arana. - Florianópolis, SC, 2010.

46 p.: grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura.

Inclui referências

1. Aquicultura. 2. Microalga - Crescimento - Taxas. 3. Meios de cultura. I. Vinatea Arana, Luis. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Aquicultura. III. Título.

CDU 639.3

**Avaliação do crescimento de microalgas importantes para
aquicultura cultivadas no Meio Guillard (GUILLARD,1975)
com diferentes concentrações de nutrientes.**

Por

ISABEL CAMPOS PORTUGAL

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de
Pós-Graduação em Aquicultura.

Prof. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dr. Luis Alejandro Vinatea Arana – *Orientador*

Dra. Carla Van Der Haagen Custodio Bonetti

Dr. Luis Antônio de Oliveira Proença

Dr. Walter Quadros Seiffert

Dedico meu esforço para concluir meu trabalho

Para pessoa que mais me fez sentir orgulho

Que mais lutou pela vida

Um exemplo de paciência e superação

Ensinou-me a viver um dia após o outro e

Buscar ver o lado bom da vida

Sempre fazendo o que é certo

Todo dia é dia ...

EM MEMÓRIA de MEU IRMÃO KIKO.

Agradecimentos

A minha família que sempre me apoiou em todas as minhas escolhas e todas as decisões. Minha mãe Léa, meu pai Gilberto e minha irmã Flavinha. Mesmo longe sempre pude sentir a presença de vocês.

Ao professor Roberto Bianchini Derner que além de um professor orientador foi para mim um exemplo de profissional na área e pesquisador, sempre me ajudando com suas críticas bem colocadas e seu enorme coração. Muito Obrigada por te acreditado em mim, Roberto!!

Ao meu orientador Luis Alejandro Vinatea Arana pela orientação e compreensão no momento mais difícil dessa jornada, mesmo estando parte distante, sempre soube com uma palavra amiga me tranquilizar.

Aos membros da banca Walter Quadros Seiffert, Carla Van Der Haagen Custodio Bonetti e Luis Antônio de Oliveira Proença, por estarem prontamente dispostos a me auxiliar, pelas valiosas correções que ajudaram a tornar esse trabalho melhor, e por me mostrarem outras formas de ver a solução.

À Universidade Federal de Santa Catarina UFSC, Departamento de Aquicultura e ao Setor de microalgas do Laboratório de Camarões Marinhos LCM/ UFSC, pela oportunidade de estudo, a inserção na equipe de trabalho, conhecimento e experiência, além de apoio para as atividades laboratoriais, e à Capes pela bolsa de estudos

À toda coordenação do curso de Pós-graduação de Aquicultura e em especial ao secretário Carlito Aloísio Klunk pela assistência e presteza, carinho, atenção e ajuda.

Aos todos meus amigos que me confortaram nos momentos de dificuldade, me incentivando a continuar no trabalho. Amigos do Rio de Janeiro, de Niterói, de Florianópolis, todos foram de fundamental importância para minha formação como pesquisadora e como pessoa. Muito obrigada!

À Deus.

RESUMO

Dentre as numerosas aplicações comerciais do uso de microalgas podemos destacar sua importância na aquicultura onde podem ser empregadas como fonte primária de alimento para larvas, organismos jovens e até de adultos de moluscos, camarões e peixes marinhos, uma vez que, o elevado valor nutricional das microalgas justifica sua necessidade na alimentação destes organismos. Muitos fatores influenciam o crescimento das microalgas, sendo que, a disponibilidade de nutrientes é bastante relevante nesse aspecto. Para determinar o crescimento das culturas das microalgas *Thalassiosira weissflogii*, *Chaetoceros muelleri*, *Isochrysis* sp. e *Pavlova* sp. quando cultivadas com diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo durante todo o cultivo, foram desenvolvidos cultivos experimentais com essas espécies. As espécies foram cultivadas em meio de cultura Guillard (1975) e a diferença dos tratamentos foi a quantidade de nitrogênio e fósforo utilizada nas soluções estoques para compor o meio de cultivo. Os parâmetros de crescimento analisados foram a densidade celular máxima, o tempo de cultivo e a velocidade de crescimento. Foi aplicado um delineamento uni-fatorial para blocos casualizados. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância fatorial (Anova com $P < 0,05$) e quando necessário ao Teste de Comparação de Médias de TuKey ($p < 0,05$). Quanto ao crescimento das culturas o emprego do meio f – com o dobro da concentração de nitrato de sódio e de fosfato de sódio descrita em Guillard (1975), promoveu uma maior densidade celular nas culturas de *Thalassiosira weissflogii*, ($66,7 \times 10^4$ cel/mL) *Chaetoceros muelleri*, ($1566,7 \times 10^4$ cel/mL) *Isocrysis* sp ($1903,3 \times 10^4$ cel/mL) e *Pavlova* sp ($2362,3 \times 10^4$ cel/mL). ($p < 0,05$) Quanto ao tempo de cultivo e a velocidade de crescimento não houve diferença significativa para nenhuma das espécies ($p < 0,05$).

Palavras chave: meio Guillard , taxa de crescimento, *Thalassiosira weissflogii*, *Chaetoceros muelleri*, *Isocrysis* sp. e *Pavlova* sp.

ABSTRACT

Among the many commercial applications of the use of microalgae can highlight its importance in aquaculture which can be used as a primary food source for larvae, organisms and even young adult clams, shrimp and marine fish, since the high nutritional value of microalgae justify their need for feeding of these organisms. Many factors influence the growth of microalgae, and the availability of nutrients is quite relevant in this regard. To determine the growth of microalgae cultures of *Thalassiosira weissflogii*, *Chaetoceros muelleri*, *Isochrysis* sp. and *Pavlova* sp. when cultured with different concentrations of nitrogen and phosphorus throughout the cultivation, experimental crops have been developed with these species. The crops were grown in culture medium Guillard (1975) and the difference of the treatments was the amount of nitrogen and phosphorus in the solutions used to compose the stock culture medium. The growth parameters analyzed were the maximum cell density, time of cultivation and growth rate. We applied a design to unite factorial blocks casualizados. Os data were subjected to factorial analysis of variance (ANOVA $P < 0.05$) and when necessary to test comparison Tukey test ($p < 0.05$). As for the growth of crops through the use of the f - with twice the concentration of sodium nitrate and sodium phosphate described in Guillard (1975), promoted a higher cell density in cultures of *Thalassiosira weissflogii*, ($66,7 \times 10^4$ cel/mL) *Chaetoceros muelleri*, ($1566,7 \times 10^4$ cel/mL) *Isocrysis* sp ($1903,3 \times 10^4$ cel/mL) e *Pavlova* sp ($2362,3 \times 10^4$ cel/mL). ($p < 0,05$) The time of cultivation and the growth rate did not differ for either species ($p < 0.05$).

Keywords: medium Guillard, growth rate, *Thalassiosira weissflogii*, *Chaetoceros muelleri*, *Isocrysis* sp. e *Pavlova* sp.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Equipamento usado durante experimento: (A) câmara de fluxo laminar; (B) detalhe do galão com a marcação previa de 3.000ml e 4.000ml para auxiliar na colocação da água e inóculo; (C) unidades experimentais dispostas aleatoriamente na sala de experimento; (D) detalhe da seringa que foi usada para retirada de amostra..... 29
- Figura 2 Curvas de crescimento de cada uma das espécies para meio f/2 e meio f. Onde TFL: *Thalassiosira weissflogii*, CMU:*Chaetoceros muelleri*, IGA: *Isocrysis* sp. e PAV: *Pavlova* sp..... 32
- Figura 3 Densidade celular máxima média para cada espécie com o meio f/2 e como o meio f Onde TFL: *Thalassiosira weissflogii*, CMU:*Chaetoceros muelleri*, IGA: *Isocrysis* sp. e PAV: *Pavlova* sp..... 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Informações sobre as espécies usadas..... 25

* Dados estão disponíveis em: <<https://ccmp.bigelow.org>>. Acesso em: 02 fev. 2010

** Dados de Silva et al. (2003)

Tabela 2 Descrição do meio f/2 Guillard (1975), descrição do preparo das soluções padrões e quantidade utilizada para fertilizar 4000ml de água do mar, quantidade de cada unidade experimental. Destaque para valores de solução de Nitrato e Fosfato de meio f/2 e meio f..... 27

Tabela 3 Quadro resumo dos testes de comparação de médias¹ para a densidade celular máxima (DCM), tempo de cultivo (TEMPO) e velocidade de crescimento (k).

