

CULTIVO DA MICROALGA MARINHA *Chaetoceros calcitrans* (BACILLARIOPHYCEAE) UTILIZANDO DIFERENTES TIPOS DE ÁGUA MARINHA ARTIFICIAL

Marcelo Roberto Pereira SHEI¹; Oscar José Sallet BARRETO²; Talia Manceira BONFANTE³;
Gastão Cesar Cyrino BASTOS²

RESUMO

O aspecto mais importante do cultivo de microalgas se concentra na sua utilização como alimento para a grande variedade de organismos aquáticos cultivados. Diversas formulações comerciais estão disponíveis para o mercado do aquarismo marinho a fim de preparar água marinha artificial (AMA). O presente estudo comparou o desempenho do cultivo da microalga *Chaetoceros calcitrans* usando diferentes tipos (AMA) em comparação com a água marinha natural (AMN). Para isso utilizou-se Red Sea, Coralife e Oceanic, três diferentes marcas de AMA e AMN como controle. Os quatro ensaios tiveram cinco réplicas com 400 mL, em mesmas condições, enriquecidas com meio Conwy e mesma densidade algal inicial. Cultivos sem aeração de 400 mL cresceram com cinco réplicas cada sob condições definidas. Todos os cultivos começaram com um inoculo algal de 208.000 cels./ mL. Uma alíquota de 5 mL foi retirado diariamente de cada cultura para contagem de células. Dados obtidos através do teste estatístico de regressão polinomial demonstraram que todas as marcas de AMA alcançaram densidade algal superior que a cultura com AMN, no entanto as três marcas de AMA foram significativamente heterogêneas. *C. calcitrans* cultivadas com as marcas Oceanic e Red Sea demonstraram taxas de crescimento similar e superiores a Coralife. Tendo em vista os resultados obtidos, podemos concluir que as misturas de AMA testadas podem ser usadas para o cultivo dessa espécie de microalga.

Palavras-chave: *Chaetoceros calcitrans*, água marinha artificial, água marinha natural, cultivo de microalgas, aquícultura.

CULTIVE OF THE MARINE MICROALGAE *Chaetoceros calcitrans* (BACILLARIOPHYCEAE) USING DIFFERENTS BRANDS OF ARTIFICIAL MARINE SALT WATER

ABSTRACT

The use of microalgae as live food to a wide variety of organisms is one of the most important aspects in aquaculture. Several commercial formulations have been available in the marine aquarium market in order to prepare artificial sea water (ASW). The present study accounted microalgae *Chaetoceros calcitrans* performance cultured using different ASW in comparison to natural seawater(NSW). It was carried out using Red Sea, Coralife and Oceanic, three different ASW brands and NSW as control. Nonaerated cultures were grew in 400 mL with Conwy culture medium with five replicates each under defined conditions. All cultures began with an algal inoculum of 208.000 cells/mL. A 5-mL aliquot was removed daily from each culture for cells counts. Data obtained using polynomial regression test demonstrated that all ASW brands reached higher algal density rates than the one with NSW, though the three ASW brands were significantly heterogeneous. *C. calcitrans* raised with Oceanic and Red Sea brands showed similar growth rates and both were higher than Coralife brand. The results suggest that all three ASW brands studied can be used in the culture of this microalgae specie.

Key words: *Chaetoceros calcitrans*; artificial seawater; natural seawater, microalgae culture; aquaculture

Nota Científica: Recebida em 12/11/2007 - Aprovada em 23/03/2009

¹ Laboratório de Maricultura - Universidade Federal do Rio Grande, Caixa postal 474. Rio Grande, RS.
E-mail: marceloshei@gmail.com

² Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Pescado Marinho (CAPTAPM) - Instituto de Pesca - APTA - SAA, SP. Av. Bartolomeu de Gusmão, 192 - 11030-906 Santos, SP.

³ Universidade de São Paulo. Av. Bandeirantes 3900, Monte Alegre - 14040-900 Ribeirão Preto, SP

INTRODUÇÃO

O aspecto mais importante do cultivo de microalgas concentra-se na sua utilização como alimento para uma grande variedade de organismos aquáticos cultivados em nível comercial ou experimental (HOFF e SNELL, 1989; MARCHIORI, 1996; BARBIERI e OSTRENSKY, 2001; MAXIMIANO *et al.*, 2002). A espécie *C. calcitrans* é amplamente utilizada na alimentação de larvas de crustáceos marinhos e moluscos bivalves (HOFF e SNELL, 1989; GRAHAM and LEE, 2000; MULLER, 2000; BROWN, 2002; TAVARES e ROCHA, 2003; AGH and SORGELOOS, 2005; SOARES *et al.*, 2006; KRICHNAVARUK *et al.*, 2007; RIVERO-RODRIGUES *et al.*, 2007).

