

ISOLAMENTO E CRESCIMENTO DE UMA MICROALGA  
MARINHA EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURA

RAIMUNDO ADERSON LOBÃO DE SOUZA

Orientador: Prof. Edegar Roberto Andreatta, MSc

Monografia apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do nível de Especialização em "lato sensu".

Florianópolis  
Santa Catarina-Brasil  
1988

S729 SOUZA, Raimundo Aderson Lobão de. Isolamento e crescimento de uma microalga marinha em diferentes meios de cultura. Florianópolis, UFSC-CCA, 1988. 08 p. /Tese/

Bibliografia

1. Microalga marinha. 2. Isolamento. 3. Crescimento. 4. Cultura. I. Centro de Ciências Agrárias-UFSC.

CDU 615.372

## AGRADECIMENTOS

A ANTONIO CARLOS ALBERIO, Diretor da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, pelo apoio e empenho concedidos, um agradecimento especial.

Ao Professor EDEMAR ROBERTO ANDREATTA, MSc, pela orientação e amizade durante e após o Curso.

A ISRAEL DINIZ DA SILVA, Biólogo - Especialista em algas da Universidade Federal de Santa Catarina, pela co-orientação e paciência na montagem do experimento, minha gratidão.

A VIRGÍLIO FERREIRA LIBONATI, Professor Titular da Cadeira de Estatística da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, pela valiosa orientação estatística.

A WILLIAM LESLIE OVERAL, pela revisão do texto em inglês.

A RAIMUNDO PARENTE DE OLIVEIRA E RESEMARY MORAES FERREIRA VIEGAS, Pesquisadores Estatísticos da EMBRAPA-CPATU, pelos cálculos no microcomputador.

A Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, pelo suporte necessário durante o Curso.

Ao Departamento de Aqüicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, pelo apoio na condução do experimento.

Aos Professores da Universidade Federal de Santa Catarina, especialmente JOÃO BOSCO ROSAS RODRIGUES, CARLOS ROGERIO POLI, AIMÊ RAQUEL MAGALHÃES, MAURICIO SEDREZ DOS REIS, ZEFERINO PEDRO SACHET, SANTO ZACARIAS GOMES E NELSON SILVEIRA, pelos incentivos sinceros durante o Curso.

A ANTONIO PEDRO SCHLINDWEIN E PAULO NASCIMENTO, pelas orientações como mestre e educador.

Aos Técnicos de Laboratório da Larvicultura da Barra da Lagoa, pelas horas de labor.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Na Lagoa da Conceição (SC)-Brasil, foi isolada uma microalga autóctone, identificada como Nitzschia sp. e testado o seu cultivo em Laboratório com vários meios de cultura codificados de "A", "B", "C" e "D", para ser aproveitado na alimentação de camarões. Sendo o meio de cultura "A" o mais viável economicamente, com as algas atingindo um crescimento na fase exponencial (8<sup>o</sup> dia) de  $6183,33 \times 10^4$  cel/ml. O meio mais fraco foi o "B" com um crescimento na fase exponencial de  $1883,33 \times 10^4$  cel/ml.

## SUMÁRIO

	<u>Pag.</u>
01. INTRODUÇÃO .....	01
02. JUSTIFICATIVA .....	01
03. OBJETIVOS .....	01
3.1. Gerais .....	01
3.2. Específicos .....	02
04. MATERIAIS E MÉTODOS .....	02
4.1. Área de Coleta .....	02
4.2. Local de Estudo .....	02
4.3. Coleta e Tratamento da Amostra .....	02
4.4. Câmara de Cultivo Experimental .....	03
05. RESULTADOS .....	04
5.1. O Isolamento da Microalga .....	04
5.2. Classificação da Microalga .....	04
5.3. Análise Estatística .....	04
06. DISCUSSÕES .....	05
07. CONCLUSÕES .....	06
08. RECOMENDAÇÕES .....	06
09. ABSTRACT .....	06
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	07
ANEXOS .....	09

microalgas pertencente ao ultraplâncton, de interesse para isolamento. Em seguida colocada 2.500ml em dois erlenmeyers contendo 0,2ml do complexo vitamínico B; 2,5ml de meio Conway, que é um meio de cultura bastante nutritivo, e num frasco foi adicionado 4,5ml de  $\text{NaSiO}_2$  para provocar o "blom" das diatomáceas. Observado o crescimento no frasco contendo sílica, foi desprezado o outro.