¹: (Tukey HSD com $p < 0,05$) e $n = 3$. Desvio padrão entre parêntesis. Letras diferentes indicam diferenças significativas..... 37

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
JUSTIFICATIVA	21
OBJETIVO	21
OBJETIVO GERAL	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DE MICROALGAS IMPORTANTES PARA AQUICULTURA CULTIVADAS NO MEIO GUILLARD (GUILLARD,1975) COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NUTRIENTES	22
INTRODUÇÃO	22
MATERIAIS E MÉTODOS	24
MATERIAL BIOLÓGICO	24
MEIO DE CULTURA	26
AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO	29
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA DA INTRODUÇÃO	43

INTRODUÇÃO

A taxonomia, aspecto da sistemática que tem objetivo de identificar, denominar e classificar espécies, não imprime um valor ao termo “alga”. Porém esse termo é aplicado a uma ampla variedade de organismos pertencentes a diversas linhagens, muito distintos entre si quanto à origem, composição química e morfologia. As algas são fotossintetizantes em sua grande maioria, tendo como primeiro pigmento fotossintético a clorofila *a* e usualmente o termo microalga se refere às algas com dimensões microscópicas (HOEK; MANN; JAHNS, 1995; LOURENÇO, 2006; JUDD et al., 2008). As microalgas e as cianobactérias estão entre os indivíduos mais antigos da Terra e são responsáveis por pelo menos 60% da sua produtividade primária podendo ser encontradas em ambiente marinho, em água doce e no solo (CHISTI, 2004, DERNER, 2006)

Desta forma, como grandes contribuidoras para a biodiversidade global, as algas, formam um grupo heterogêneo de organismos onde seus representantes são os maiores colaboradores à produtividade primária dos ecossistemas aquáticos, sendo capazes de converter a luz e o dióxido de carbono em carboidratos, estando presentes no fitoplâncton (RAVEN, 2001; SOARES-GOMES; FIGUEIREDO, 2002; CHISTI, 2004; GRAHAM; GRAHAM; WILCOX, 2009). Produtividade primária pode ser definida como a taxa de formação de substâncias orgânicas ricas em energia a partir de material inorgânico. A fotossíntese é uma das formas de se produzir essas substâncias onde sua reação geral é: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{Energia luminosa} \rightarrow \text{CH}_2\text{O} + \text{O}_2$. O fitoplâncton é o conjunto de algas microscópicas que vivem na coluna da água, deriva em função dos movimentos da corrente e está na base da maioria das cadeias tróficas aquáticas. (NYBAKEN, 1993; MARQUES JÚNIOR, 2002; GRAHAM; GRAHAM; WILCOX, 2009).

Os princípios básicos de cultivo microbiano geralmente podem ser aplicados para microalgas (LEE; SHEN, 2004). Cham-se de cultivo de organismos uma população que pode ser mantida viva em condições artificiais e controladas de desenvolvimento, com finalidades diversas, desde a mera manutenção dos organismos vivos até o aproveitamento econômico da biomassa formada. Para haver um cultivo de microalga é fundamental o conhecimento dos fatores que influenciam seu desenvolvimento. Sendo assim, é necessário que o meio de cultura contemple as necessidades nutricionais das microalgas, uma vez que uma mesma espécie pode ter variação na sua composição celular de

acordo com as condições do cultivo (RAVEN, 1988; BROWN et al., 1997; LEE; SHEN, 2004; HU, 2004).

Com esse objetivo, desde os anos 50, intensos esforços têm sido feitos para explorar novas e alternativas fontes protéicas, as quais foram buscadas em fungos, bactérias e microalgas. (BECKER, 2004, BECKER, 2007). Em comparação a outros seres vivos, as microalgas têm sido pouco estudadas e também sobre o ponto de vista biotecnológico sendo sub-aproveitada.(CHISTI, 2004 ; SPOLAORE et al., 2006).

Lourenço (2006) apresentou três categorias para aplicações comerciais reconhecidas para microalgas:

- (i) Uso de microalga para aumentar o valor nutricional de alimentos para o homem e para animais, agregando propriedades à sua composição química;
- (ii) Uso de microalga *in natura* ou parcialmente processada como alimentos de animais, em aquicultura;
- (iii) Utilização de moléculas de alto valor agregado (por exemplo, pigmentos e ácidos graxos), produzidas por microalgas, em alimentos industrializados, produtos farmacêuticos e cosméticos, por exemplo.

Na aquicultura, as microalgas são empregadas como fonte primária de alimento para larvas, organismos jovens e até de adultos de moluscos (COUTTEAU; SORGELOOS, 1992), bem como alimento para crustáceos e peixes, são empregadas de forma indireta servindo de alimento para fitoplânctófagos, como rotíferos, copépodes e artêmia, os quais são comumente utilizados em larviculturas (MORALES, 1983; BROWN et al., 1997; BECKER, 2004, DERNER, 2006). Assim, a necessidade de uso de alimento vivo no estágio larval pode representar aproximadamente 30% do custo da produção. Por essa razão, a produção de microalgas é um componente crítico para aquicultura (COUTTEAU; SORGELOOS, 1992).

Além da utilização das microalgas como fonte alimentar, outra função da aquicultura é proporcionar a melhoria da qualidade de água, através da absorção de produtos nitrogenados tóxicos (amônia e nitrito), atuando em um papel fundamental no balanço do oxigênio, do dióxido de carbono e dos compostos nitrogenados, sobretudo a amônia (ESTEVES, 1988; SIPAÚBA-TAVARES, 1995, LAVENS; SORGELOOS, 1996; POLI; VINATEA, 2004).

O crescimento constante da aquicultura mundial e sua modificação tendendo a uma aquicultura intensiva implicam em uma demanda maior de microalgas (DUERR; MOLNAR; SATO, 1998;

BOROWITKA, 1997). Aplicações em diversas áreas da biotecnologia, alta produtividade, alta qualidade e quantidade protéica por célula e o rápido crescimento de várias espécies de microalgas têm estimulado algumas publicações como Stein (1973), Shelef e Soeder (1980), Becker (1994) e Richmond (2004).

Desta forma, o cultivo comercial de microalgas em larga escala em alguns países tem se estabelecido como atividade industrial, onde sua produção está sob responsabilidade de algumas empresas como Cyanotech, OceanNutrition e InnovalG as quais tem como objetivo a obtenção de biomassa e extração de compostos de interesse (PULZ; GROSS, 2004 ; DERNER et al., 2006).

Segundo Amim (2008), as microalgas são também um recurso energético sustentável com um grande potencial para fixação de CO₂. Estudos e revisões comprovam que o biodiesel a partir de microalgas é tecnicamente possível (CHISTI, 2007; MENG et al., 2009) e, além de biocombustíveis, alguns produtos extraídos, como carotenóides, ácidos graxos poliinsaturados, biofertilizantes, vitaminas e enzimas, se somam a importância de se continuar com desenvolvimento e pesquisas de tecnologia de cultivo de microalgas (HARUN et al., 2010; BRENNAN; OWENDE, 2010). A despeito disso, os sistemas de produção dessas microalgas para a indústria de biodiesel possuem gargalos no cultivo propriamente dito e na separação da biomassa seca, por isso são incapazes de operar em larga escala. Economias na produção de biodiesel microalgal necessitam ser feitas para torná-lo competitivo ao diesel produzido a partir de petróleo (HARUN et al., 2010; CHISTI, 2007).

Dentre as microalgas comumente utilizadas na aquicultura, várias características são observadas, como tamanho da célula, distribuição na coluna d'água, digestibilidade, perfil bioquímico e velocidade de crescimento. As Prymnesiophytas da classe Pavlovophyceae são espécies incluídas com potencial nessas características (BROWN, 1991; BECKER, 1995; PONIS et al., 2008). As haptophytas, principalmente do gênero *Pavlova* sp. e *Isocrhysis* sp., são amplamente utilizadas como alimento vivo de invertebrados marinhos e sobretudo na alimentação de bivalves, pois possuem alto teor de ácidos graxos poliinsaturados, especialmente EPA e DHA além de seu tamanho e formato facilitar a ingestão (BOUGARAN et al., 2003; MARTINEZ-FERNANDEZ, 2004).

Da mesma forma as microalgas conhecidas como diatomáceas, constituem um grupo bastante representativo tanto em número de espécie quanto em abundância, e podem ser responsáveis por até 25% da produção primária no planeta. Incluídas nesse grupo têm-se as microalgas unicelulares marinhas *Chaetoceros muelleri* pertencente à

família Chaetoceraceae e a *Thalassiosira weissflogii* pertencente à família Thalassiosiraceae, as quais são da ordem Centrales (HOEK; MANN; JAHNS, 1995; RAVEN, 2001).

