

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Unidade de Ciências e Tecnologias dos Recursos Aquáticos

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE MICROALGAS PRODUZIDAS
INDUSTRIALMENTE EM AQUACULTURA

Maria do Céu Rodrigues de Carvalho

Faro, 1997



TESES
SD

Caracterização bioquímica
de microalgas produzidas
industrialmente em Faro, 1997.
Carvalho, M. do Céu R.

22364

1002364nnn

3/6
Car 1



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
Unidade de Ciências e Tecnologias dos Recursos Aquáticos

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE MICROALGAS PRODUZIDAS
INDUSTRIALMENTE EM AQUACULTURA

Dissertação apresentada à Universidade do Algarve
para obtenção do grau de Mestre em Aquacultura

Maria do Céu Rodrigues de Carvalho

Faro, 1997

Maria do Céu Rodrigues de Carvalho

UNIVERSIDADE DO ALGARVE
SERVIÇO DE DOCUMENTAÇÃO

912198 22364

639.326

C.R. 100

AGRADECIMENTOS

Quero aqui expressar o meu agradecimento a todos os que contribuíram para a realização deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Teresa Dinis, pela disponibilidade manifestada na orientação deste trabalho, pela revisão efectuada e por todos os meios postos à disposição para a realização deste trabalho .

Ao Doutor Luis Lubian Chaichio, pela revisão deste trabalho e por todas as sugestões prestadas.

À Dra. Fátima Noronha, pela orientação nas análises bioquímicas, pelo material posto à disposição e pelos seus conselhos práticos .

À Professora Doutora Margarida Castro pelo auxílio prestado no tratamento estatístico dos dados.

Ao Doutor Luís Narciso pela ajuda preciosa nas análises de ácidos gordos das amostras e pelas facilidades concedidas na utilização do Laboratório Marítimo da Guia.

À empresa Timar por ter permitido a realização deste trabalho nas suas instalações e pelos meios técnicos e humanos postos à disposição.

Ao amigo Jorge Pinto pela revisão do texto e sugestões prestadas.

Ao Eduardo pelo apoio demonstrado em todos os momentos.

A meus pais, irmão, amigos e todos aqueles que contribuíram com o seu apoio para a realização deste trabalho.

Este estudo foi apoiado financeiramente no âmbito do programa PRAXIS XXI, com uma Bolsa de Mestrado BM/101/94.

A todos um muito obrigado.

RESUMO

Neste estudo investigou-se a evolução da composição bioquímica das microalgas *Isochrysis sp.* (T.ISO) e "*Nannochloropsis gaditana*", em diferentes fases de crescimento. As culturas das microalgas estudadas foram produzidas em massa, em volume limitado, numa "hatchery" de *Sparus aurata* e *Dicentrarchus labrax*. O comportamento da espécie "*Nannochloropsis gaditana*" em cultura, associado ao padrão de ácidos gordos (elevada percentagem de 16:3 ω 1 e 18:3 ω 3 e deficiência em 20:5 ω 3) levou-nos a considerar a hipótese da existência de um erro na identificação da microalga estudada, que não apresentou características de uma Eustigmatophyceae mas sim de uma Chlorophyceae (*Chlorella sp.*).

Os valores máximos de proteínas (7,5 pg/cél.) e de lípidos (29,5 pg/cél.), foram registados na espécie *Isochrysis sp.* (T.ISO) e o valor máximo de hidratos de carbono (12,2 pg/cél.), foi registado em *Chlorella sp.*. O conteúdo em lípidos e hidratos de carbono foi máximo na fase estacionária avançada, em ambas as espécies. O conteúdo proteico variou nas diferentes fases de crescimento, não se observando, contudo, o decréscimo característico na fase estacionária. Os principais ácidos gordos observados na espécie *Isochrysis sp.* (T.ISO) foram 18:3 ω 3, 18:4 ω 3 e 22:6 ω 3.

Dos resultados de composição bioquímica obtidos neste estudo, constata-se não haver vantagens em alterar o regime de colheita (7º dia) utilizado na "hatchery" estudada, uma vez que, apesar de se ter registado na fase estacionária avançada um aumento do conteúdo em matéria orgânica por célula, nesta fase as culturas já se encontram bastante envelhecidas. Por outro lado, a manutenção das culturas durante um período tão longo seria impraticável e pouco eficiente do ponto de vista produtivo.

A produtividade das microalgas, principalmente da espécie *Isochrysis sp.* (T.ISO), pode ser substancialmente melhorada através da alteração de alguns parâmetros, como a temperatura e o volume de cultura.

Uma vez que o valor nutricional de uma dada espécie depende do seu conteúdo em ácidos gordos, das duas microalgas estudadas, a espécie *Isochrysis sp.* (T.ISO) será a mais adequada como alimento para os organismos produzidos na "hatchery" estudada.

ABSTRACT

The evolution of the biochemical composition of batch cultures of the microalgae *Isochrysis sp.* (T.ISO) and "*Nannochloropsis gaditana*", in different growth phases was studied. The microalgae cultures were mass produced in a hatchery of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. The behaviour of "*Nannochloropsis gaditana*" in culture, as well as the fatty acid pattern (high percentage of 16:3 ω 1 and 18:3 ω 3 and 20:5 ω 3 deficiency) led us to raise the hypothesis that an error might have occurred in the identification of the algae, which did not present characteristics of an Eustigmatophyceae but of a Chlorophyceae (*Chlorella sp.*) instead.

The highest values for proteins (7,5 pg/cell) and lipids (29.5 pg/cell) were obtained for *Isochrysis sp.* (T.ISO) whereas the maximum for carbohydrates was obtained for *Chlorella sp.*. For both species, the lipid and carbohydrate content was maximum in the late stationary phase. The protein content varied with the different growth phases, never displaying, however, the characteristic decrease in the stationary phase. The main fatty acids observed in *Isochrysis sp.* (T.ISO) were 18:3 ω 3, 18:4 ω 3 and 22:6 ω 3.

Results show that there is no advantage in changing the harvest regime (7th day) used in the hatchery, since, although we have registered in the late stationary phase an increase in organic matter content, in this phase the cultures are already too old. Also, maintaining the cultures for such a long period would be very inefficient from the production point of view.

The microalgae productivity, especially of *Isochrysis sp.* (T.ISO), can strongly be increased by changing some parameters, such as temperature and culture volume.