No início da purificação foram evidentes a proliferação das algas: Nitzschia, Skeletonema, Thalassosila e Navicula. Onde foi efetuado o isolamento da Nitzschia através de sucessivas repiçagens, segundo VIEIRA (1977), que pela sua formação em colônia parecia melhor adaptada assim como poderia ser testada num futuro bem próximo na alimentação das larvas dos camarões.

#### 4.4. Câmara de Cultivo Experimental:

O experimento desenvolvem-se num "Stand" totalmente fechado com temperatura ambiente de  $29^{\circ}\text{C}$  variando de  $\pm 1^{\circ}\text{C}$  e contendo quatro lâmpadas fluorescentes de 40w.

Foram testados quatro meios de cultura, e cujos os componentes se encontram na Tabela 1, os quais foram codificados de A, B, C e D, com três repetições para cada tratamento. Sendo estes sorteados a sua posição na câmara asséptica (Fig. 2).

O cultivo iniciou com um volume de 800ml do meio específico em balões de 1000ml, com aerização constante em inóculo de  $1.990 \times 10^4$  ml a um volume de 5ml, e concentração inicial de  $16 \times 10^4$  cel./ml. Durante 10 dias a cada 16:45 horas, foram retiradas 1ml de cada balão para serem efetuadas as contagens em câmara de Neubauer sob microscópio óptico binocular modelo Olympus BH-2.

As concentrações elevadas de algas foram diluídas de 1:10 para facilitar a contagem.

O modelo estatístico utilizado foi o Delineamento completamente casualizado com uma transformação de dados segundo a expressão  $\sqrt{n^{\circ} \text{ algas} + 0,5}$  e uma análise de variância do dia em que a fase exponencial foi alcançada segundo YONESHIGUE e RODRIGUES (1975), e acrescentado de um teste de comparação de médias, dada pelo teste de DUNCAN, a um nível de 5% de probabilidade.

Os dados foram submetidos ao programa Software Científico-SC, desenvolvido pelo núcleo tecnológico para informática agropecuária/EMBRAPA.

## 05. RESULTADOS

### 5.1. O Isolamento da Microalga:

O isolamento da Nitzschia sp. foi obtido 73 dias após a coleta, e que mediante o semeio em meio líquido de Conway com  $\text{NaSiO}_2$  mostrou um crescimento de  $71 \times 10^4$ , depois de três dias.

### 5.2. Classificação da Microalga:

A posição sistemática da microalga foi baseada em GOLA et alli (1965) e SCHULTZ (1968).

- Classe: Diatomaea (Bacillariophyta)
- Subclasse: Pennales
- Ordem: Biraphidales
- Família: Nitzschiaceae
- Gênero: Nitzschia
- Espécie: Nitzschia sp.

### 5.3. Análise Estatística:

A Figura 3 mostra o crescimento médio de Nitzschia sp. em diferentes meios de cultura, onde o pico de cultura foi o 8º dia para todos os meios. Observando-se que para o meio de código "A" o pico máximo foi de  $6183,33 \times 10^4$  cel/ml, para "B"  $1883,33 \times 10^4$  cel/ml, "C"  $3083,33 \times 10^4$  cel/ml, e "D"  $6400 \times 10^4$  cel/ml. Verifica-se assim que a média de maior crescimento foi do meio "D" e o menor crescimento foi do meio "B". No 9º dia iniciou-se a queda, sendo que este declínio foi mais suave no meio "B", caracterizando-se mais por uma fase estacionária, o que não ocorreu nos outros meios.