Na escolha da espécie a ser cultivada é importante levar em consideração os fatores que influenciam seu metabolismo como: luz, temperatura, pH, nutrientes, condições fisiológicas e concentração de CO₂ e O₂ disponíveis para cada microalga. Assim, a produtividade da cultura será consequência da interação dos fatores biológicos, físicos e químicos. (MARKL, 1980; RAVEN, 2001).

O crescimento das microalgas requer recursos minerais que estão presentes no meio. Nutrientes como carbono, nitrogênio, fósforo, hidrogênio, oxigênio e sílica (no caso das diatomáceas) são necessários pra manutenção e crescimento de culturas microlagais. Assim como cálcio, magnésio, enxofre e potássio, que devem estar presentes em quantidade relativamente grande e por isso são chamados de macronutrientes. Ferro, manganês, cobre, molibdênio e cobalto são exigidos em menor quantidade sendo assim chamamos de micronutrientes. A disponibilidade de cada nutriente varia de acordo com cada espécie (GUILLARD, 1975; GRAHAM; GRAHAM; WILCOX, 2009).

A necessidade de cada nutriente pode limitar o crescimento da população, pois o potencial de um recurso para limitar o crescimento populacional depende de sua disponibilidade em relação à demanda. Dessa forma a disponibilidade do nitrogênio varia de acordo com sua forma química, temperatura, ph, e presença de outros íons. (RICKLEFS, 1996)

Dentre os modelos de cultivo existentes, no cultivo tipo estacionário ou estanque é possível identificar as cinco fases de crescimento: 1) Fase de Indução ou fase lag; 2) Fase exponencial ou fase Log; 3) Fase de diminuição do crescimento relativo; 4) Fase estacionaria; 5) Fase de Morte da Cultura. Nesse tipo de cultivo, no meio de cultura fresco as células são inoculadas e nenhum outro componente é adicionado ao longo do desenvolvimento do cultivo (DERNER et al., 2006).

Até os dias de hoje, vários meios de culturas foram propostos com uma adequada concentração de nutrientes para o crescimento das microalgas como Guillard e Ryther (1962), Walne (1966), Provasoli (1975) e Guillard (1975). O meio de cultura f/2 (GUILLARD; RYOTHER, 1962) é um dos mais citados dentre trabalhos da literatura de aquicultura de algas, principalmente para fitoplâncton marinho. Esse trabalho foi publicado principalmente por uma necessidade da sociedade científica

em documentar o método, mas provavelmente não se previa que tantas variações e combinações surgiriam a partir desse meio. Por essa razão, a utilização do meio *f/2*, assim como suas variantes e formas modificadas, contribuiu muito para o avanço nas pesquisas do cultivo algal. (WILKFORS, OHNO; 2001).

A importância do nitrogênio no metabolismo de ecossistema aquático deve-se à sua participação na formação de proteínas, que é um dos componentes básicos da biomassa sendo essencial para as funções de fotossíntese, formação de gene e crescimento (ESTEVES, 1998; RAVEN, 2001; POLI; GÁLVEZ; OLIVEIRA, 2004). Já no papel celular, atua como principal componente de aminoácidos, nucleotídeos e pigmentos (LOBBAN; HARRISON, 1997). O nitrogênio, que pode constituir de 7-10% do peso seco celular, é um constituinte essencial para toda estrutura e função das proteínas da célula da microalga. O fósforo é outro macro nutriente relacionado com grande parte dos processos metabólicos que formam componentes essenciais das microalgas (HU, 2004). No caso do fósforo, sua importância deve-se à participação em processos fundamentais do metabolismo celular como armazenamento de energia (ATP) e estruturação da membrana celular (fosfolipídios). Todo fósforo presente em águas naturais, quer na forma iônica, quer na forma complexada, encontra-se sob a forma de fosfato e, quando presente em ecossistemas aquáticos continentais, tem origem de fontes naturais e artificiais (ESTEVES, 1998; POLI; VINATEA, 2004).

A sílica é um composto de fundamental importância, pois é utilizada pelas diatomáceas na elaboração de sua frústula e, no meio aquático, é encontrada sob forma solúvel, e sua disponibilidade é um fator limitante no crescimento das diatomáceas (ESTEVES, 1998; DE LA ROCHA, 2004). O processo de utilização da sílica disponível no meio pelas diatomáceas para constituição celular há milhões de anos tem sido aperfeiçoado. Dessa forma, estudos sobre nanotecnologia demonstram que processos antrópicos para utilização de sílica são menos produtivos que os processos biológicos das diatomáceas (HILDREBRAN, 2003). A principal origem da sílica presente no ambiente aquático é a partir da decomposição de minerais de silicato de alumínio frequentes em rochas sedimentares, essa sílica pode estar disponível sobre três formas principais: solúvel (íon SiO_4), sílica coloidal, sílica particulada (ESTEVES, 1998).

Todos os nutrientes de importância no meio ambiente também são importantes no meio de cultura. Muitos trabalhos relacionam a composição bioquímica da microalga como as condições do cultivo (VALENZUELA-ESPINOZA; MILLÁN-NÚÑEZ; NÚÑEZ-

CEBRERO, 2002) e tipos de meio de cultura (POISSON; ERGAN, 2001), outros trabalhos relacionam a fase de crescimento (BROWN et al. 1993) e fatores abióticos como temperatura (RENAUD et al. 2002). Desta forma, estudos que possam gerar mais informações para relacionar a composição do meio de cultivo com a produtividade do cultivo, contribuirão para formulação de meios de cultura com exigências específicas para cada grupo e espécie de microalga. O trabalho está sendo apresentado em forma de artigo científico para ser publicado no periódico – Revista Agropecuária Brasileira.

JUSTIFICATIVA

As microalgas são indispensáveis para cultivo de animais aquáticos, uma vez que são necessárias para a obtenção de biomassa para uso na alimentação de diversos organismos. É fundamental o conhecimento dos fatores que influenciam o crescimento das culturas. Dessa forma são necessários trabalhos de desenvolvimento da tecnologia produtiva de cultivo de microalga. O efeito da concentração de nitrogênio e fósforo sobre o crescimento de quatro espécies de microalgas importantes para uso em aquicultura irá trazer como benefício um incremento na densidade celular consequentemente aumentando a produtividade das culturas.

OBJETIVO

Objetivo Geral

Determinar o crescimento das culturas de *Thalassiosira weissflogii*, *Chaetoceros muelleri*, *Isocrysis* sp. e *Pavlova* sp., quando cultivadas com diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo.

Objetivos Específicos

Determinar os parâmetros de crescimento em termos da densidade celular máxima alcançada, tempo de cultivo e velocidade de crescimento das culturas, desenvolvidas com a concentração descrita de nitrato de sódio e de fosfato de sódio em Guillard (1975) e com o dobro da concentração desses nutrientes.

Avaliação do crescimento de microalgas importantes para aquicultura com diferentes concentrações de nutrientes

Isabel Campos Portugal*, Roberto Bianchini Derner e Luis Alejandro Vinatea Arana

INTRODUÇÃO

As algas são fotossintetizantes em sua grande maioria, tendo como primeiro pigmento fotossintético a clorofila *a* e usualmente o termo microalga se refere às algas com dimensões microscópicas (HOEK; MANN; JAHNS, 1995). As microalgas e as cianobactérias estão entres os indivíduos mais antigos da Terra e são responsáveis por pelo menos 60% da sua produtividade podendo ser encontrados em ambiente marinho, em água doce e no solo; (CHISTI, 2004, DERNER, 2006; JUDD et al., 2008). Para haver um cultivo de microalga é fundamental o conhecimento dos fatores que influenciam seu desenvolvimento, e sendo assim, é necessário que o meio de cultura contemple as necessidades nutricionais das microalgas, uma vez que a mesma espécie pode ter variação na sua composição celular de acordo com as condições do cultivo (HU, 2004; LEE; SHEN, 2004).

Até os dias de hoje vários meios de culturas foram propostos para o crescimento das microalgas como Guillard e Ryther (1962), Walne (1966), Provasoli (1975) e Guillard (1975). A utilização do meio f/2, assim como suas variantes e formas modificadas, contribuíram muito para o avanço de pesquisas do cultivo algal (WILKFORS, OHNO; 2001). A concentração dos nutrientes no meio de cultura influencia o desenvolvimento do cultivo e muitos trabalhos relacionam a produtividade e a composição bioquímica das microalgas como: as condições do cultivo (LÓPEZ-ELÍAZ et al., 2005), tipos de meio de cultura (POISSON; ERGAN 2001), a fase do crescimento (BROWN et al., 1993) e fatores abióticos, como por exemplo a temperatura (RENAUD et al., 2002). Desta forma, a composição do meio de cultura exerce direta influência na produtividade da cultura (VALENZUELA-ESPINOZA; MILLÁN-NÚÑEZ; NÚÑEZ-CEBRERO, 2002).