Since the nutritional value of a species is related to the fatty acid content, *Isochrysis sp.* (T.ISO) is, of the two species studied, the most suitable as nourishment for the organisms produced in this hatchery.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Composição bioquímica das microalgas e necessidades nutritivas dos animais.	3
1.2 Utilização das microalgas	6
2. MATERIAL E MÉTODOS	
2.1 Material biológico	7
2.1.1 <i>Isochrysis sp.</i> (T.ISO)	7
2.1.2 Eustigmatophyceae versus Chlorophyceae	9
2.2 Métodos de produção de microalgas	10
2.2.1 Caracterização do método de produção da "hatchery" onde o trabalho foi desenvolvido	10
2.2.2 Condições de cultivo das microalgas	12
2.3 Trabalho experimental	13
2.3.1 Estudo do crescimento das microalgas	14
2.3.2 Determinação da biomassa	14
2.3.3 Estudo da composição bioquímica	
2.3.3.1 Estratégia de amostragem	15
2.3.3.2 Determinação do peso seco	16
2.3.3.3 Determinação dos teores pigmentares	16
2.3.3.4 Determinação do teor em proteínas e hidratos de carbono	17
2.3.3.5 Determinação do teor lipídico e em ácidos gordos	17
2.4 Tratamento estatístico	18
3. RESULTADOS	
3.1 Temperatura	19
3.2 Salinidade	19
3.3 pH	19
3.4 Crescimento	21
3.5 Biomassa	23
3.6 Peso seco	24
3.7 Teores pigmentares	25
3.8 Composição em proteínas, hidratos de carbono e lípidos	26
3.9 Composição em ácidos gordos	29
3.10 Resultados da análise estatística	32

4. DISCUSSÃO

4.1 Parâmetros físico-químicos	33
4.2 Condições de esterilidade	34
4.3 <i>Eustigmatophyceae versus Chlorophyceae</i>	35
4.4 Crescimento das culturas	36
4.5 Composição bioquímica das microalgas	38
4.6 Manipulação da composição bioquímica	42
4.7 Algumas considerações sobre a colheita e cultivo das algas	44

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
-------------------------------	----

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXOS

Anexo I - Determinações bioquímicas

Anexo II - Composição do Meio Walne

Anexo III - Resultados das análises efectuadas

1. INTRODUÇÃO

As microalgas, de grande importância como produtores primários na teia alimentar aquática, são uma componente essencial da alimentação natural da maioria dos organismos aquáticos. O cultivo de microalgas torna-se assim uma das actividades mais importantes em aquacultura, sendo caracterizado por uma produção em massa, onde se estabelecem num meio artificial condições que favoreçam a produção máxima de biomassa algal, num mínimo de tempo e com os menores custos possíveis. Para tal, há que ter em conta todos os factores que irão determinar não só o crescimento em termos quantitativos, mas também a qualidade da biomassa produzida, do ponto de vista nutritivo.

A produção das microalgas em aquacultura apresenta alguns problemas, nomeadamente os elevados custos que estão associados a esta actividade. Apesar das numerosas tentativas em substituir as algas vivas por alimento inerte, ainda não foram encontradas alternativas satisfatórias. A principal razão do insucesso dos alimentos alternativos está relacionada com o seu valor nutritivo. O enriquecimento dos alimentos inertes com compostos nutritivos como ácidos gordos essenciais é uma opção que está actualmente a ser experimentada. O cultivo de microalgas assume assim um papel de primordial importância na produção de animais marinhos.

As microalgas são utilizadas como alimento em todos os estádios de crescimento de bivalves, nos estádios larvares de algumas espécies de crustáceos e nos primeiros estádios larvares de algumas espécies de peixes. São igualmente utilizadas na produção de organismos fitoplanctívoros (rotíferos, copépodes e artémia), muito importantes na teia alimentar marinha os quais, por sua vez, são utilizados em aquacultura como a principal fonte de alimento de larvas e juvenis de crustáceos e peixes (De Pauw, *et al.*, 1984; Brown *et al.*, 1989; Yúfera & Lubián, 1990).

Em aquacultura o valor nutritivo das microalgas na cadeia alimentar assume particular importância, na medida em que os nutrientes essenciais são transferidos através do zooplankton para os animais cultivados. São vários os factores responsáveis pelo valor nutritivo de uma espécie de microalga, nomeadamente a sua composição bioquímica, tamanho, digestibilidade e toxicidade, os quais são responsáveis por diferenças no valor nutricional de diferentes espécies (Webb & Chu, 1981; Fernandez-Reiriz *et al.*, 1989; Yúfera & Lubián, 1990). No entanto, o valor nutricional depende principalmente da composição bioquímica (conteúdo em proteínas, lípidos, hidratos de carbono e minerais, assim como aminoácidos, ácidos gordos essenciais, esteróis, açúcares e vitaminas (Brown *et al.*, 1989)), e

das necessidades nutritivas específicas do animal a alimentar. Por sua vez, a composição bioquímica de uma dada espécie de microalga pode ser influenciada por factores ambientais como sejam, a composição do meio de cultura, temperatura, pH, intensidade luminosa, fotoperíodo e fase de crescimento (Mykelstad, 1974; Fabregas *et al.*, 1985a; Brown *et al.*, 1989; Harrison *et al.*, 1990). Uma vez que a composição química das microalgas e consequentemente o seu valor nutritivo, pode variar na medida em que ocorrem alterações no meio de cultura, torna-se importante monitorizar a ocorrência destas alterações, afim de poder determinar o momento ideal para a utilização das algas.

Existem actualmente numerosos estudos relativos à composição bioquímica de microalgas focando assuntos tão diversos como variação da composição bioquímica do fitoplâncton em relação a diferentes factores, tais como a concentrações de nutrientes no meio de cultura (Fabregas *et al.*, 1985a; 1986b; Suen *et al.*, 1987; Reimann *et al.*, 1989; Harrison *et al.*, 1990), a fase de crescimento da cultura (Pugh, 1975; Fernandez-Reiriz *et al.*, 1989; Dunstan *et al.*, 1993), a temperatura (Thompson *et al.*, 1992a;1992b), a técnica de cultivo (Dunstan *et al.*, 1993), a salinidade (Pugh, 1975; Fabregas *et al.*, 1985a), a taxa de crescimento (Grima *et al.*, 1994; Saoudi- Helis *et al.*, 1994) e a intensidade luminosa (Harrison *et al.*, 1990; Thompson *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1993a). A maioria destas experiências foram realizadas em ambientes laboratoriais controlados em culturas de volume reduzido, sendo pouco frequentes os estudos realizados em condições de produção intensiva.

No presente trabalho pretendeu-se estudar duas espécies de microalgas produzidas em massa, numa "hatchery" de uma estação de aquacultura de *Sparus aurata* (dourada) e *Dicentrarchus labrax* (robalo), a qual produz e utiliza diariamente grandes volumes de microalgas na sua cadeia alimentar. As algas são utilizadas como alimento para animais filtradores zooplancónicos, constituindo estes últimos alimento para as larvas de peixe.

Examinou-se a composição bioquímica em proteínas, hidratos de carbono, lípidos e ácidos gordos da espécies *Isochrysis sp.* (T.ISO) e uma Chlorophyceae, em diferentes fases de crescimento, com objectivo de estabelecer a fase de crescimento mais apropriada do ponto de vista do valor nutritivo, para a alimentação de larvas de peixes.

1.1 Composição bioquímica das microalgas e necessidades nutritivas dos animais.

É importante conhecer as necessidades nutritivas dos animais e as características bioquímicas do seu alimento (neste caso as microalgas que se situam na base da cadeia alimentar), para que se desenvolvam dietas mais adequadas, através da manipulação das condições de cultivo, colheitas em diferentes fases de crescimento das culturas, isolamento de novas estirpes e através de melhoramentos genéticos (Brown *et al.* 1989).

As microalgas são produtores primários fotossintéticos que se situam na base das cadeias alimentares aquáticas. O seu conteúdo é transferido directa ou indirectamente, através de zooplâncton, para as larvas de peixe.

Os peixes necessitam de energia para as suas actividades e manutenção das funções corporais. Uma vez satisfeitas as necessidades energéticas, a restante energia disponível pode ser utilizada no crescimento. Proteínas, hidratos de carbono ou lípidos podem ser usados como fonte de energia pelos peixes, mas estes compostos orgânicos não desempenham igual papel na promoção do crescimento e síntese de tecidos.