Na análise de variância para o número de algas transformadas (Tabela 2) do 8º dia, que é a fase exponencial. Foi observado que F foi significativo a um nível de probabilidade de 5%, e o desvio padrão de 13,66, com o coeficiente de variação atingindo 21,54%, que está em torno da média.

As médias de número de células por tratamento, foi de  $6183,33 \times 10^4$ /ml,  $1883,33 \times 10^4$ /ml,  $6400 \times 10^4$ /ml, e cujas transformações foram;  $78,33 \times 10^4$ /ml,  $42,10 \times 10^4$ /ml,  $55,09 \times 10^4$ /ml,

$78,16 \times 10^4$ /ml, para os respectivos meios de cultura "A", "B", "C" e "D".

Na Tabela 3, mostra o Teste Duncan na fase exponencial (8º dia), onde evidencia que, os meios "A", "D" e "C" não apresentam diferenças estatisticamente significativas a 5% de probabilidade. Sendo que o "A" e o "D" são praticamente idênticos estatisticamente, e o "C" mantendo estreita relação que "A", "D" e "B". Considerando-se assim o meio "B" como o pior entre eles.

## 06. DISCUSSÕES

O pico de crescimento médio de Nitzschia sp. nos diferentes meios (Fig. 3) foi obtido com 8 dias, é provável que tenha ocorrido a elevação de temperatura do meio externo e que tenha interferido em todos os meios de cultura através da aerização.

GERLOFF et alli (1950), encontrou o crescimento máximo mais rápido entre 10-12 dias. Já, RODRIGUES & YONESHIQUE-BRAGA (1977), encontrou para as diatomáceas o pico máximo, entre o 3º a 13º dias.

A fase estacionária geralmente observada nos cultivos de lagas não foi evidenciado no experimento, com excessão do meio de cultura "B", que não apresentou uma fase exponencial bem evidente, caracterizando mais como estacionária no 8º dia, ao contrário do que YAMASHITA e MAGALHÃES (1984), que identificaram no cultivo de Tetraselmis chui, as quatro fases; de indução, exponencial, estacionária e queda bem evidentes, citando inclusive o 10º dia como o pico de cultura. As mesmas fases foram encontrados por KAIN & FOGG (1960), em experimentos com fitoplâncton marinho.

Era de se presumir que o meio "D" fosse melhor que todos pois é um meio bastante enriquecido. Entretanto, o Teste de Duncan mostrou que o meio "A" não difere de "D" estatisticamente e nem de "C". Presume-se assim que seja o mais viável economicamente. O meio "C" é uma outra alternativa, embora haja certa restrição, já que existe pouca diferença do "A" e entre meio "B".

O crescimento médio na fase exponencial dado pelo meio "A" de  $6183,33 \times 10^4$ /ml foi semelhante ao encontrado por YAMASHITA e MAGALHÃES (1984) testando com Chaetoceros gracilis. Um baixo crescimento verificado no meio de cultura "B" poderá ser não necessariamente da quantidade de nutrientes, como cita FABREGAS et alli



(1984), mas em função do pH e do  $\text{CO}_2$  do meio.

#### 07. CONCLUSÕES

- O isolamento da microalga foi obtido 73 dias após a coleta.
- A microalga isolada é uma diatomácea (Bacillarisphyta) do gênero Nitzschia.
- Respeitando-se a baixa concentração inicial do inóculo, todos os meios atingiram a fase exponencial no 8º dia.
- O meio de cultura "A" foi considerado o melhor, considerando a sua economicidade, com um crescimento médio exponencial de  $6183,33 \times 10^4$  cel/ml.
- O meio de cultura "B" foi considerado o mais fraco, com um crescimento médio exponencial de  $1883,33 \times 10^4$  cel/ml.