Visando a obtenção de informações relativas ao cultivo de espécies de grande importância econômica e considerando as condições experimentais, o objetivo deste estudo é avaliar os parâmetros de crescimento das microalgas *Thalassiosira weissflogii*, *Chaetoceros muelleri*, *Isochrysis* sp. e *Pavlova* sp., cultivadas com duas diferentes concentrações de nitrato de sódio e de fosfato de sódio. Neste sentido, este trabalho investigou se os nutrientes (N e P) disponibilizados através

do meio de cultura foram suficientes para o crescimento das microalgas nas condições oferecidas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Biológico

Nos cultivos experimentais foram empregadas microalgas das seguintes espécies: *Thalassiosira weissflogii*, *Chaetoceros muelleri*, *Isochrysis* sp. e *Pavlova* sp. As cepas das espécies citadas foram obtidas do Setor de cultivo de microalgas que faz parte do Laboratório de Camarões Marinhos, do Departamento de Aqüicultura, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina. Estas espécies foram escolhidas por apresentarem tecnologia de produção conhecida facilitando o desenvolvimento dos cultivos. Todas as cepas foram compradas no Provasoli-Guillard National Center Culture of Marine phytoplankton (CCMP,2010), Bigelow Laboratory for Ocean Sciences, Maine, Estados Unidos, sob os códigos que estão na Tabela 1, assim como características disponíveis pelo CCMP, como tamanho e utilização.

Tabela 1: Informações sobre as espécies usadas

* Dados estão disponíveis em: <<https://ccmp.bigelow.org>>.

Acesso em: 02 fev. 2010

** Dados de Silva et al. (2003)

Classe	Espécie	Código *	Comprimento *(μm)	Largura* (μm)	Exemplos de Aplicação**
Coccinodiscophyceae	<i>Thalassiosira weissflogii</i>	CCMP 1051	12,0 - 14,0	8,0 - 15,0	Moluscos (larvas, pré-sementes e adultos)
Coccinodiscophyceae	<i>Chaetoceros muelleri</i>	CCMP 1316	4,0 - 9,0	4,0 - 10,0	Moluscos (larvas, pré-sementes e adultos)
Prymnesiophyceae	<i>Isochrysis</i> sp.	CCMP 1324	4,0 - 8,0	-	Larvas de moluscos e rotíferos
Prymnesiophyceae	<i>Pavlova</i> sp.	CCMP 459	4,0 - 8,0	4,0- 5,0	Larvas de moluscos e rotíferos

Conforme Voltolina et al. (1998), a partir dos tubos de cultura estoque, foram desenvolvidas culturas em frascos de Erlenmeyer de 500 ml e posteriormente de 1.000 ml, nos quais foram feitas as aclimações prévias química e física às condições de cultivo,. Após essa etapa, as culturas estoques foram repicadas para Erlenmeyer de 2.000 ml e foi iniciada a aeração. O experimento foi iniciado a partir de culturas já aclimatadas ao meio de cultura.

A água do mar utilizada durante todos os experimentos foi a mesma. Esse cuidado prévio teve o objetivo de garantir que flutuação de nutrientes que poderia ocorrer na água do mar diariamente não ocorresse durante o experimento.

Meio de Cultura

O meio de cultura utilizado foi o f/2 de Guillard, Tabela 2 (GUILLARD, 1975), sendo que a escolha deste meio de cultura decorre deste ser um dos meios mais utilizados em cultivos de microalgas marinhas (DERNER et al., 2006).

Tabela 2: Descrição do meio f/2 Guillard (1975), descrição do preparo das soluções padrões e quantidade utilizada para fertilizar 4.000ml de água do mar, quantidade de cada unidade experimental. Destaque para valores de solução de Nitrato e Fosfato de meio f/2 e meio f.

PRÉ SOLUÇÃO		SOLUÇÃO PADRÃO		SOLUÇÃO TRABALHO	QUANTIDADE UTILIZADA NO EXPERIMENTO	
Reagente	Quantidade	Reagente	Quantidade		MEIO f/2	MEIO f
1	Não se Aplica	Solução de Nitrato de Sódio NaNO ₃ Água destilada	7.5g 100ml	1 ml da Solução Padrão para 1000 ml de Água do Mar	4ml	8ml
2	Não se Aplica	Solução de Fosfato de Sódio NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O Água destilada	0.5g 100ml		4ml	8ml
3	Não se Aplica	Solução de Silicato de Sódio Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O Água destilada	3.0 g 100ml		4ml *somente diatomáceas	4ml *somente diatomáceas
4	Não se Aplica	Solução de Vitamina Tiamina Cianocobalamina Biotina Água destilada	100mg 0.5mg 0.5mg 1000ml		4ml	4ml
5	Não se Aplica	Solução de EDTA e Ferro Na ₂ EDTA FeCl ₃ .6H ₂ O Água destilada Na ₂ EDTA	4.36g 3.15g 900ml		4ml	4ml
6	Cobre CuSO ₄ .5H ₂ O Água destilada Zinco ZnSO ₄ .7H ₂ O Água destilada Cobalto CoCl ₂ .6H ₂ O Água destilada Manganês MnCl ₂ .4H ₂ O Água destilada Molibdênio NaMoO ₄ .2H ₂ O Água destilada	0.98g 100ml 2.2g 100ml 1.0g 100ml 18.0g 100ml 0.63g 100ml	Solução Metais 1ml de cada Solução-padrão em 1000 ml de água destilada	1 ml da Solução Padrão para 1000 ml de Água do Mar	4 ml	4 ml

A concentração de nitrogênio e fósforo teve variação entre o meio f/2 e o meio f, onde o primeiro terá a quantidade descrita em Guillard (1975) e o meio f o dobro da quantidade desses nutrientes. A solução que foi adicionada à água do mar como fonte de nitrogênio e fósforo será adicionada em dobro como demonstrada na última coluna em destaque da Tabela 2, onde, para o experimento, a quantidade para o meio f/2 da solução de nitrato de sódio e a solução de fosfato de sódio é de 4 ml e para o meio f a quantidade é de 8 ml. A adição dessas soluções assim como todos os procedimentos para o início do experimento ocorreram dentro da câmara de fluxo laminar para evitar contaminação (Figura 3 A-B).

As soluções estoque de cada nutriente presente no meio de cultura foram preparadas separadamente e autoclavadas, exceto a solução de vitaminas que foi esterilizada por filtração (filtro de membrana com $0,22\mu\text{m}$ de porosidade) e guardadas em local asséptico.

Todas as culturas foram mantidas com agitação constante, com fluxo de ar atmosférico de 0,3 l/mim, sob iluminação constante (fotoperíodo integral, 24:0) empregando lâmpadas fluorescentes tipo Luz do Dia de 80 W, numa intensidade luminosa de 1.985 ± 85 lux (irradiância), utilizando luxímetro digital microprocessado. A temperatura foi mantida em $20 \pm 0,5^\circ\text{C}$ e a água oceânica utilizada apresentava salinidade média de 35,5.

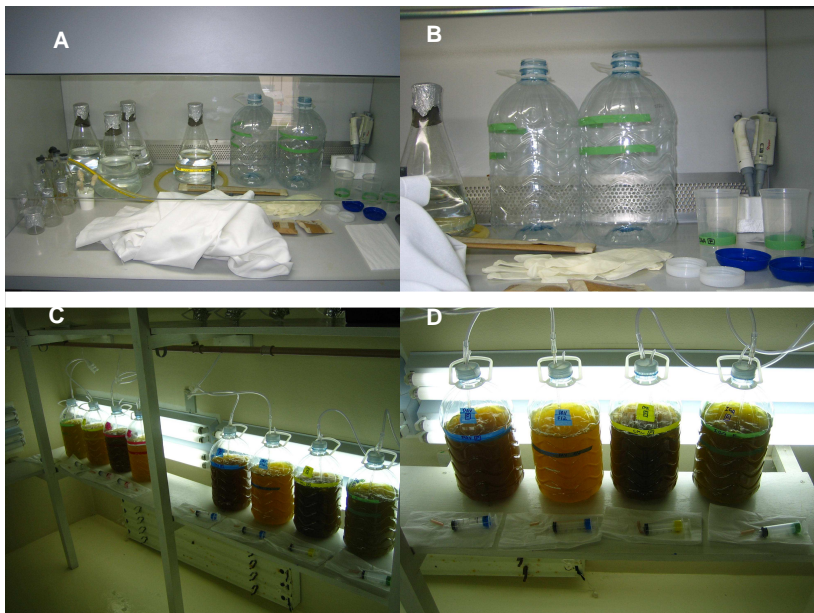


Figura 1: Equipamento usado durante experimento: (A) câmara de fluxo laminar; (B) detalhe do galão com a marcação previa de 3.000ml e 4.000ml para auxiliar na colocação da água e inoculo; (C) unidades experimentais dispostas aleatoriamente na sala de experimento; (D) detalhe da seringa que foi usada para retirada de amostra.