As proteínas, hidratos de carbono, lípidos e minerais perfazem 90 a 95% do peso seco das algas, sendo os restantes 5-10% preenchidos por ácidos nucleicos (Fabregas *et al.*, 1985b; 1986a; 1986b).

O valor nutricional das proteínas é determinado pelo conteúdo e disponibilidade dos seus aminoácidos, sendo a utilização das proteínas para o crescimento tanto mais eficiente quanto a proporção em aminoácidos essenciais for idêntica à dos tecidos do animal que é alimentado. Um aminoácido essencial pode ser considerado limitante quando a sua proporção no alimento é inferior à necessária para o crescimento. Quando um aminoácido se torna limitante, todos os outros que se encontram em maiores quantidades no alimento não são utilizados no crescimento, podendo ser utilizados como fonte de energia ou não ser assimilados (Webb & Chu, 1981).

As proteínas são um componente muito importante e preenchem as necessidades em azoto e aminoácidos dos animais. Por sua vez, as necessidades proteicas dos animais são influenciadas por factores ambientais, genéticos, nutricionais e ainda pela fase do ciclo de vida em que se encontram. Por exemplo, as dietas alimentares das larvas e juvenis devem conter níveis de proteína superiores aos dos adultos, uma vez que quando os animais crescem a sua taxa metabólica e as suas necessidades proteicas diminuem (Brown *et al.*, 1989; Jobling, 1993).

As proteínas são necessárias para o crescimento, mas se forem fornecidas em quantidades elevadas irão ser utilizadas como fonte de energia. Numa dieta com adequado

suprimento de proteínas, estas devem fornecer 40 a 55 % da energia da dieta dos peixes (Jobling, 1993).

Os hidratos de carbono podem ser subdivididos em polissacarídeos, oligossacarídeos e monossacarídeos, podendo a sua natureza e proporções nas microalgas ser bastante variável. Os principais açúcares que se encontram nas algas são a glucose, galactose, manose e ribose (Brown *et al.* 1989). Apesar de constituírem normalmente um componente minoritário na teia alimentar marinha, os hidratos de carbono, representam uma fonte de energia que poderá permitir “poupar” proteínas, indispensáveis para a síntese de tecidos (Jobling, 1993).

A fracção de lípidos no fitoplâncton pode variar entre 1 e 40 % do peso seco das algas. O conteúdo total em lípidos, assim como as proporções relativas dos ácidos gordos, podem ser alterados por factores ambientais. Por exemplo, a deficiência em azoto no meio de cultura provoca geralmente um aumento da concentração dos lípidos de reserva (Shifrin & Chrisholm, 1980). A fracção lipídica pode ser dividida em lípidos polares, que englobam os fosfolípidos, glicolípidos, clorosulfolípidos e sulfolípidos, e lípidos neutros, que inclui os triglicéridos, diglicéridos, hidrocarbonetos, alcanonas, esteróis e pigmentos (Pohl & Zurheide 1979; Brown *et al.*, 1989; Cobelas & Lechado, 1989). Os lípidos polares são os que se encontram em maiores quantidades nas microalgas, em particular os fosfolípidos e glicolípidos que são componentes das membranas e os triacilgliceróis que são uma reserva de ácidos gordos utilizados na divisão celular, como fonte energia metabólica, na manutenção das membranas e numa diversidade de funções fisiológicas (Dunstan *et al.*, 1993).

Os ácidos gordos constituem a maior fracção de lípidos nas algas. Ocorrem predominantemente na forma esterificada com o glicerol, sendo também encontrados em triglicerídeos, diglicerídeos, fosfolípidos e glicolípidos (Brown *et al.*, 1989).

As alterações da quantidade de lípidos nas células são muitas vezes acompanhadas pela alteração da qualidade destes e dos seus ácidos gordos. Em culturas de volume limitado, à medida que o número de células de microalgas aumenta os organismos ficam expostos a um nível mais reduzido de luz, ao qual se terão de adaptar. Essa adaptação manifesta-se por um aumento inicial de alguns tipos de lípidos, tais como clorofilas, pigmentos acessórios e componentes da membrana dos tilacóides. Subsequentemente, o azoto, fósforo e outros nutrientes tomam-se limitantes para o crescimento, provocando uma diminuição dos níveis de clorofila e a acumulação de outros lípidos (Dubinsky, 1989).

A maioria dos ácidos gordos sintetizados pelas plantas são de cadeia simples, podendo ser saturados ou insaturados e com um número par de carbono. Os ácidos gordos com um número ímpar de carbono, e de cadeias ramificadas iso e anteiso, podem estar frequentemente presentes, mas em pequenas proporções. As microalgas marinhas podem

sintetizar ácidos gordos poliênicos, aprestando a maior variedade de ácidos gordos saturados e cis-insaturados do reino vegetal. (Pohl & Zurheide, 1979).

Os ácidos gordos e lípidos são uma fonte de energia, tendo outros papéis importantes como o transporte de compostos solúveis em lípidos (ex. vitaminas), são elementos estruturais das membranas celulares e precursores da síntese de hormonas, pigmentos e factores de crescimento (Jobling, 1993). De grande importância para os animais, reveste-se um grupo de ácidos gordos denominados ácidos gordos essenciais. Trata-se de ácidos gordos insaturados, com ligações duplas, que, por não poderem ser sintetizados pelos animais tem que estar presentes no seu alimento.

Os lípidos, componentes importantes das dietas alimentares, foram inicialmente considerados como fontes de energia, prestando-se pouca atenção à inclusão, nas dietas, de ácidos gordos essenciais. Actualmente é reconhecida a importância dos ácidos gordos, especialmente os da cadeia ω 3, na dieta dos animais marinhos. Os ácidos gordos eicosapentaênico - EPA ($20:5\omega$ 3) e docosahexaênico - DHA ($22:6\omega$ 3) são essenciais para o crescimento e desenvolvimento dos estados larvares de muitas espécies de peixes (Scott & Middleton, 1979; Watanabe *et al.* 1983; Lubzens *et al.* 1985; Ben-Amotz *et al.*, 1987; Fernández-Reiriz, *et al.*, 1987; Dhert *et al.*, 1990; Koven *et al.*, 1992; Dunstan *et al.*, 1993; Mourente *et al.*, 1993; Reitan *et al.*, 1993; Whyte *et al.*, 1994), bivalves (Webb & Chu, 1981; Enright *et al.*, 1986; Napolitano *et al.*, 1990) e crustáceos (Guary *et al.*, 1976; Luís, 1989).

Os principais pigmentos da maioria das algas são as clorofilas verdes e carotenoides amarelos, laranja e vermelhos, os quais podem constituir 0.5 a 5% do peso seco da célula (Parsons *et al.* 1961). A clorofila *a* é o pigmento fotossintético primário de todas as algas. A clorofila *b*, acessória, aparece juntamente com a clorofila *a* nas algas verdes, enquanto a clorofila *c* se encontra juntamente com a clorofila *a* nas classes de algas castanhas (Brown *et al.*, 1989).

A inclusão dos pigmentos na categoria dos lípidios varia muito com os autores. No entanto, o que é comum nestes compostos é poderem ser extraídos com solventes orgânicos lipofílicos (Pohl & Zurheide, 1979).