#### 08. RECOMENDAÇÕES

- Que sejam dadas a continuidade nas pesquisas sobre a Nitzschia sp. em:
  - a) Concentração inicial do inóculo, ideal para cultivo;
  - b) Salinidade ideal para cultivo;
  - c) Cultivo massivo em containers;
  - d) Na alimentação de larvas de camarão;
  - e) Na alimentação de ostras e mitilídeos.

#### 09. ABSTRACT

The unicellular alga Nitzschia sp. was isolated from cultures taken from the Lagoa da Conceição, Santa Catarina-Brazil, and tested with different media, here referred to as "A", "B", "C" and "D", to determine growth curves of this which has the potential to serve as substrate for shrimp-farming. Culture medium "A" was seen to be the most economically viable, with the algae reaching a concentration of  $6183,33 \times 10^4$  cells/ml in the 8th day of exponential growth. The poorest medium was "B", with a corresponding concentration of  $1883,33 \times 10^4$  cells/ml in the 8th day.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOLD, H.C. & WYNNE, M.J. Introduction to the algae 1985. 720p.
- COLL-MORALES, J. Acuicultura marina animal. Ediciones Mundi Prensa. 1983. 670p.
- FABREGAS, J.; ABALDE, J.; HERRERO, C.; CABEZAS, B.; VEIGA, M. GROWTH of the marine microalga Tetraselmis suecica in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. Aquaculture, 42 (1984) 207-215.
- GERLOFF, G.C.; FITZGERALD, G.P.; SKOOG, F. the isolation, publication, and culture of Blue-green algae. American Journal of Botany, 37 (3):217-8, mar. 1950.
- GOLA, G.; NEGRE, G.; CAPPELLETTI, C. Tratato de Botânica Editorial Labor. 1965. 1160p.
- KAIN, J.M.; FOGG, G.E. Studies on the growth of marine phytoplankton. Journ. Mar. Biol. Assoc. U.K. (1960) 39, 33-50.
- RODRIGUES, E.G.; YONESHIGUE-BRAGA, Y.E. Estudos em laboratório do comportamento e crescimento do fitoplâncton introduzido e autóctone usando a água profunda como meio básico. (1977) Inst. Pesq. Mar. (RJ) publ. 104.
- SOEDER, C.J. Massive cultivation of microalgae: results and prospects. Hidrobiologia 72,197-209, (1980).
- SCHUTZ, A. Introdução ao estudo de Botânica Sistemática Editora Globo. Porto Alegre, 1968. 241p.
- VIEIRA, A.A.N. Métodos de cultura de algas do plâncton marinho: Estudos realizados nas regiões de Cananéia e de Ubatuba, SP. Bol. Inst. Oceanogr. São Paulo, 26:303-338. 1977.
- YAMASHITA, C.; MAGALHÃES, P.M.S. Meios de cultura para a alga Claetoceros gracilis. Boletim de Pesquisa n° 7 abril 1984. Natal. RN. Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte S/A. Vinculada à Secretaria da Agricultura.
- YAMASHITA, C.; MAGALHÃES, P.M.S. Métodos simples para o cultivo da alga Tetraselmis chuii. Boletim de Pesquisa n° 8 - abril. 1984. Natal. R.N. Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte S/A. Vinculada à Secretaria da Agricultura.

YONESHIGUE-BRAGA, Y.; RODRIGUES, E.G. Estudos preliminares do crescimento de Isochrysis galbana Parke usando água profunda como meio básico. 1975. Inst. Pesq. Mar. (RJ), Publi. 90:1-7.