Cada unidade experimental era constituída de um galão plástico com capacidade de 5.000 ml, contendo 4.000 ml de cultura, uma pipeta para aeração e um orifício para a retirada diária de alíquota (Figura 3) para a determinação da densidade celular. Diariamente as culturas eram agitadas, pois com aumento da densidade e pela concentração de pigmentos a movimentação evitava o autossombreamento das células e, além disso, as culturas eram trocadas de lugar na prateleira garantindo que a distribuição da luz artificial fosse igualitária para todas as unidades experimentais.

Avaliação do Crescimento

O crescimento das microalgas foi determinado pelo aumento diário da densidade celular por meio da elaboração de curvas de crescimento para avaliar a Densidade Celular Máxima (DCM), o Tempo de cultivo (Tempo) e a Velocidade de Crescimento (k) para cada espécie em cada uma das unidades experimentais. As unidades experimentais

foram inoculadas com densidades celulares pré-estabelecidas para cada espécie: *T. weissflogii* - 10×10^4 células/mL; *C. muelleri* - 100×10^4 células/mL; *Pavlova_cf* sp. - 300×10^4 células/mL e *Isochrysis* sp. - 200×10^4 células/mL.

Foram retiradas amostras das culturas a cada 24 horas após o início dos cultivos a fim de determinar a densidade celular. As contagens foram realizadas em microscópio ótico com auxílio de Câmara de Neubauer, sendo que o número de células correspondeu à média de até três contagens. Para contagem das espécies flageladas foi utilizada solução de lugol acético (LOURENÇO, 2006).

As curvas de crescimento foram elaboradas com a densidade celular diária da média das três repetições de cada tratamento. A Densidade Celular Máxima (DCM) foi definida como o máximo valor obtido em número de células por mililitro, antes de a cultura microalgal alcançar a fase estacionária da curva de crescimento, independentemente do tempo transcorrido desde o início do cultivo.

O tempo de cultivo foi determinado pelo número de dias passados desde o início do cultivo até o dia em que for alcançada a densidade celular máxima.

A velocidade de crescimento (k), que representa o número de divisões celulares da população por unidade de tempo (dia), foi determinada pela fórmula citada em Stein (1973). A velocidade de crescimento específica de cada unidade experimental foi determinada considerando o dia de cultivo que a população alcançou densidade celular máxima.

Delineamento experimental

Foi aplicado um delineamento uni-fatorial 4 X 2, sendo quatro espécies de microalga (fator 1) e duas concentrações diferentes de nitrogênio e fósforo no meio de cultura. Foram desenvolvidos experimentos em blocos inteiramente casualizados, com três repetições (três blocos – em três datas diferentes – contendo todas as combinações, distribuídas ao acaso), totalizando 24 unidades experimentais.

Para as análises estatísticas dos dados foi empregado o modelo matemático proposto por Mendes (1985), para blocos inteiramente casualizados. Em seguida foram empregados os programas, MS EXCEL 7.0, ASSISTAT 7.2 e STATISTICA 6.0. A normalidade foi testada com o Teste de Kolmogorov- Smirnov ($p < 0,05$) e a homogeneidade das variâncias foi testada através do Teste de Bartlett ($p < 0,05$). Como os dados estavam normalizados e homogêneos foi empregada a ANOVA unifatorial e o Teste de Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento das microalgas está representado graficamente nas curvas que se referem à densidade celular diária (em células por mililitro) da média de três repetições para cada espécie. As curvas de crescimento estão representadas na Figura 2, onde cada espécie apresenta duas curvas de crescimento uma para o meio f/2 e outra para o meio f. Conforme pode ser observado nas curvas, a fase de indução ou fase lag não foi percebida, foi inexistente ou mesmo não ocorreu, pois a diferença na condição de cultivo antes do experimento era discreta ou quase nula. As espécies estudadas são diferentes em suas dimensões celulares, por essa razão, o cultivo foi iniciado com densidades distintas sendo necessário desenvolver as curvas em diferentes escalas. O comportamento das curvas para cada espécie foi bastante semelhante, uma vez que as condições de cultivos eram iguais, entretanto a densidade celular máxima alcançada para cada espécie cultivada com o meio f é superior à densidade celular máxima alcançada com o meio f/2.

Na Figura 3 são apresentados os valores (média das três repetições) da densidade celular máxima (DCM), calculados para cada espécie de microalga em cada meio f/2 e f. A diferença entre a densidade celular máxima foi evidente nas culturas de *T. weissflogii* (de até 71×10^4 cel/mL), *C. muelleri* (de até 1.725×10^4 cel/mL), *Pavlova* sp. (de até 2.362×10^4 cel/mL) e *Isochrysis* sp. (de até 1.753×10^4 cel/mL) cultivadas com meio f.

Houve uma grande diferença entre a DCM encontrada em cada espécie. Levando em consideração as distintas dimensões celulares de cada espécie e que essa diferença de tamanho influencia na absorção de nutrientes, onde há uma maior eficiência na absorção de nutrientes por células menores, devido a uma maior razão superfície - volume (LAVÍN e LOURENÇO, 2005).

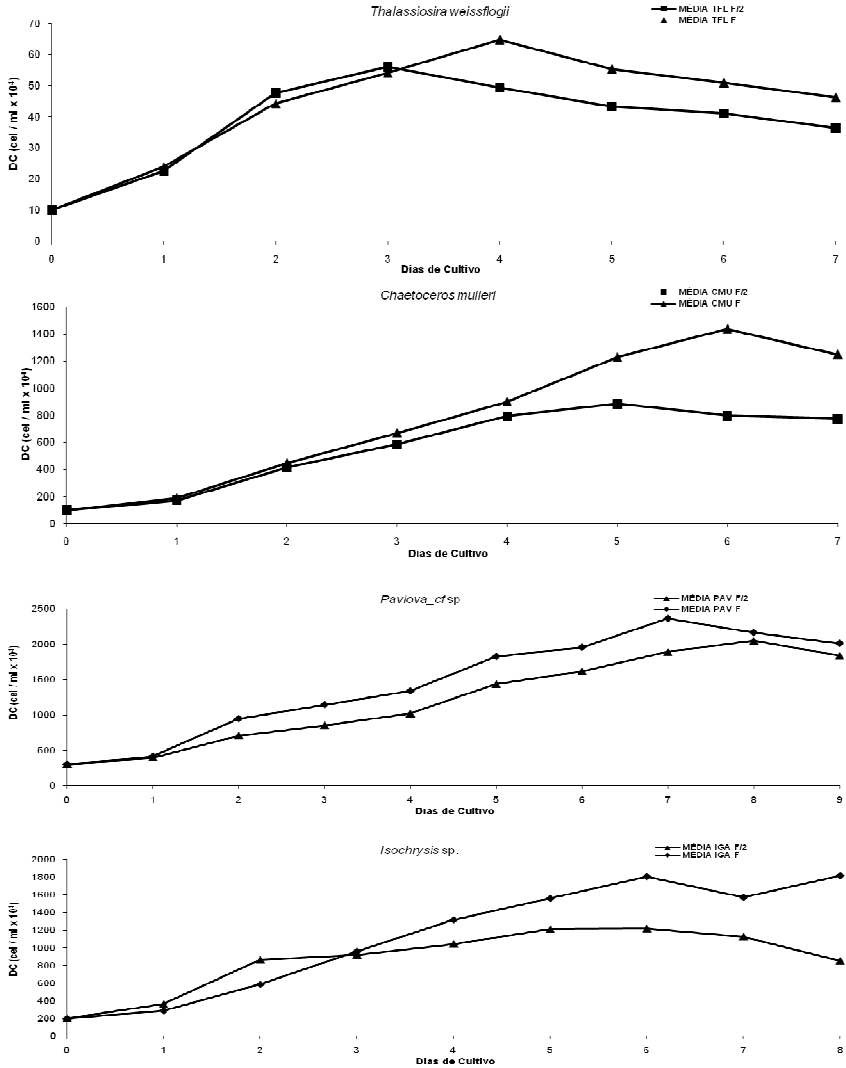


Figura 2 Curvas de crescimento de cada uma das espécies para meio f/2 e meio f. Onde TFL: *Thalassiosira weissflogii*, CMU: *Chaetoceros muelleri*, IGA: *Isochrysis sp.* e PAV: *Pavlova sp.*