As algas podem ser uma fonte de variados minerais. A fracção mineral das algas pode constituir uma grande proporção do seu peso seco e pode variar entre 6 e 39% (Brown *et al.*, 1989).

Os valores normais de ácidos nucleicos das microalgas situam-se entre os 4 e 6% (Brown *et al.*, 1989), sendo a sua composição muito idêntica nas diferentes fases de crescimento (Fernandez-Reiriz *et al.*, 1989; Fabregas *et al.*, 1986b).

1.2 Utilização das microalgas

As microalgas produzidas na "hatchery" onde se realizou o presente estudo, são utilizadas para enriquecimento de rotíferos, os quais servem de alimento a larvas de peixe.

Os rotíferos tem sido exaustivamente usados como alimento vivo no cultivo de larvas de peixes marinhos e crustáceos planctônicos. A sua composição química reveste-se de grande importância e está intimamente ligada à composição química dos organismos que lhes servem de alimento, como é o caso das microalgas (Ben-Amotz *et al.*, 1987; Reitan *et al.*, 1993; Oie *et al.*, 1994). O valor nutritivo dos rotíferos é determinado principalmente pelo seu conteúdo em ácidos gordos poliinsaturados, o qual é influenciado pela composição em ácidos gordos do seu alimento. A composição dos rotíferos em ácidos gordos é extremamente importante, uma vez que, os ácidos gordos da cadeia $\omega 3$, particularmente 20:5 $\omega 3$ e 22:6 $\omega 3$, são essenciais para o crescimento dos peixes nos primeiros estados larvares.

Apesar de os rotíferos sintetizarem ácidos gordos poliinsaturados da cadeia $\omega 3$, esta síntese é baixa e os níveis nos tecidos são insuficientes para o crescimento e desenvolvimento normal de larvas de peixes (Lubzens *et al.* 1985; Whyte & Nagata, 1990). Desta forma, a acumulação destes ácidos pelos rotíferos depende de suplementos exógenos, os quais podem ser provenientes, entre outros, de microalgas.

Para além de servirem como enriquecimento de rotíferos, as microalgas são também adicionadas aos tanques de cultivo de larvas de peixes, na fase inicial da sua alimentação exógena. Segundo Howell (1979), Scott & Middleton (1979) e Reitan *et al.* (1993) a adição de algas aos tanques de cultivo resulta numa melhoria do crescimento e sobrevivência das larvas. Têm sido propostas várias hipóteses para explicar este efeito, nomeadamente razões nutricionais, devido à disponibilidade de uma fonte permanente de alimento para os rotíferos, assim como devido a um possível melhoramento da qualidade da água (Howell, 1979; Reitan *et al.*, 1993). Reitan *op.cit.* observaram que o conteúdo dos rotíferos em lípidos e em ácidos gordos $\omega 3$ decresce cerca de 20%/dia quando estes são transferidos para tanques sem microalgas, enquanto que o seu conteúdo permanece estável quando são transferidos para tanques onde se adicionou microalgas.

Apesar de o zooplankton constituir a principal dieta das larvas, encontra-se documentado por vários autores a ingestão regular de microalgas nos primeiros estágios de desenvolvimento das larvas, sugerindo-se que aquelas possam fornecer, ainda que em pequenas quantidades, vários compostos essenciais (tais como vitaminas) para as larvas (Reitan *et al.*, 1993)

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material biológico

As espécies de microalgas estudadas foram *Isochrysis* sp. (T.ISO) e "*Nannochloropsis gaditana*". No entanto, como será discutido posteriormente, o comportamento da alga em cultura e os resultados bioquímicos obtidos para a espécie "*Nannochloropsis gaditana*" levaram-nos a supor ser a espécie estudada uma *Chlorophyceae*, possivelmente *Chlorella* sp. .

A espécie *Isochrysis* sp. (T.ISO) proveio da "Culture collection of algae and protozoa" - Dunstaffnage Marine laboratory;- Scotland; U.K.; enquanto *Chlorella* sp. era proveniente da empresa CUPIMAR S.A., Cádiz - Espanha.

2.1.1 *Isochrysis* sp. (T.ISO)

Sistemática

A espécie *Isochrysis* sp. pertence à classe Prymnesiophyceae, a qual engloba um grupo de organismos flagelados mononucleados caracterizados por possuírem um haptonema entre dois flagelos. Os cloroplastos possuem clorofila *a*, *c1* e *c2*, sendo a fucoxantina o carotenoide mais abundante.

Os organismos pertencentes à classe Prymnesiophyceae foram considerados como fazendo parte da classe Chrysophyceae até ao ano de 1962. Christensen, em 1962, introduziu-os numa classe separada, Haptophyceae, devido à presença de um haptonema. Estes organismos não haviam sido anteriormente reconhecidos como pertencentes a uma classe distinta devido ao seu pequeno tamanho, tendo sido necessário recorrer ao microscópio electrónico para melhor determinar as suas características. Assim, o nome Haptophyceae, descritivo e não baseado num género de uma classe, foi posteriormente alterado para Prymnesiophyceae (Hibberd, 1976 *in* Lee, 1989).

De acordo com Lee (1989) a classificação taxonómica de *Isochrysis* sp. é a seguinte:

Classe: Prymnesiophyceae

Ordem: Isochrysidales

Família: Isochrysidaceae

Género: *Isochrysis*

Espécie: *Isochrysis* sp.

Características da espécie

Os organismos pertencentes à Ordem Isochrysidales caracterizam-se por possuírem um haptonema pouco desenvolvido ou mesmo ausente. É também característico a presença de dois flagelos lisos e de igual tamanho (Lee, 1989). Na espécie *Isochrysis* sp. o haptonema é reduzido e com poucos microtubulos (Green & Pienaar, 1977 *in* Lee, 1989).

Isochrysis sp. (T.ISO) é uma estirpe adaptada a águas quentes (Tiu *et al.*, 1989), sendo a sua temperatura óptima de crescimento de 26° C (Saoudi-Helis *et al.*, 1994) e tolerando variações entre 15° e 30 °C (Jeffrey *et al.*, 1992).

A espécie *Isochrysis* sp. (T.ISO) é muito utilizada como alimento de moluscos bivalves (Yúfera & Lubián, 1990), apresentando características como o pequeno tamanho e ausência de parede celular, pelo que é facilmente ingerida e digerida por larvas de invertebrados (Walne, 1964; Ukeles, 1975; Balbinchak & Ukeles, 1979 *in* Wilkfors & Patterson, 1994). Esta espécie é particularmente rica em 22:6 ω 3 (Brown *et al.*, 1989; Harrison *et al.*, 1990; Mourente *et al.*, 1990; Napolitano *et al.*, 1990; Reitan *et al.*, 1993) e pobre em 20:5 ω 3 (Brown *et al.*, 1989; Reitan *et al.*, 1993), sendo uma microalga muito estudada e utilizada em aquacultura marinha (De Pauw *et al.*, 1984; Ben-Amotz *et al.*, 1987; Laing & Utting, 1980; Harrison *et al.*, 1990; Yúfera & Lubián, 1990; Sulkenik & Wahnnon, 1991; Wikfors & Patterson, 1994).