SILVA (1995) relatou que problemas ambientais ligados a poluição e a variação de salinidade nas regiões litorâneas podem prejudicar seriamente a qualidade da água utilizada nos cultivos e reduzir drasticamente a produtividade. Para tentar resolver esses problemas e a entrada de contaminantes, várias fórmulas utilizando sais artificiais já foram elaboradas para substituírem o uso da água marinha

natural (AMN) por uma água marinha artificial (AMA) (WALNE, 1979).

Visto a possibilidade do uso de misturas de sais artificiais por instituições que se localizam em locais afastados de áreas litorâneas ou em situações de emergência nos laboratórios de cultivo de microalgas, este estudo objetivou acompanhar o desenvolvimento da cultura da microalga diatomácea *C. calcitrans*, utilizando três marcas de misturas de sais artificiais, constando a existência de diferenças nas densidades celulares entre as culturas com as diversas marcas de AMA e comparar o custo de preparação entre os sais utilizados.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Maricultura do Instituto de Pesca, Santos/SP (LaMIP-Santos) no mês de julho de 2005. As cepas da microalga *C. calcitrans* foram mantidas sob temperatura de 21°C. A iluminação foi mantida por seis lâmpadas fluorescentes tubulares tipo luz do dia, que emitiram 2.600 lux, com fotoperíodo de 12C: 12E. A Tabela 1 apresenta o meio de cultura utilizado no cultivo e a solução de silicato e vitaminas.

Tabela 1. Composição do Meio Conwy descrito por WALNE (1979), modificado

ELEMENTO	QUANTIDADE
SOLUÇÃO PRINCIPAL	
Na ₂ EDTA	45,0 g
NaNO ₃	100,0 g
H ₃ BO ₃	33,6 g
Na ₂ HPO ₄	20,0 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,36 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	1,3 g
Água Destilada	1.000,0 mL
Solução Traços	1,0 mL
<i>Observação: Utilização - 1,0 mL/L</i>	
SOLUÇÃO DE TRAÇOS	
ZnCl ₂	2,1 g
CaCl ₂	2,0 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,9 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	2,0 g
Água destilada	100 mL
<i>Observação: Adicionar 4mL de HCl para dissolução de sais</i>	
<i>Observação: Utilização 0,1mL/L</i>	
SOLUÇÃO DE SILICATOS	
Na ₂ SiO ₄ .5H ₂ O	4,0 mg
Água Destilada (uso restrito às diatomáceas)	100 mL
<i>Observação: Utilização 1,0 mL/L</i>	

Preparação da cultura

Uma cepa de *C. calcitrans* contendo 125 mL de AMN enriquecida com meio Conwy foi repicada em intervalos regulares de 7 dias, de modo a obter maior densidade de células por mililitros e maiores volumes até chegar a alcançar 5.000 mL. Após isso, a cultura foi mantida em constante movimentação, através de suprimento de ar, alcançando em cinco dias a densidade de 2.083.000 céls./mL. O método de estimativa de densidade de células utilizado foi a contagem em câmara de Neubauer.

Preparação das águas natural e artificial

A água marinha natural (AMN) com salinidade 31 foi coletada da Baía de Santos (23°59,5'S / 46°18,5'W) e filtrada por filtros de cartucho plissado entre 500 e 5 µm antes de ser conduzida para o laboratório. A água doce usada para a preparação da AMA foi tratada em um deionizador de 5 etapas com resinas Purolite com condutividade de 0,03 µs/cm.

As marcas de misturas de sais para preparação da água marinha artificial (AMA) utilizadas para o experimento foram: Red Sea (Israel), Coralife (EUA) e Oceanic (EUA). Todas selecionadas pela facilidade de serem adquiridas em lojas de aquarismo.

Delineamento experimental

Os sais foram dissolvidos em recipientes com 5.000 mL de água doce deionizada de modo a atingir salinidade 31, estabelecendo 4 tratamentos: T1 = Red Sea, T2 = Coralife, T3 = Oceanic e T4 = água marinha natural. O pH das 4 soluções foi medido através de um pHmetro digital Digimed.