Os dados demonstram claramente que há diferença significativa na densidade celular máxima atingida com diferentes concentrações de nitrogênio e fósforo no meio de cultura. Há diferença significativa entre a densidade celular máxima alcançada pelo meio $f/2$ e pelo meio f em todas as espécies, como pode ser observado na Tabela 3. Sánchez, Martínez, Espinola (2000) apresentaram parâmetros cinéticos de taxa máxima de crescimento específico pra *Isochrysis galbana* onde o meio Algal-1, que possui mais de três vezes a quantidade de nitrato que o meio $f/2$, apresentou taxa maior que o meio $f/2$. Assim como Poisson e Ergan (2001) testando o meio de cultura Jones et al. (1963) e o meio Provasoli $1/3$ descrito em Robert (1983) atingiu densidades superiores com o Provasoli $1/3$ optando naquele momento pelo uso deste último. Desta forma, a opção por um meio de cultura que seja mais produtivo é de grande interesse para o mercado assim como um sistema de cultivo eficiente.

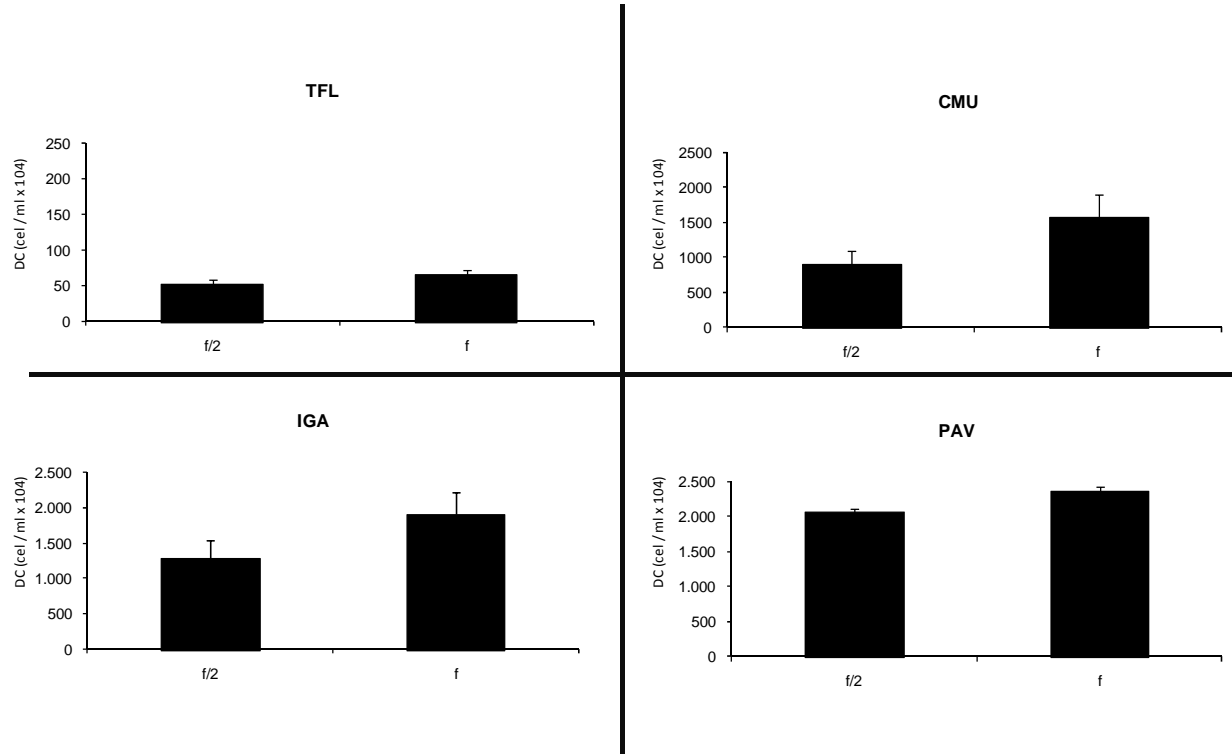


Figura 3 Densidade celular máxima média para cada espécie com o meio $f/2$ e como o meio f Onde TFL: *Thalassiosira weissflogii*, CMU: *Chaetoceros muelleri*, IGA: *Isocrysis* sp. e PAV: *Pavlova* sp.

A habilidade em acumular nitrogênio nos períodos de alta concentração possibilita a sobrevivência do fitoplâncton em períodos de baixa concentração deste nutriente no ambiente natural (DORTH, 1982). Quando em cultivo, De La Rocha e Passow (2004) demonstraram que mesmo em situações onde o nitrato está completamente ausente a divisão celular não cessou. As microalgas marinhas podem acumular nitrogênio inorgânico quando a taxa da absorção é maior que as demais taxas. O acúmulo de nitrogênio inorgânico pode ser consequência da diferença das taxas do passo prévio no processo de assimilação (BERGES, 1997).

Ishida et al. (2000) testaram a tolerância da *Thalassiosira weissflogii* a diferentes concentrações de CO₂ (5% 10% e 20%) e avaliaram sua composição bioquímica e seu crescimento onde obtiveram como densidade celular máxima os valores para a concentração de 5% de CO₂ 42 x 10⁴ cel/mL e 44 x 10⁴ cel/mL, esses valores estão próximos aos valores alcançados nos cultivos com meio f/2 porem são inferiores aos valores alcançados com meio f para mesma espécie no presente estudo. Assim como em Zhukova (2004), que utilizando o meio f alcançou 28 x 10⁴ cel/mL, em um cultivo de *T. pseudonana*, onde tinha objetivo de observar mudanças no ciclo de vida da espécie para verificar mudanças na composição dos lipídios, os valores encontrados no presente trabalho são superiores.

Os valores para densidade celular máxima para *T. weissflogii* em Guerra, Romero e Mauri (2004) são similares aos valores obtidos nesse trabalho para ambos dos meios f/2 e f, entretanto em Oshe et al., (2008) em unidades experimentais de 800ml e meio de cultura com quantidades intermediárias entre f/2 e f para fonte de nitrogênio e fósforo obtiveram valores de densidade celular de 164 x 10⁴ cel/mL, superiores ao alcançado nesse estudo. Quanto à velocidade de crescimento Reinfelder et al. (2000) alcançaram taxas de crescimento variando de 1,0 a 1,5 por dia para estudos sobre cinética e crescimento onde essa amplitude foi superior aos valores obtidos no presente trabalho para os mesmo gêneros.

A densidade celular máxima alcançada nas culturas de *C. mulleri* em meio f/2 foi similar àquela obtida por Araújo e Garcia (2005), que testando diferentes temperaturas (20, 25 e 30 °C), salinidade (25 e 35) e adição de CO₂ para cultura de *C. cf. wighamii*, alcançaram a densidade celular máxima de 730 x 10⁴ cel/mL. Já Voltolina et al., (2008) estudando o crescimento de *C. mulleri* durante as estações do ano em tanques abertos de produção massiva obtiveram no terceiro dia de cultivo 415 x 10⁴ cel/mL e 95 x 10⁴ cel/mL para primavera e inverno respectivamente, valores esses inferiores ao obtido nesse estudo.

Oshe et al. (2008) ao avaliar o crescimento das microalgas em sistema autotrófico estacionário, obtiveram os valores de $1.615,33 \times 10^4$ cel/mL, para *C. mulleri* e 2412×10^4 cel/mL, para *Isochrysis* sp. Valores estes superiores ao encontrado para cultivos dessas espécies com meio f/2, mas similares aos valores encontrados em cultivo com meio f, sendo que o meio utilizado no trabalho possuía sua formulação mais próxima ao do meio f pela concentração de nitrogênio e fósforo.

Borges-Campos, Barbarino e Lourenço (2010), utilizando o meio de cultura Walne (1996), produziram densidade celular máxima para *Isochrysis galbana* de 800×10^4 cel/mL, valor menor do obtido neste trabalho, porém, levando em consideração o inóculo inicial essa densidade celular máxima alcançada no estudo foi superior aos valores presentes.