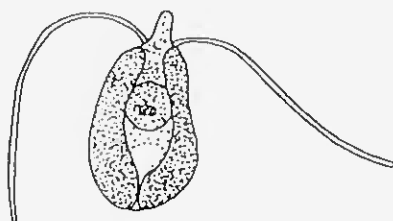


Figura 1 - Exemplar da espécie *Isochrysis* sp. (Reynolds, 1974 *in* Lee, 1989)

2.1.2 Eustigmatophyceae versus Chlorophyceae

A composição lipídica e, em particular, a composição em ácidos gordos, para além das análises de ultraestrutura e conteúdo pigmentar, constitui uma ferramenta quimiotaxonómica utilizada na classificação das microalgas (Menzel & Wild, 1989). Neste estudo, a composição em ácidos gordos foi um indicador utilizado para solucionar um problema de identificação de uma das espécies de microalgas estudadas, a qual tendo sido apresentada como "*Nannochloropsis gaditana*", apresentou características da Classe Chlorophyceae, como será posteriormente discutido.

A espécie *Nannochloropsis gaditana* foi isolada e estudada por Lubian (1981), tendo recebido o nome provisório de *Nannochloris gaditana*, pertencente à classe *Chlorophyceae*. No entanto, com base nas suas características morfológicas, tróficas e de certos carotenoides minoritários, este autor considerou que esta espécie deveria pertencer a um novo género - *Nannochloropsis* que incluiria todas as formas cocóides azoospóricas dentro das Eustigmatophyceae. As principais características desta espécie, que a distinguem das Chlorophyceae, são a ausência de clorofila b e a presença de quantidades apreciáveis do ácido gordo C20:5 ω 3 (Lubian, 1981), que existe apenas em quantidades vestigiais nas Chlorophyceae (Mourente *et al.*, 1990).

Relativamente aos ácidos gordos as Chlorophyceae caracterizam-se por possuírem grandes quantidades ácidos gordos C16 e C18 (Pohl & Zurheide, 1979; Cojocar *et al.*, 1988; Cobelas & Lechado, 1989; Menzel & Wild, 1989) e serem deficientes em ácidos gordos C20. Em contraste, as Eustigmatophyceae são deficientes em C16 e C18, mas contêm grandes quantidades de C20:5 ω 3 (Menzel & Wild, 1989; Mourente *et al.*, 1990)

Actualmente, verifica-se ainda alguma controvérsia relativamente à composição em ácidos gordos de algumas espécies de *Chlorella* que possuem quantidades apreciáveis de EPA (20:5 ω 3). Estas diferenças, relativamente ao padrão observado nas Chlorophyceae, poderão estar relacionadas com problemas a nível taxonómico, sendo actualmente incluídas na classe Eustigmatophyceae algumas destas espécies de *Chlorella* (Mourente *et al.*, 1990). Nos trabalhos de Nyjonje & Radull (1991) e Renaud *et al.* (1991) algumas espécies de *Chlorella* são também identificadas como *Nannochloropsis oculata*.

2.2 Métodos de produção das microalgas

A produção de grandes quantidades de microalgas é geralmente realizada em sacos de polietileno com capacidades de 100-500 litros ou em tanques de 1000-5000 litros.

Os regimes de cultura podem variar desde o contínuo, semi-contínuo ou volume limitado (batch). As culturas em volume limitado são o tipo de cultura mais usado na produção de microalgas, por se tratar de um método simples que consiste basicamente em manter células a crescer num volume limitado de meio, em condições adequadas de luz, temperatura, salinidade e nutrientes. A utilização da cultura é feita na sua totalidade quando esta se encontra na fase logarítmica, no final da fase logarítmica ou na fase estacionária. No regime semi-contínuo, apenas uma parte da cultura é usada, sendo repostos o volume inicial, com novo meio nutritivo. No regime contínuo, a utilização da cultura é contínua, sendo repostos continuamente o volume inicial, com novo meio nutritivo.

2.2.1 Caracterização do método de produção da “hatchery” onde o trabalho foi desenvolvido

Este trabalho foi realizado na “hatchery” de uma empresa de aquacultura Timar - Culturas em água Lda., onde se produz, segundo o método intensivo, *Sparus aurata* (dourada) e *Dicentrarchus labrax* (robalo). Nesta estação de aquacultura é produzida toda a cadeia alimentar, com início na produção de microalgas, as quais são utilizadas para enriquecimento de rotíferos, constituindo estes últimos, alimento para as larvas de peixe. As microalgas são também adicionadas aos tanques de cultivo das larvas de peixe. Deste modo, é necessário cultivar diariamente grandes volumes de microalgas, que são produzidas segundo o método a seguir descrito.

O método de produção das microalgas estudadas neste trabalho e as condições de cultivo são os utilizados na “hatchery” da Timar, onde é seguido o método de produção normalmente designado por “batch” ou de volume limitado.

O esquema da figura 2 representa o método utilizado na produção das microalgas. A partir de culturas stocks mantidas em tubos de ensaio, são inoculados sucessivamente volumes superiores, desde erlenmeyers de 100 ml até às mangas plásticas com capacidade de algumas centenas de litros ($\approx 450L$). O tempo de crescimento da cultura nas diferentes etapas

é de aproximadamente 15 dias nos erlenmeyers de 100 ml, 15-30 dias nos erlenmeyers de 500 ml e 7 dias nas restantes etapas (balões de 2 l, balões de 10 l e mangas).

Este estudo abrangeu apenas as duas últimas etapas, sendo apenas estudadas as microalgas produzidas em balões de 10 litros e em mangas de 450 litros.

Os balões de 10 litros foram inoculados com meio balão de dois litros, o que permitiu obter uma concentração inicial de $\approx 1 \times 10^6$ células por ml na espécie *Isochrysis* sp. (T.ISO), e $\approx 2 \times 10^6$ células por ml na espécie *Chlorella* sp..

As mangas foram inoculadas com dois balões de 10 litros, obtendo-se assim uma concentração inicial de $\approx 0.5 \times 10^6$ células por ml na espécie *Isochrysis* sp. (T.ISO), e $\approx 1 \times 10^6$ células por ml na espécie *Chlorella* sp..

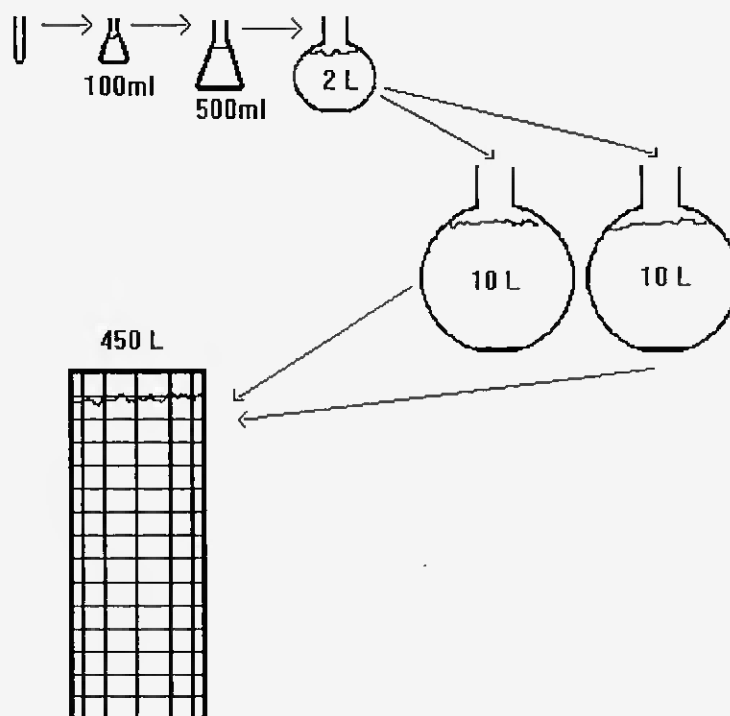


Figura 2 - Esquema representativo da produção de microalgas na "hatchery" da Timar. As culturas stock, mantidas em tubos de ensaio, são inoculadas sucessivamente em erlenmeyers de 100 ml, erlenmeyers de 500 ml, balões de 2 l, balões de 10 litros e mangas de 450 l.