O experimento foi realizado em erlenmeyers de vidro translúcido de 500 mL previamente esterilizados em autoclave. Os tratamentos foram distribuídos em 5 réplicas, totalizando 20 unidades experimentais (UE). Utilizando 40 mL da cultura matriz iniciou-se cada UE com densidade inicial de $20,8 \times 10^4$ céls./mL. Os volumes foram acrescidos com 360 mL de água dos respectivos tratamentos, totalizando um volume de 400 mL de água marinha (natural ou artificial). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

Acompanhamento do desenvolvimento

Para a avaliação do desenvolvimento das culturas dos 4 tratamentos foram feitas contagens, a partir de 48 horas após a inoculação das culturas. O experimento foi finalizado no 12º dia de desenvolvimento da cultura, perfazendo 10 dias de contagens. As curvas de velocidade de crescimento foram calculadas como

proposto por FABREGAS *et al.* (1989).

Análise de dados

Foram calculadas as médias das contagens diárias das algas em cada uma das cinco réplicas nos 4 tratamentos analisados. Estas médias foram plotadas em diagramas de dispersão utilizando o dia da contagem como variável independente (abscissa) e ajustadas à equação linear, segundo o modelo: $y = a + bx$

Os coeficientes angulares das 4 linhas obtidas foram comparados através de análise de covariância para testar sua homogeneidade. Os 3 tratamentos utilizando as marcas de AMA foram comparados *a posteriori* com a AMN. A seguir, estes 3 tratamentos foram novamente comparados via análise de covariância, independentemente dos resultados da AMN.

Análise econômica

Para realizar a análise econômica entre os sais comerciais, foram consultados os valores das duas maiores embalagens nos distribuidores atacadistas de cada marca. Também foi calculado o custo para a preparação de cada litro de AMA nas diferentes marcas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Crescimento da densidade algal

As variações dos crescimentos das densidades das culturas de *C. calcitrans* submetidas aos 4 tratamentos estão representadas na Figura 1. Há uma consistente fase de crescimento exponencial para as culturas desenvolvidas com os sais das marcas Oceanic e Red Sea. No entanto, as culturas de *C. calcitrans* sob AMA Red Sea alcançaram a fase estável no 5º dia de cultivo, enquanto que naquelas cultivadas com AMA Oceanic a fase estável apareceu após o 9º dia. Observa-se uma similaridade nas curvas de crescimento da densidade algal do Tratamento recebendo AMA Coralife e do Tratamento com AMN, entretanto as microalgas cultivadas com AMA Coralife mostraram melhor desempenho.

As taxas de velocidade de crescimento das culturas, demonstradas na Figura 2, confirmaram o melhor desempenho das microalgas desenvolvidas com os sais Oceanic e Red Sea.

Conforme a finalidade dos cultivos pode-se utilizar condições específicas predeterminadas. Entretanto, na produção de microalgas para alimento de organismos cultivados em produções comerciais, devem-se proporcionar condições que permitam

a otimização e o rápido crescimento da espécie cultivada. (MARCHIORI, 1996; LEE, 2000).

Análise de dados

Os ajustes dos 4 tratamentos analisados à equação linear resultaram nas equações abaixo:

Oceanic: $y = 300100 + 614900 x$; $r = 0,93$ ($p < 0,0001$)

Red sea: $y = 1087000 + 529800 x$; $r = 0,89$ ($p < 0,0001$)

Coralife: $y = 949000 + 350700 x$; $r = 0,94$ ($p < 0,0001$)

Natural: $y = 124300 + 155900 x$; $r = 0,99$ ($p < 0,0001$)

A comparação dos coeficientes angulares das 4 linhas acima resultou que elas não são homogêneas ($p < 0.0001$). As comparações realizadas *a posteriori* entre as três marcas de AMA analisadas e a AMN resultaram que todas apresentam desenvolvimento significativamente maior que o constatado em água marinha natural (Oceanic: $p < 0.0001$; Red Sea: $p = 0.0003$; Coralife: $p = 0.00016$).