A N E X O S

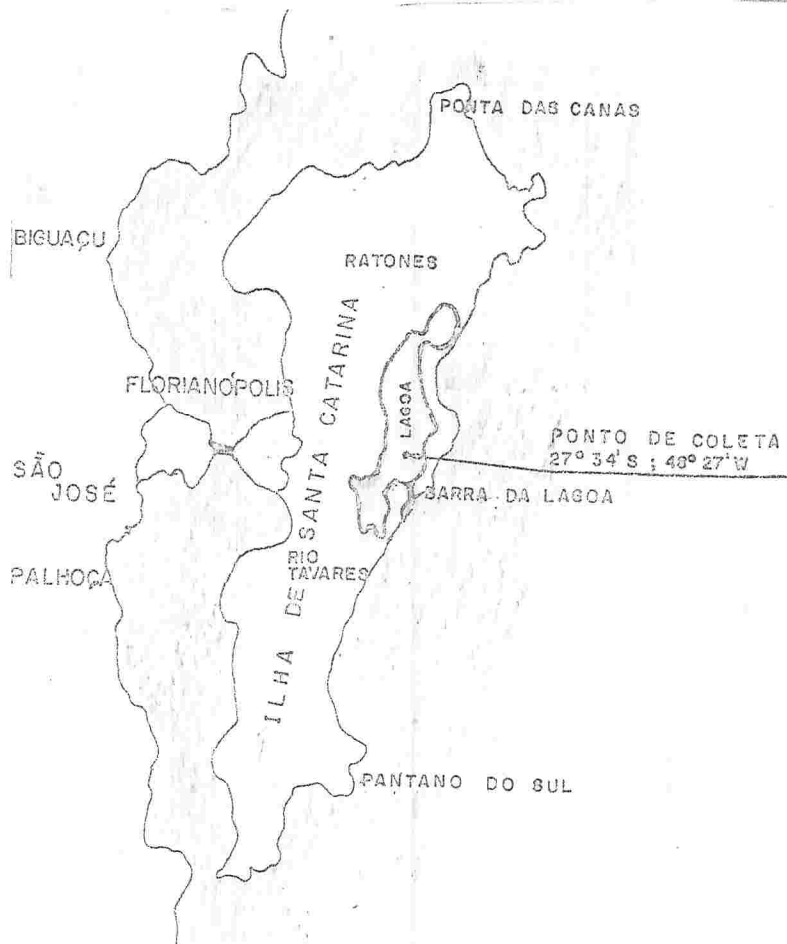
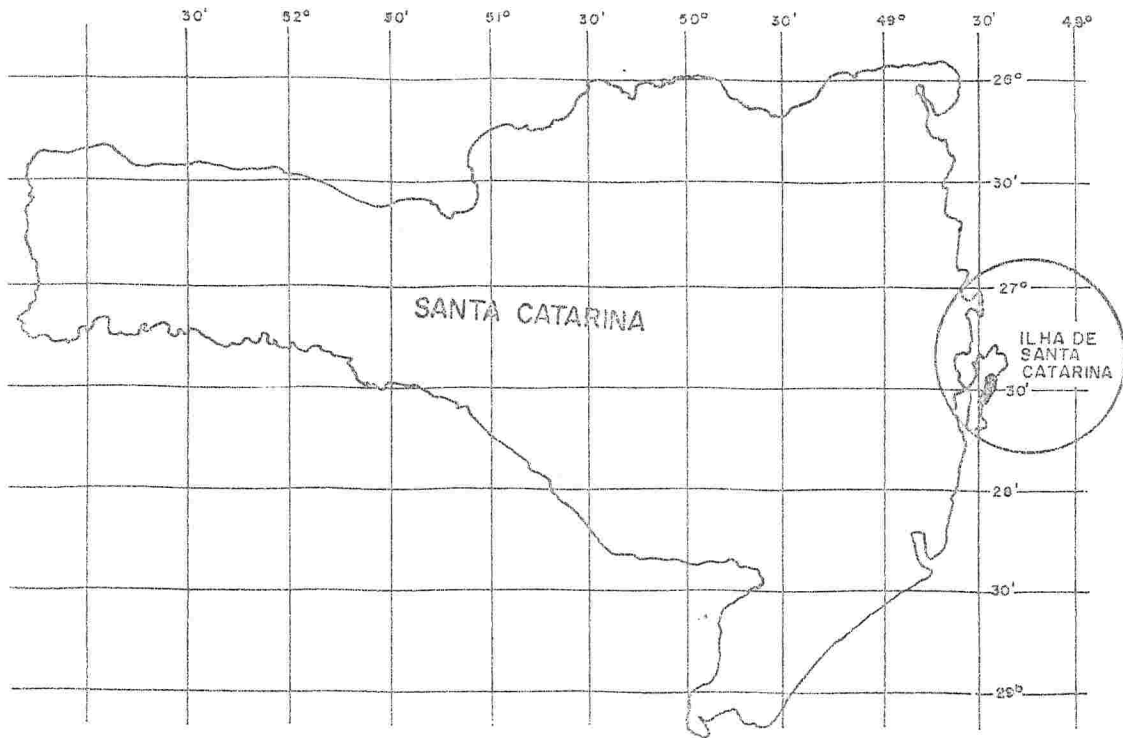