2.2.2 Condições de cultivo das microalgas

A produção de microalgas em pequenos volumes (até aos 10 litros) e grandes volumes (mangas de 450 litros), foi realizada em salas distintas, com diferentes regimes de temperatura e iluminação. Ambas as salas eram climatizadas, com temperaturas controladas que se situaram entre os $18 \pm 2^\circ \text{C}$ para pequenos volumes (sala 1) e os $20 \pm 2^\circ \text{C}$ para grandes volumes (sala 2).

A iluminação na sala 1 era totalmente artificial, sendo utilizadas lâmpadas do tipo Daylight (Osram - L - 58 W - Tageslicht). A sala 2, além da iluminação artificial, dispunha de iluminação natural durante o período diurno. A intensidade luminosa, medida com um luxómetro portátil Lutron - Lx-102, à superfície dos balões/mangas, variou entre os 3000- 5000 lux (sala 1) e os 8000- 10000 lux (sala 2). O que corresponde a 83-139 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (sala 1) e 222-277.8 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ (sala 2), tendo em conta que 1 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ é equivalente a 36 lux (Foy, 1980 *in* Lubian, 1986). O fotoperíodo foi de 24 horas em ambas as salas.

Para o meio de cultivo das microalgas utilizou-se água do mar tratada e enriquecida com nutrientes de acordo com o meio Walne (1966) (Anexo II). Nesta estação piscícola a água, proveniente da Ria Formosa, é mantida num reservatório (tanque em terra) de onde é bombeada para abastecer toda a piscicultura. A água utilizada na "hatchery" é submetida a tratamentos especiais tais como filtragem mecânica por filtros de areia seguido de tratamento por meio de radiação ultravioleta.

Depois de se ajustar a salinidade a 25 ppm com água doce, procedeu-se à sua esterilização, em autoclave para pequenos volumes, e para grandes volumes através da adição 50 ml de hipoclorito de sódio com 13º clorimétricos, neutralizando-se após algumas horas (5-12 horas) com 70 ml de tiosulfato.

A fim de manter as células em suspensão, todas as culturas com volumes superiores a 2 l foram arejadas. O ar foi fornecido continuamente, sendo enriquecido com um suplemento de CO_2 de 15 % nos balões e 20 a 30% nas mangas, durante 24 horas.

Na produção em massa de microalgas toma-se difícil manter as culturas axénicas, contudo foram tomadas algumas precauções, nomeadamente a realização de repicagens em condições de esterilidade e utilização de utensílios esterilizados, no sentido de manter o número de bactérias o mais baixo possível.

2.3 Trabalho experimental

Neste trabalho realizaram-se quatro ensaios em duplicado, aos quais foi atribuída a seguinte identificação :

- **T.ISO B1** para o ensaio realizado com a espécie *Isochrysis sp.* (T.ISO) cultivada em balão
- **T.ISO M1** para o ensaio realizado com a espécie *Isochrysis sp.* (T.ISO) cultivada em manga
- **CHL B** para o ensaio realizado com a espécie *Chlorella sp.* cultivada em balão
- **CHL M** para o ensaio realizado com a espécie *Chlorella sp.* cultivada em manga

Com o decorrer do trabalho, foi necessário realizar um segundo ensaio com a espécie *Isochrysis sp.* (T.ISO) cultivada em balão. Este segundo ensaio **T.ISO B2** foi considerado necessário devido a não ter sido possível determinar a composição em ácidos gordos durante o ensaio T.ISO B1. Quando se realizou o segundo ensaio, a microalga que estava a ser cultivada na "hatchery", não pertencia ao mesmo "lote" de T.ISO B1, apesar de a espécie e do laboratório de origem serem os mesmos. Os resultados obtidos nos dois ensaios foram diferentes, pelo que foram considerados como dois ensaios distintos.

Foi também realizado um segundo ensaio **T.ISO M2**, com a mesma espécie cultivada em mangas. A razão deste segundo ensaio deve-se ao facto de no primeiro terem sido detectados vários problemas, nomeadamente ao nível do crescimento da cultura. Neste ensaio foram modificados alguns parâmetros ambientais, com o objectivo de analisar o reflexo em termos de alterações de crescimento das culturas. Para tal, aumentou-se a temperatura para 23.5 ± 2 ° C e reduziu-se o volume de cultura, tendo sido utilizadas mangas de menor diâmetro e capacidade (80 litros).

2.3.1 Estudo do crescimento

O crescimento celular foi estimado através de contagens diárias (em triplicado) do número de células ao microscópio óptico, utilizando-se um hematocítmetro de Burker. Para tal, foram recolhidas diariamente amostras de aproximadamente 10 ml. Nestas amostras determinou-se o pH, e fixou-se em seguida com 1 a 2 gotas de formol neutralizado.

As amostras foram recolhidas sempre à mesma hora, uma vez que podem ocorrer alterações da composição das microalgas ao longo do dia.

Taxa de crescimento exponencial

Uma cultura de microorganismos, quando sujeita a condições favoráveis, cresce de forma que a taxa de adição de células é proporcional ao número de células presentes - crescimento exponencial (Guillard, 1973a).

A taxa de crescimento exponencial ($K \text{ (dia}^{-1}\text{)}$) foi calculada através do declive da recta de regressão entre o logaritmo (\log_2) da densidade celular e o tempo (Guillard, 1973a). A partir da constante de crescimento (número de divisões por dia) pode-se estimar o tempo de duplicação (t.d.(dia)) que corresponde ao tempo necessário para a população de microalgas duplicar (t.d = $1/K$).

2.3.2 Determinação da biomassa

A biomassa ($\mu\text{g peso seco/ ml}$) foi calculada multiplicando o número de células por ml de amostra, pelo peso seco de cada célula (Brown *et al.*, 1993b).

$$\text{Biomassa } (\mu\text{g/ml}) = \text{Número de células/ ml} \times \text{Peso seco/célula (pg/cél.)}$$

2.3.3 Estudo da Composição Bioquímica

2.3.3.1 Estratégia de Amostragem

Para o estudo da composição bioquímica das microalgas estabeleceu-se um plano de amostragem de acordo com as diferentes fases de crescimento da cultura.