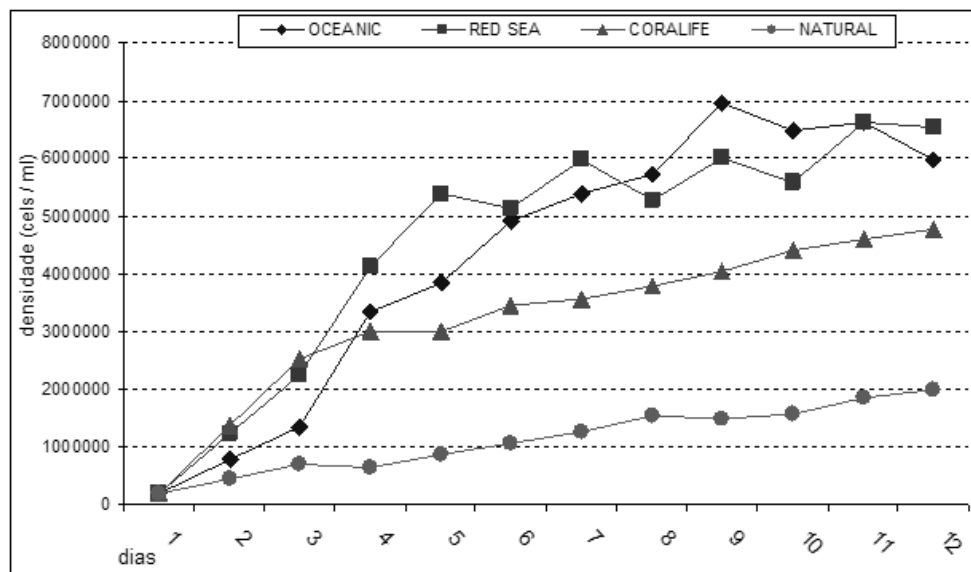


Figura 1. Densidades celulares médias das culturas dos 4 tratamentos durante o experimento

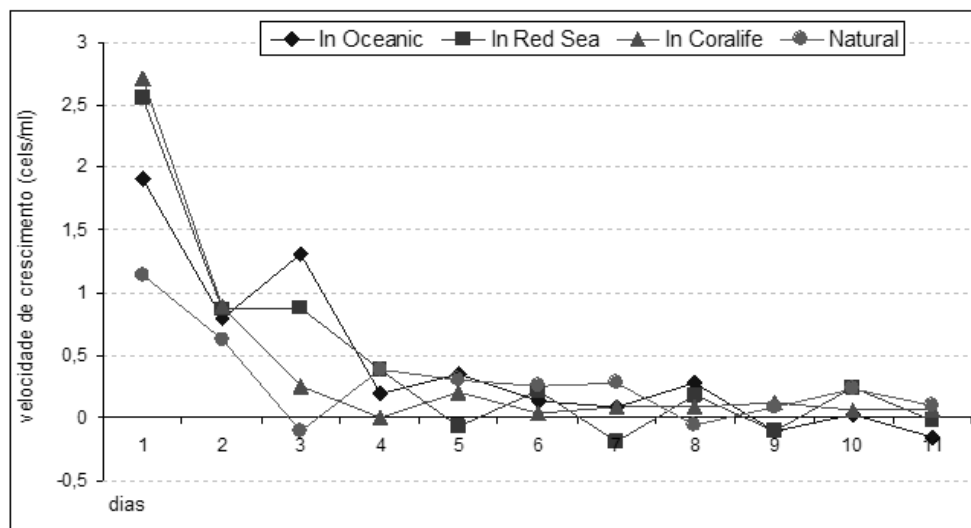


Figura 2. Velocidade média de crescimento celular dos 4 tratamentos durante o experimento

A comparação dos coeficientes angulares das linhas referentes as 3 marcas de AMA resultou que elas são significativamente heterogêneas ($p = 0,0372$). As comparações realizadas *a posteriori* entre elas resultaram que as marcas de AMA Oceanic e Red Sea não apresentam desenvolvimentos significativamente

diferentes no período considerado e que ambas apresentam desenvolvimentos significativamente superiores à AMA da marca Coralife. Os níveis de significância dessas comparações estão descritos na Tabela 2.

As diferenças de pH encontradas entre os trata-

mentos (Figura 3) pode ser um dos fatores causadores da diferença entre o crescimento das culturas. Principalmente no tratamento com a marca Coralife, que obteve o pH mais alto, 8,6. Talvez se houvesse uma diminuição do pH desse tratamento, a densidade algal alcançada teria sido maior.

Tabela 2. Níveis de significância das comparações *a posteriori* entre os parâmetros das regressões lineares das 3 marcas de AMA analisadas.