Avaliando o crescimento da *I. galbana* em meio de cultura f/2 e meio de cultura com fertilizante agrícola, Valenzuela-Espinoza; Millán-Núñez, Núñez-Cebrero (2002) apresentaram valores médios de densidade de 515 e 519×10^4 cel/mL para o cultivo com fertilizante e meio f/2, respectivamente, valores inferiores aos encontrados no presentes estudos, assim como, em Poisson e Ergon (2001) que testando o meio de cultura Jones et al (1963) e o Provasoli 1/3 descrito em Robert (1983) em cultivos de 500ml, obtiveram $241,3 \times 10^4$ cel/mL e $367,5 \times 10^4$ cel/mL respectivamente, em seguida cultivaram em biorreatores de 2.000ml desenvolvidos com meio de melhor rendimento o Provasoli 1/3 descrito em Robert (1983), alcançaram densidade celular de 578×10^4 cel/mL valor também abaixo do rendimento encontrado.

Quanto ao tempo de cultivo os valores de Valenzuela-Espinoza, Millán-Núñez e Núñez-Cebrero (2002), Oshe et al. (2008), Martinez-Fernandez et al. (2006) foram similares aos obtidos neste estudo, entretanto, em Borges-Campos, Barbarino e Lourenço (2010) e Fidalgo et al. (1998) o valor em dias foi de 12 e 10 respectivamente. Esse valor distinto entre os dias de cultivos aferidos nos estudos pode ser explicado pela diferença entre o tamanho das unidades experimentais e densidade celular inicial das culturas.

Estudos sobre o efeito do sistema e da técnica do cultivo nas características bioquímicas de *Pavlova lutheri* obtiveram os valores de 2.300×10^4 cel/mL e 9.000×10^4 cel/mL para garrações de 10 litros e fotobiorreator, respectivamente. Essa diferença entre os valores obtidos está relacionada com a diferença entre as unidades experimentais. Cultivos semiconitínuos de *P. lutheri* em fotobiorreator, quando empregados em condições controladas, resultaram em alta produtividade (Ponis et al., 2006).

Tabela 3 Quadro resumo dos testes de comparação de médias¹ para a densidade celular máxima (DCM), tempo de cultivo (TEMPO) e velocidade de crescimento (k). ¹ (Tukey HSD com p < 0,05) e n = 3. Desvio padrão entre parêntesis. Letras diferentes indicam diferenças significativas.

Espécie	Meio	DCM (cel/ml x 10 ⁴)	TEMPO (dias)	k (divisões/dias)
<i>Thalassiosira weissflogii</i>	f/2	52,0 (6,1) ^a	3,3 (0,6) ^c	0,72 (0,14) ^d
	f	66,7 (5,5) ^b	4,7 (1,2) ^c	0,61 (0,14) ^d
<i>Chaetoceros muelleri</i>	f/2	898,3 (201,4) ^a	5,3 (0,6) ^c	0,60 (0,11) ^d
	f	1.566,7 (332,9) ^b	5,7 (0,6) ^c	0,71 (0,13) ^d
<i>Isochrysis</i> sp.	f/2	1.293,3 (245,5) ^a	5,7 (0,6) ^c	0,48 (0,10) ^d
	f	1.903,3 (307,7) ^b	7,3 (1,2) ^c	0,45 (0,05) ^d
<i>Pavlova</i> sp.	f/2	2.050,0 (75,0) ^a	7,7 (0,6) ^c	0,36 (0,02) ^d
	f	2.362,3 (62,5) ^b	7,3 (0,6) ^c	0,41 (0,03) ^d

CONCLUSÕES

O emprego do meio F – com o dobro da concentração de nitrogênio e fósforo, promoveu uma maior densidade celular nas culturas de *Thalassiosira weissflogii*, *Chaetoceros muelleri*, *Isocrysis* sp. e *Pavlova* sp.

Não houve diferença significativa no tempo de cultivo nem na velocidade de crescimento para nenhuma das espécies cultivadas independentemente da concentração de N e P utilizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORGES-CAMPOS, V.; BARBARINO, E.; LOURENÇO, S. O. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 2, p.339-347, fev. 2010.

CCMP. The Provasoli-Guillard National Center. Disponível em: <<https://ccmp.bigelow.org/node/1/strain/CCMP1051>>. Acesso em: 02 fev. 2010.

CHISTI, Y. Microalgae: our marine forests. Book reviews: Richmond, A. (ed.). Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycolgy. Oxford: Blackwell Science, 566. **Biotechnology Advances**, n. 22, p.565-567, 2004.

COUTTEAU, P. ; SORGELOOS, P. The use of algal substitutes and requirement for live algae in the hatchery and nursey of bivalve mollusks: an international survey. **Journal of Shellfish Research**, n. 11,v. 2, p.467-76, 1992.

De CASTRO ARAÚJO, S.; GARCIA, V. M. T.; Growth and biochemical composition of the diatom *Chaetoceros cf. wighamii* brightwell under different temperature, salinity and carbon dioxide levels. I. Protein, carbohydrates and lipids. **Aquaculture**, n. 246, p.405-412, 18 fev. 2005.

DE LA ROCHA, C. L. Recovery of *Thalassiosira weissflogii* from nitrogen and silicon starvation. **Limnol. Oceanogr.**, Cambridge, v. 49, n. 1, p.245-255, 2004.

DERNER, R. B. Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, como ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. **Tese de Doutorado**, UFSC, Florianópolis, 2006.140p

DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p.1959-1967, nov-dez. 2006.

DORTH, Q. 1982. Effect of growth conditions on accumulation of internal nitrate, ammonium, amino acids, and protein in three marine species. **Mar. Biol.** , 79:151-164.

GUERRA, M.; ROMERO, T.; MAURI, Y. Evaluación de tres cepas de *Thalassiosira* en dos medios de cultivo para su uso en el desarrollo de *Litopenaeus vannamei*. **III Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura**, Ciudad de La Habana, p.218-223, 2004. Disponible em: <<http://www.civa2004.org>>. Acceso em: 10 mar. 2010.

GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Culture of Marine invertebrates Animals (Smith, W. L. & Chanley, M. H., eds.). **Plenum Publishing**, New York, 1975. 29-60p.

HOEK, C. V. D.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae: An introduction to phycology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. 623 p.

HU, Q. Environmental Effects on Cell Composition. **In: Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology** (Richmond, A., ed.). Oxford: Blackwell Science, 2004. 83-93 p.

KHUKOVA, N. V. Changes in the lipid composition of *Thalassiosira pseudonana* during its life cycles. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 51, n. 5, p. 702-707, 2004.

ISHIDA, Y. et al. A Highly CO₂- Tolerant diatom, *Thalassiosira weissflogii* H1, enriched from coastal sea, and its fatty acid composition. **Fisheries Science**, v. 66, p.655-659, 31 mar. 2000.

JUDD, W. S. et al. **Plant Systematics: a phylogenetic approach**. 3. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., 2008. 611 p.

LAVENS, P.; SORGLOOS, P. Manual on the production and used of live food for aquaculture. **FAO fisheries Technical Paper**, 1996. No. 361, 295.

LAVÍN, P.L.; LOURENÇO, S.O. Na evaluation of intracellular inorganic nitrogen pools by marine microalgae in culture. **Brazilian Journal of Oceanography**, 2005. 53 (1/2): 55-67.

LEE, Y.; SHEN, H. Basic Culturing Techniques In: **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology** (Richmond, A., ed.). Oxford: Blackwell Science, 2004. 41-56 p.

LEONARDOS, N.; LUCAS, I. A.N. The nutritional value of algae grown under different culture conditions for *Mytilus edulis* L. larvae. **Aquaculture**, North Wales, n. 182, p. 301-315, 2000

LOURENÇO, S. O. 2006. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. Ed Rima, São Carlos, 2006. 606p.

MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, E.; ACOSTA-SALMÓN, H.; SOUTHGATE, P. C. The nutritional value of seven species of tropical microalgae for black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*, L.) larvae. **Aquaculture**, v. 257, p.491-503, 13 mar. 2006.

MENG, X.. et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, Qingdao, p. 1-5. 10 jul. 2009.

OHSE, S. et al. Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. **Biotemas**, v. 2, n. 21, p.7-18, 18 jul. 2008.

POISSON, L.; ERGAN, F. Docosahexaenoic acid ethyl esters from *Isochrysis galbana*. **Journal Of Biotechnology**, v. 91, p.75-81, 201.