Foi necessário realizar um estudo prévio das curvas de crescimento das microalgas a estudar, a fim de se estabelecer os dias de amostragem. Uma vez que se pretendia abranger as diferentes fases de crescimento da cultura, estabeleceu-se que as amostragens seriam realizadas no 3º, 7º, 11º e 23º dias após a inoculação, por se considerar serem de algum modo representativos das seguintes fases de crescimento:

- 1 - dia 3 após a inoculação - fase exponencial
- 2 - dia 7 após a inoculação - fim da fase exponencial
- 3 - dia 11 após a inoculação - fase estacionária
- 4 - dia 23 após a inoculação - fase estacionária avançada

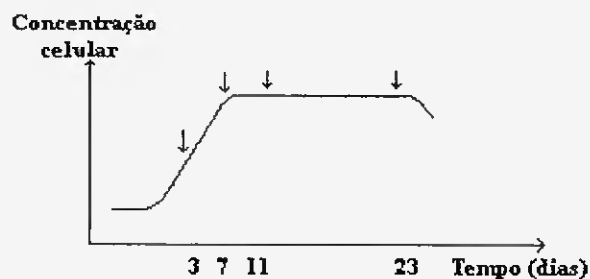


Figura 3 - Curva padrão (escala logarítmica) representativa do crescimento de microalgas unicelulares em culturas de volume limitado. As ↓ indicam os dias de amostragem.

As amostragens efectuaram-se nos dias estabelecidos, sendo recolhidas amostras em triplicado, que foram imediatamente transportadas para o laboratório.

Destas amostras retiraram-se subamostras (cujo volume variou consoante a fase de crescimento da cultura), para a determinação dos pesos secos (10 - 20 ml), proteínas e hidratos de carbono (5 - 15 ml), teores pigmentares (5 -15 ml), lípidos totais (5 -15 ml) e ácidos gordos (100-500ml). Estas subamostras (com excepção das utilizadas para os pesos secos) foram centrifugadas a 3000 rpm durante 15 minutos e, depois de retirado o sobrenadante, foram congeladas a -80° C para posterior análise. As amostras destinadas à determinação dos ácidos gordos, depois de congeladas, foram liofilizadas para a obtenção de um extracto seco de algas.

As amostragens para a determinação dos ácidos gordos realizaram-se apenas nas fases exponencial e estacionária avançada, pois de outro modo o elevado volume de amostra necessário tornaria impraticável a execução da experiência.

2.3.3.2 Determinação do peso seco

Para a determinação do peso seco (método de Utting, 1985 (anexo I)) utilizaram-se filtros de fibra de vidro (Watman GF/C), previamente incinerados a 450°C durante 4 horas, que foram posteriormente tarados e numerados. Depois de se filtrar um volume determinado de amostra, os filtros foram lavados com 80 ml de formato de amónia e postos a secar a 80°C durante 48 horas. Foi também determinado o teor em cinzas através da incineração posterior dos filtros a 450° C durante 4 horas .

2.3.3.3 Determinação dos teores pigmentares

Para a quantificação dos teores pigmentares foi inicialmente experimentado um método que utiliza a acetona para a extracção dos pigmentos. Contudo, a acetona não se mostrou eficaz na extracção dos pigmentos da espécie *Chlorella sp.*, pelo que foi necessário utilizar outro método, onde é usado o metanol absoluto na extracção dos pigmentos. Este método mostrou-se mais eficaz na extracção, mas permite apenas quantificar a clorofila a. Após a leitura espectrofotométrica das absorvâncias a 665nm (D665nm), foi calculada a quantidade de clorofila a, aplicando a seguinte equação:

Clorofila a (µg/ml extracto) = **13.9 x D 665nm** (Talling & Driver, 1963 *in* Vollenweider, 1974).

2.3.3.4 Determinação do teor em proteínas e hidratos de carbono

A quantificação das proteínas e hidratos de carbono foi realizada em subamostras comuns, as quais após a adição de 2ml de NaOH (1N), foram sonificadas durante 5 minutos, com um desintegrador ultrasónico (4710 series - Ultrasonic homogenizer, Cole Parmer Instrument). As amostras foram em seguida sujeitas a uma temperatura de 100°C, durante 10 minutos e, depois de arrefecerem até à temperatura ambiente, centrifugaram-se a 3000 rpm durante 5 minutos. Determinou-se então o conteúdo proteico do sobrenadante, segundo o método de BRADFORD (1976), e o conteúdo em hidratos de carbono segundo o método do Fenol-sulfúrico (KOCHERT, 1978 (anexo I)).

2.3.3.5 Determinação do teor lipídico e em ácidos gordos

O conteúdo lipídico total foi determinado, por espectrofotometria, após extracção com clorofórmio-metanol, segundo o método de MARSH & WEINSTEIN (1966 (anexo I)). Utilizou-se como padrão a Tripalmitina.

Os ácidos gordos foram quantificados após extracção da mistura lipídica total pelo método de BLIGHT & DYER (1959). A análise dos ésteres metílicos foi realizada por cromatografia gasosa utilizando-se uma coluna SP 1000 (SUPELCO) (OV- 101, tipo SCOT), com capilar 30 m x 0,32 mm i.d.(anexo I). O padrão interno utilizado foi o ácido gordo C19:0.

A nomenclatura usada para designar os ácidos gordos foi: X:Y ω Z, onde X indica o número de átomos de carbono, Y indica o número de ligações duplas e Z indica a posição das ligações duplas a partir do último grupo metil da cadeia.

Nos ácidos gordos de cadeia ramificada é utilizada a designação **iso** e **anteiso** quando existe uma ramificação metil ligada ao penúltimo (**iso**) ou antepenúltimo (**anteiso**) átomo de carbono (Christie, 1973).

2.4 Tratamento estatístico

Para testar a existência de diferenças significativas entre as duas espécies de microalgas e entre as diferentes fases de cultura, foi efectuada uma análise de variância - ANOVA com medições repetidas, para as variáveis: número de células, biomassa, peso seco / célula, proteína /célula, hidratos de carbono /célula, lípidos /célula e clorofila *a* /célula, considerando o efeito da espécie de alga. Considerou-se cada balão uma unidade experimental, testada repetidamente durante um período de tempo.

As análises estatísticas foram efectuadas apenas com resultados relativos às culturas em balão uma vez que, como será posteriormente discutido, não foi possível seguir todas as fases de crescimento das culturas em mangas.

Todas as análises estatísticas foram efectuadas com o programa SAS (1988).

3. RESULTADOS

3.1 Temperatura

Ao longo da experiência a temperatura manteve-se dentro dos limites anteriormente referidos, $18 \pm 2^\circ \text{C}$ na sala 1 (balões) e $20 \pm 2^\circ \text{C}$ na sala 2 (mangas). Foram, no entanto, observadas algumas variações pontuais que são inevitáveis quando se trabalha à escala de produção industrial onde é mais difícil manter estáveis as condições ambientais.

3.2 Salinidade

Os valores de salinidade não se mantiveram constantes ao longo do crescimento da cultura. Registou-se um aumento gradual da salinidade com a evolução da cultura que por vezes atingiu 35 ppm, tanto nos balões como nas mangas.

3.3 pH

Os valores de pH obtidos ao longo do crescimento da cultura estão representados na figura 4. Os valores de pH variaram entre 7.3 - 9.3 em T.ISO balão, 6.8 - 8 em T.ISO manga, 7.5 - 9.4 em CHL balão e 7 - 8.3 em CHL manga. Registou-se, em ambas as espécies, um aumento do pH na fase inicial de crescimento das culturas.

Os valores de pH nas mangas foram nitidamente mais baixos que o dos balões, em ambas as espécies.