Valores de p	Oceanic		Red Sea	
	A	B	A	B
Red Sea	0,5562	0,4660	---	---
Coralife	---	0,0065	0,0012	0,0731

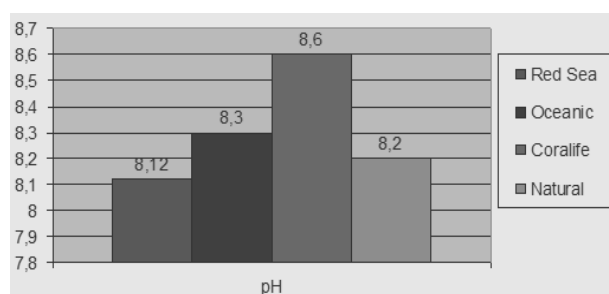


Figura 3. Níveis de pH encontrados nas diferentes soluções

Apesar de *C. calcitrans* cultivadas com AMA Oceanic ter apresentado a melhor taxa de densidade algal entre os tratamentos, as culturas cultivadas com AMA Red Sea mostraram o melhor desempenho em curto espaço de tempo, alcançando uma boa taxa de desenvolvimento celular no 5º dia de cultivo. Considerando que o índice de rendimento da biomassa de uma cultura é intrinsecamente relativo ao tempo de cultivo (SANTOS, 1978), pode-se sugerir que AMA Red Sea promoveu o melhor crescimento de culturas de *C. calcitrans* em comparação com os demais tratamentos.

Análise econômica. Os sais para aquariorfilia são usados na proporção aproximada de 1 Kg

para cada 30 L. de água doce a 25 °C (DAKIN and SPRUNG, 1992). Na Tabela 3 constam os valores encontrados para AMA comerciais, fornecidas pelos distribuidores atacadistas das marcas utilizadas no experimento.

Uma vantagem estaria na formulação de misturas específicas para alguns tipos de algas para a obtenção de maior eficiência na produção e a menor risco de contaminação das culturas provenientes do ambiente natural. O uso de AMA reduz a necessidade da captação de água no mar, esterilização e armazenamento de grandes volumes, otimizando processo produtivo, podendo servir de suporte a laboratórios em situações de emergência ou até mesmo viabilizar a maricultura em sistemas de recirculação em regiões afastadas do litoral. As desvantagens da utilização de sais comerciais em uma produção estariam na possível alteração dos ingredientes ou preços por parte dos fabricantes, alteração da taxa de câmbio e no custo de preparação.

Além das formulações comerciais de AMA para a aquariorfilia, também já foram desenvolvidas outras formulações mais simples, usando somente os macronutrientes. Apesar de alguns autores já terem utilizado esses tipos de formulações para o cultivo de microalgas, tais formulações não são muito interessantes, porque as algas retiram a totalidade de seus nutrientes do meio de cultivo (GUILLARD, 1975; HOFF e SNELL, 1989; SILVA, 1995). As diferenças de pH encontradas entre as misturas pode possivelmente refletir diferenças na composição química de cada mistura, o que explicaria o crescimento heterogêneo das culturas de microalgas.

Com os valores das três marcas de misturas para AMA e os dados das análises das diferenças nas densidades algais obtidas no experimento, pode-se afirmar que entre as três marcas testadas, o sal Red Sea é o que apresentou o melhor custo para o cultivo de *C. calcitrans*.

Tabela 3. Tamanho das embalagens e os valores em dólares dos sais utilizados no experimento

Marca	Embalagem kg	Valor unitário	Valor por kg	Valor para cada litro de solução
Coralife Marine Salt	19,8	U\$51,78	U\$2,615	U\$0,087
Coralife Marine Salt	39,6	U\$93,29	U\$2,356	U\$0,079
Red Sea Salt	25	U\$58,79	U\$2,352	U\$0,078
Red Sea Salt	39,9	U\$86,1	U\$2,158	U\$0,072
Oceanic Salt	11	U\$28,61	U\$2,600	U\$0,086
Oceanic Salt	23	U\$60,29	U\$2,621	U\$0,087

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem que é possível realizar o cultivo da microalga *C. calcitrans* usando as marcas de sais testadas como substituto da água marinha natural. As três marcas testadas nesse experimento obtiveram densidades algais significativamente superiores ao ensaio usando água marinha natural.

No entanto, as marcas Oceanic e a Red Sea alcançaram os melhores resultados, não havendo diferença significativa entre elas. Dentre as três marcas, nas condições mantidas a Red Sea foi a que apresentou o menor custo para o cultivo da microalga *C. calcitrans*.