Fig 1- Localização do ponto de coleta na Lagoa da Conceição



Fig. 2 Disposição dos baldes contendo meio de cultura após o sorteio, no delineamento completamente casualizado.

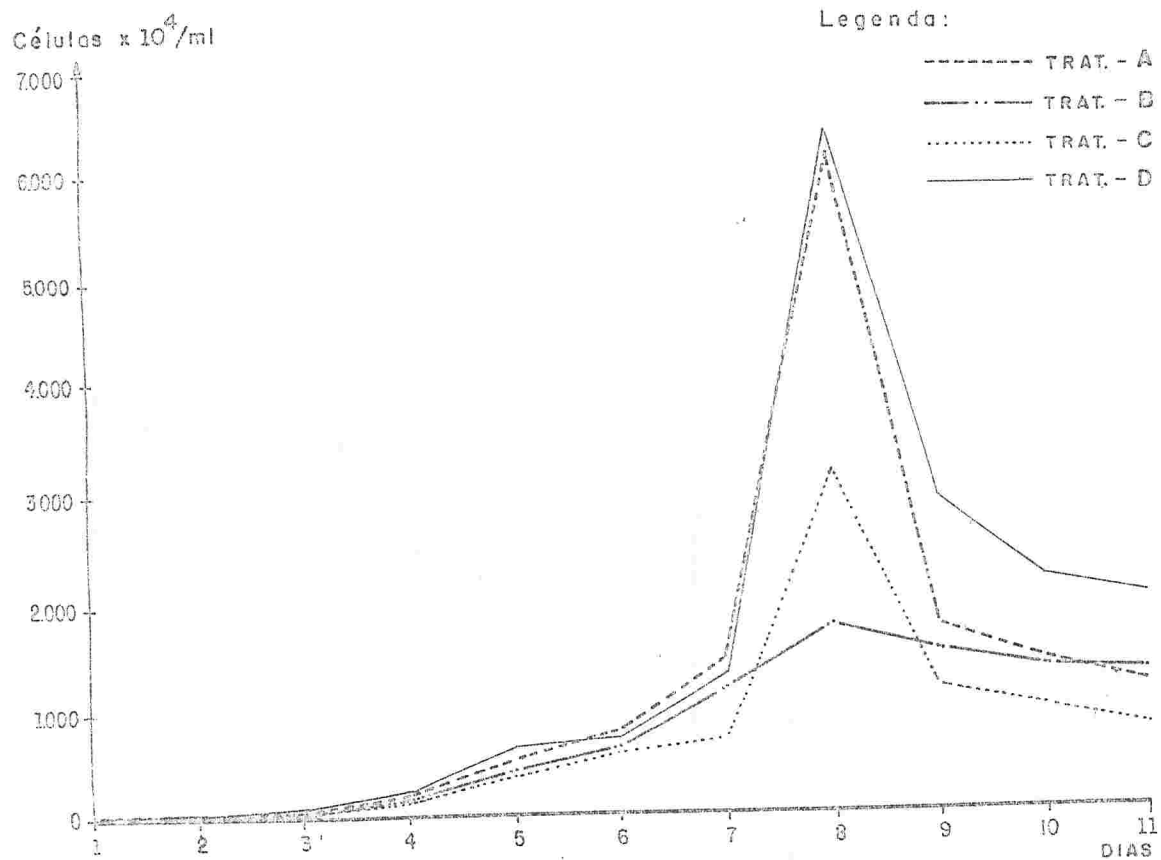


Fig. 3 Crescimento médio da *Nitzschia sp.* nos diferentes meios de cultura, A, B, C, D