PONIS, E. et al. Effect of the culture system and culture technique on biochemical characteristics of *Pavlova lutheri* and its nutritional value for *Crassostrea gigas* larvae. **Aquaculture Nutrition**, Boston, p. 322-329. 02 mar. 2006.

PONIS, E. et al. *Pavlova lutheri*: Production, preservation and use as food for *Crassostrea gigas* larvae. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 282, p.97-103, 12 jun. 2008.

PROVASOLI, L.; MCLAUGHLIN, J.J. ; DROP, M.R. . The development of artificial media for marine algae. **Arch. Mikrobiol.**, 25:392-428. 1957.

REINFELDER, J. R.; KRAEPIEL, A. M. L.; MOREL, F. M. M. Unicelular C4 photosynthesis in marine diatom. **Nature**, v. 407, p. 996-999. 26 out. 2000.

RENAUD, SUSAN M. et al. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 211, p.195-214, 2002.

SHELEF, G.; SOEDER, C.J. Algae Biomass. Production and Use. Elsevier North- Holland, Amsterdam, 1980, 852p.

SILVA F. C., PEREIRA, A., CANOZZI, M. B., ARAÚJO, S. C. Cultivo de microalgas marinhas. In: Poli, C.R., Poli, A. T. B., Andreato, E., Beltrame, E. (Org.). **Aquicultura: experiencias brasileiras**, Florianópolis, Multitrefa, Editora Ltda, 2003. 93-120p.

STEIN, J. R. (ed.). **Handbook of Phycological Methods**. Culture Methods and Growth Measurements. Cambridge University Press, Cambridge, 1973. 448p.

SPOLAORE, PAULINE. et al. Commercial Applications of Microalgae. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, Paris, v. 101, n. 2, p.87-96, 2006.

VALENZUELA-ESPINOZA, E.; MILLÁN-NÚÑEZ, R.; NÚÑEZ-CEBRERO, F. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll content in *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. **Aquacultural Engineering**, v. 25, p.207-216, 2002.

VOLTOLINA, D. et al. The importance of acclimation for the evaluation of alternative media for microalgae growth, **Aquacultural Engineering** 19, 1998. 7-15.

WALNE, P.R. Experiments in the large scale culture of larvae of *Ostrea edulis*. **Fish. Invest. Lond. Ser.** 2, 25: 1-53. 1966.

WILKFORS, G. H. Altering Growth and Gross Chemical Composition of Two Microalgal Molluscan Food Species by Varying Nitrate and Phosphate. **Aquaculture**, Milford, v. 59, p. 1-14, 1986.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA DA INTRODUÇÃO

AMIN, S. Review on biofuel oil and gas production processes from microalgae. **Energy Conversion And Management**, Jakarta, p. 1834-1840. 19 abr. 2009.

BECKER, E. W. Microalgae in human and animal nutrition. In: **Handbook of Microalgal Culture**. Biotechnology and Applied Phycology (Richmond, A., ed). Blackwell Science, Oxford, 2004. 312-351p.

BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, 2007. 25:207-210.

BOROWITZKA, M. A. Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. **Journal Of Applied Phycology**, Amsterdam, v. 9, p.393-401, 18 out. 1997.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, Golden, n. , p.557-577, 2010.

BROWN, M. R. et al. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, Amsterdam, p.315-331, 1997.

CHISTI, Y. Microalgae: our marine forests. Book reviews: Richmond, A. (ed.). **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 566. **Biotechnology Advances**, n. 22, p.565-567, 2004.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, Palmerston North, n. 25, p.294-306, 13 fev. 2007.

COUTTEAU, P. ; SORGELOOS, P. The use of algal substitutes and requirement for live algae in the hatchery and nursery of bivalve mollusks: an international survey. **Journal of Shellfish Research**, n. 11, v. 2, p.467-76, 1992.

DE LA ROCHA, C. L. Recovery of *Thalassiosira weissflogii* from nitrogen and silicon starvation. **Limnol. Oceanogr.**, Cambridge, v. 49, n. 1, p.245-255, 2004.

DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p.1959-1967, nov-dez. 2006

DUERR, E. O.; MOLNAR, A. ; SATO, V. Cultured microalgae as aquaculture feeds. **Journal Of Marine Biotechnology**, New York, v. 7, p.65-70, 1998.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de Liminologia**. Interciência/FINEP, Brasil, 1988, 575p

GRAHAM, Linda E.; GRAHAM, James M.; WILCOX, Lee W.. **Algae**. 2. ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2009. 616 p.

JUDD, Walter S. et al. **Plant Systematics: a phylogenetic approach**. 3. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., 2008. 611 p.

LEE, Y.; SHEN, H. **In: Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology** (Richmond, A., ed.). Oxford: Blackwell Science, 2004. 41-56 p.

LOBBAN, C.S. ; HARRISON, P.J. **Seaweed ecology and physiology**. Cambridge, Cambridge University Press, 366p., 1997

LOURENÇO, S. O. 2006. **Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações**. Ed Rima, São Carlos, 2006. 606p.

HARUN, R. et al. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, Victoria, p. 1037-1047. 05 jan. 2010.

HILDEBRAND, M. Biological processing of nanostructured silica in diatoms. **Progress In Organic Coatings**, San Diego, n. 47, p.256-266, 2003.

HOEK, C. V. D.; MANN, D. G.; JAHNS, H. M. **Algae: An introduction to phycology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. 623 p.

HU, Q. Environmental Effects on Cell Composition. In: **Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology** (Richmond, A., ed.). Oxford: Blackwell Science, 2004. 83-93 p.

MARKL, H. Modelling of algal production system. In: *Algae biomass-production and use*. Shelf, G. and Soeder, C. J. (eds.). Elsevier/ North. **Holland Biomedical Press**, 1980. 361-384.

MENG, X. et al. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, Qingdao, p. 1-5. 10 jul. 2009.

MORALES, J. **Acuicultura Marina Animal**. Editora Mundi-Prensa. Espanha, 1983. 628p.

NYBAKKEN, J. W. **Marine Biology: An Ecological Approach**. 3ed. HarperCollins College Publisher, Nova York, 1993. 462p.

POISSON, L.; ERGAN, F. Docosahexaenoic acid ethyl esters from *Isochrysis galbana*. **Journal Of Biotechnology**, v. 91, p.75-81, 2001.

POLI, A.T.B.; GÁLVEZ, A.O.; OLIVEIRA, J.M. Produtividade aquática em aquicultura. Pp 73 – 92 em: Poli, C.R., Poli, A.T.B., Andreatta, E., Beltrame, E.organizadores. **Aquicultura,Experiências Brasileiras**. Multitarefa Editora Ltda.Florianópolis.2004

POLI, C.R., VINATEA, L. Qualidade de água em aquicultura. Pp 45 – 72 em: Poli,C.R., Poli, A.T.B., Andreatta, E., Beltrame, E. organizadores. **Aquicultura,Experiências Brasileiras**. Multitarefa Editora Ltda. Florianópolis.2004

PONIS, E. et al. *Pavlova lutheri*: Production, preservation and use as food for *Crassostrea gigas* larvae. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 282, p.97-103, 12 jun. 2008.

PULZ, O; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology And Biotechnology**, Berlin, v. 65, p.635-648, 6 ago. 2004.

RAVEN, J. A. Limits to growth. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. (eds.) **Microalgal Biotechnology**, Cambridge: Cambridge University, 1988. p.331-356

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001. 906p.

RENAUD, S. M. et al. Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 211, p.195-214, 2002.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. **Limnologia Aplicada à Aqüicultura**. UNESP, Boletim Técnico 1, 1995. 70p.

SPOLAORE, Pauline et al. Commercial Applications of Microalgae. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, Paris, v. 101, n. 2, p.87-96, 2006.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 6 ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2001. 906p.

RICKLFS, Robert E. **A economia da natureza: Um livro-texto em ecologia básica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 470 p.

RICHMOND, A. (ed). **Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology**. Blackweel Science, Oxford, 2004. 566p

SOARES-GOMES, A.; FIGUEIREDO, A. G. O ambiente marinho. **In: Biologia Marinha** (Pereira R. C. & Soares-Gomes, A. eds). Interciência, Rio de Janeiro, 2002. 2-33p.

VALENZUELA-ESPINOZA, Enrique; MILLÁN-NÚÑEZ, Roberto; NÚÑEZ-CEBRERO, Filiberto. Protein, carbohydrate, lipid and chlorophyll content in *Isochrysis aff. galbana* (clone T-Iso) cultured with a low cost alternative to the f/2 medium. **Aquacultural Engineering**, v. 25, p.207-216, 2002.