Mas devem-se realizar testes com outras marcas não usadas neste experimento e formulações não comerciais para o cultivo de microalgas e outros organismos utilizados regularmente na maricultura.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos às biólogas Priscilla Vasques e Melissa Moreira e a oceanógrafa Caroline L. Soares pela ajuda no desenvolvimento desse estudo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AGH, N. SORGELOOS P. 2005 *Handbook of protocols and guidelines for culture and enrichment of live food for use in larviculture*. Iran: Urmia University. *Artemia & aquatic animals research center*. 60 p. Disponível em: http://www.urmia.ac.ir/PubFiles/203140_handbook%20final.pdf. Acesso em: 18 de julho de 2005.
- BARBIERI, R. C. J e OSTRENKY A. N. 2001 *Camarões Marinhos, reprodução, maturação e larvicultura*. Viçosa, MG: Aprenda Fácil Editora. 243p.
- BROWN, M. R. Nutritional Value of Microalgae for Aquaculture. 2002 In: CRUZ-SUAREZ, L. E.; RICQUE, M. E.; TAPIA, S. M.; GAXIOLA, C. M. G.; SIMÕES, N. *Avances em Nutrición Acuicola VI; Memórias Del Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*; Cancun - México.
- DAKIN, N.; SPRUNG, J. 1992 *The book of the marine aquarium*. Blacksburg, USA: Tetra Press. 400p.
- FABREGAS, J.; ABALDE, J.; HERRERO, C. 1989 Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentrations as chloride, sulphate, nitrate and carbonate. *Aquaculture*, Amsterdam, 83: 289-304.
- GRAHAM, L. E.; LEE, W. W. 2000 *Algae*. 1ªed. Upper Saddle River USA: Prentice-Hall. 640p.
- GUILLARD, R. R. L. 1975 Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates, In: SMITH, W, L, & CHANLEY, M, H; *Culture of marine invertebrate animals*, New York: Plenum Press, p 26-60.
- HOFF, F. H.; SNELL, T. W. 1989 2º ed. *Plankton Culture Manual*. Florida, USA: Florida Aqua Farms. 126 p.
- KRICHNAVARUK, S.; POWTONGSOOK, S.; PAVASANT, P. 2007 Enhanced productivity of *Chaetoceros calcitrans* in airlift photobioreactors. *Bioresource Technology*, 98: 2123-2130.
- LEE, R. E. 1999 *Phycology*; 3ªed. United Kingdom: Cambridge University Press. 614 p.
- MARCHIORI, M. A. 1996 *Guia ilustrado de maturação e larvicultura do camarão rosa *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967*. Rio Grande: Ed Furg, 79p.
- MAXIMIANO, N.; LORDEIROS, C.; DONATO, M.; GRAZIANI, C. 2002 Evaluation of microalgae diets for *Litopenaeus vannamei* larvae using a simple protocol. *Aquaculture International*, Netherlands. 10: 177-187.
- MULLER, F. A. 2000 The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of applied phycology*; 12: 527-534.
- RIVERO-RODRIGUES, S.; BEAMOUNT, A. R.; LORA-VILCHIS, M. C. 2007 The effect of microalgal diets on growth, biochemical composition, and fatty acid profile of *Crassostrea corteziensis* (Hertlein) juveniles. *Aquaculture*, Amsterdam. 263: 199-210.
- SANTOS, E. P. 1978 *Dinâmica de populações aplicada à pesca e piscicultura*. Universidade de São Paulo: HUCITEC, Universidade de São Paulo. 129p.
- SILVA, C. A. 1994 *Utilização de água do mar artificial em larvicultura de *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) (CRUSTACEA, PALEMONIDAE)*. Jaboticabal 130p.(Dissertação de Mestrado. Centro de Aqüicultura da UNESP).
- SOARES, R.; PEIXOTO, S.; WASIELESKY, W.;

- D'INCAO, F. 2006 Effect of different food items on the survival and growth of *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez-Farfante 1967) postlarvae. *Aquaculture Research*; 37: 1413 - 1418.
- TAVARES, L. H S.; ROCHA, O. 2003 *Produção de Plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para Alimentação de Organismos Aquáticos*. São Carlos: Rima. 106 p.
- WALNE, P, R. 1979 *Culture of Bivalve Molluscs: 50 years experience at Conwy*. 2th Londres: The Whitefriars Press Ltd. 189p.