TABELA 1. Os componentes com as devidas concentrações dos meios de cultura, A,B,C e D.

COMPONENTES	A	B	C	D
Na <sub>2</sub> EDTA				0.045 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>				0.0336 mg
NaNO <sub>3</sub>				0.1 mg
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O				0.02 mg
MnCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O				0.00036 mg
FeCl <sub>3</sub> , 6H <sub>2</sub> O	2 mg	1 mg	2 mg	0.0013 µg
ZnCl <sub>2</sub>				0.021 µg
CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O				0.02 µg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MO <sub>7</sub> O <sub>24</sub> , 4H <sub>2</sub> O				0.009 µg
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O				0.02 µg
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> , 9H <sub>2</sub> O	15 mg	7.5 mg	6 mg	80 µg
Tiamina				20 µg
Cianocobalamina				1 µg
EDTA			2 mg	
Ureia	60 mg	30 mg	18 mg	
Superfosfato triplo	30 mg	15 mg	8 mg	
H <sub>2</sub> O MAR	1.000 ml	1.000 ml	1.000 ml	1.000 ml
H <sub>2</sub> O destilada				1.000 ml



TABELA 3. Análise de variância para número de algas transformadas ( $\sqrt{n^\circ \text{ algas} + 0,5}$ ) no 8º dia

Fonte de Variação	g <sup>l</sup>	SOMA DOS QUADRADOS	QUADRADO MÉDIO	VALOR F	PR > F	
TRAT	3	2890.90550335	963.63516778			
RESÍDUO	8	1493.48838012	186.68604751	5.1618	0,028	
Total	11	4384.39388847				
Variável dependente		NAT (nº algas transformadas)				
Média		63.42423703				
Desvio padrão		13.66331027				
Coef. variação		21.54272705				
Variável	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo	Soma
			TRAT = A			
NUMALG	3	6183.33333	1353.08290	5100.00000	7700.00000	18550.00000
NAT	3	78.33411	8.44990	71.41778	87.75249	235.00233
			TRAT = B			
NUMALG	3	1883.33333	1183.56805	1200.00000	3250.00000	5650.00000
NAT	3	42.10321	12.91239	34.64823	57.01316	126.30962
			TRAT = C			
NUMALG	3	3083.33333	900.46284	2050.00000	3700.00000	9250.00000
NAT	3	55.09307	8.53702	45.28245	60.83174	165.27921
			TRAT = D			
NUMALG	3	6400.00000	3449.27529	3750.00000	10300.00000	19200.00000
NAT	3	78.16656	20.87421	61.24133	101.49138	234.49969

NUMALG = nº de algas

NAT = nº de algas transformadas

TABELA 3. Comparação entre médias do número de algas transformadas entre os meios de cultura na fase exponencial, pelo Teste de Duncan a 5% de probabilidade.

TRATAMENTO	NÚMERO DE ALGAS	MÉDIA	NÚMERO DE ALGAS TRANSFORMADAS
"A"	6183,33 x 10 <sup>4</sup>		78,33 x 10 <sup>4</sup> a
"B"	6400,00 x 10 <sup>4</sup>		78,17 x 10 <sup>4</sup> a
"C"	3083,33 x 10 <sup>4</sup>		55,09 x 10 <sup>4</sup> b
"D"	1883,33 x 10 <sup>4</sup>		42,10 x 10 <sup>4</sup> b