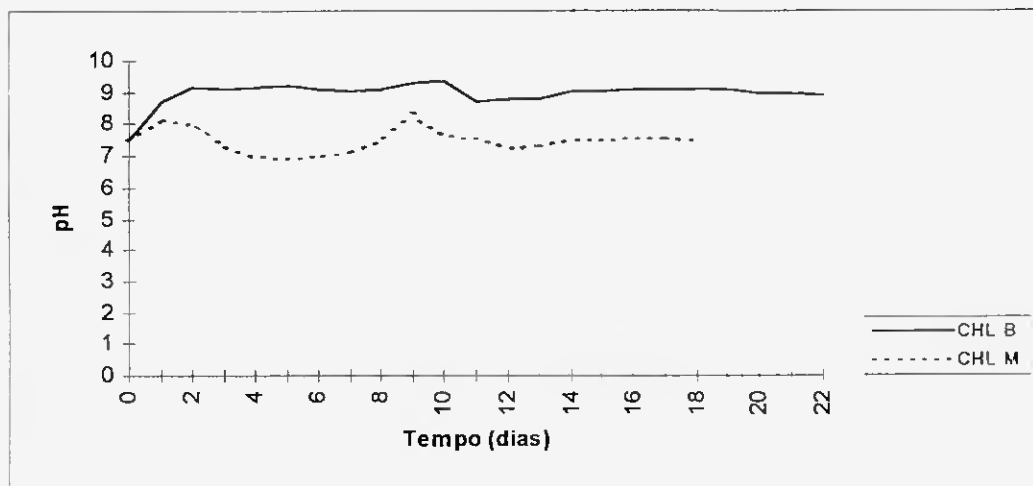
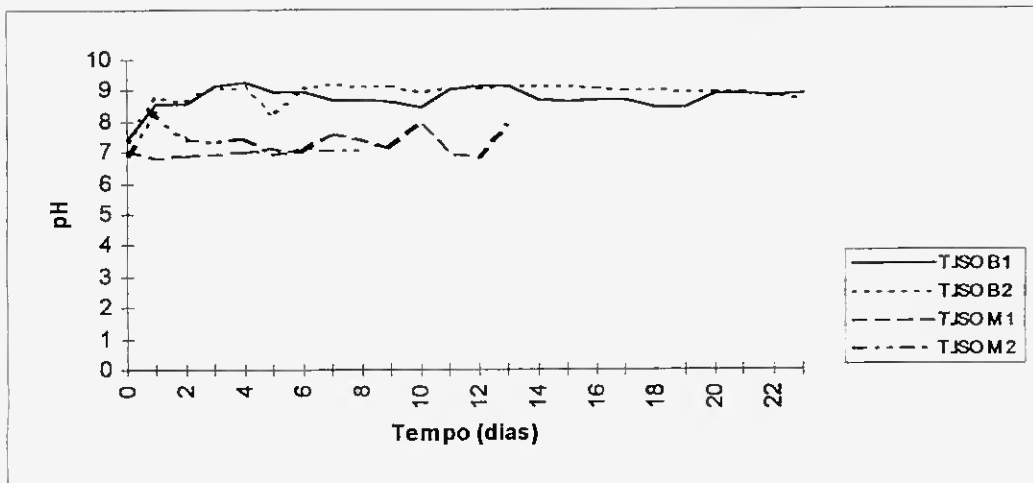


Figura 4 - Evolução do pH (média dos replicados), nas culturas em balões (B) e em mangas (M) das duas espécies de microalgas estudadas.

3.4 Crescimento

As curvas de crescimento das microalgas encontram-se representadas na figura 5. Cada curva representa valores médios da concentração celular dos diferentes replicados.

A densidade mais elevada foi alcançada na fase estacionária avançada da espécie *Chlorella sp.* cultivada em balão, que atingiu 58×10^6 células/ml. A densidade máxima para a mesma espécie cultivada em mangas foi de 16×10^6 células/ml. Quanto à espécie *Isochrysis sp.* a densidade máxima atingida foi 45×10^6 células/ml em balão, e 10×10^6 células/ml em manga.

Devido aos problemas surgidos a nível do crescimento e às contaminações registadas nas mangas, não foi possível seguir as culturas em todas as fases de crescimento.

É importante notar a diferença das curvas de crescimento da espécie *Isochrysis* cultivada em mangas - T.ISO M1 e T.ISO M2, apresentando esta última um crescimento mais acentuado.

As constantes de crescimento e o tempo de duplicação registados para as duas espécies encontram-se na Tabela I. Os valores das constantes de crescimento da espécie *Isochrysis sp.* foram superiores nos ensaios T.ISO B1e T.ISO M2 relativamente a T.ISO B2 e T.ISO M1.

Tabela I - Constantes de crescimento exponencial (K (dia^{-1})) e tempo de duplicação (t.d. (dia)), valores médios, das diferentes culturas de microalgas estudadas.

ENSAIOS	K	t.d.
T.ISO B1	.88	1.36
T.ISO B2	.58	1.72
T.ISO M1	.40	2.51
T.ISO M2	.83	1.20
CHL B	.73	1.37
CHL M	.63	1.59

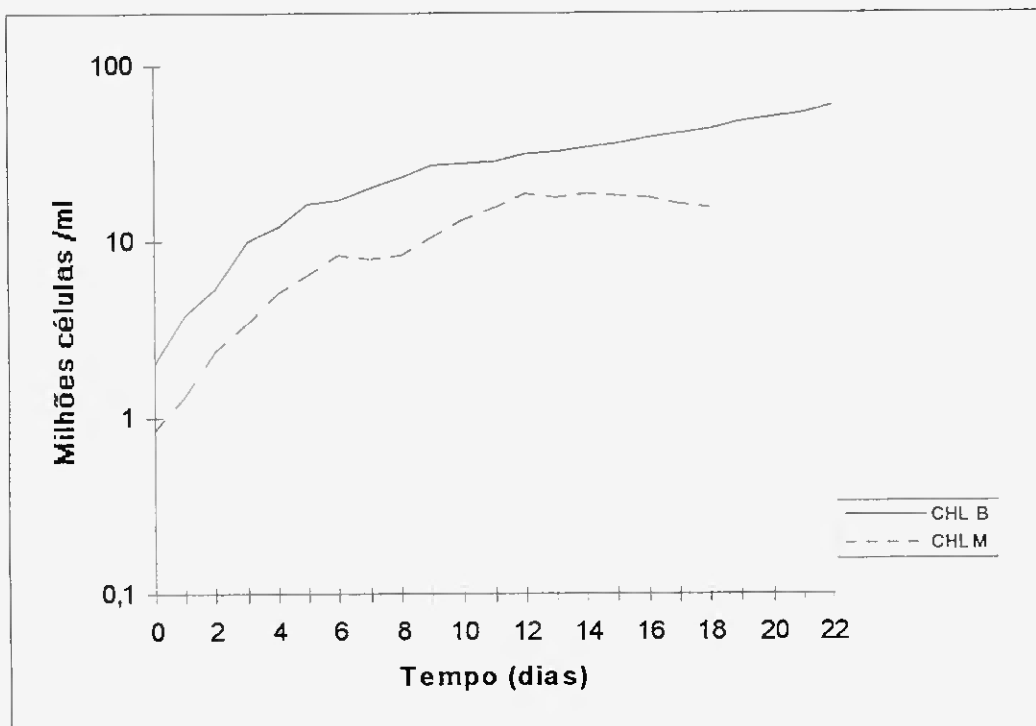
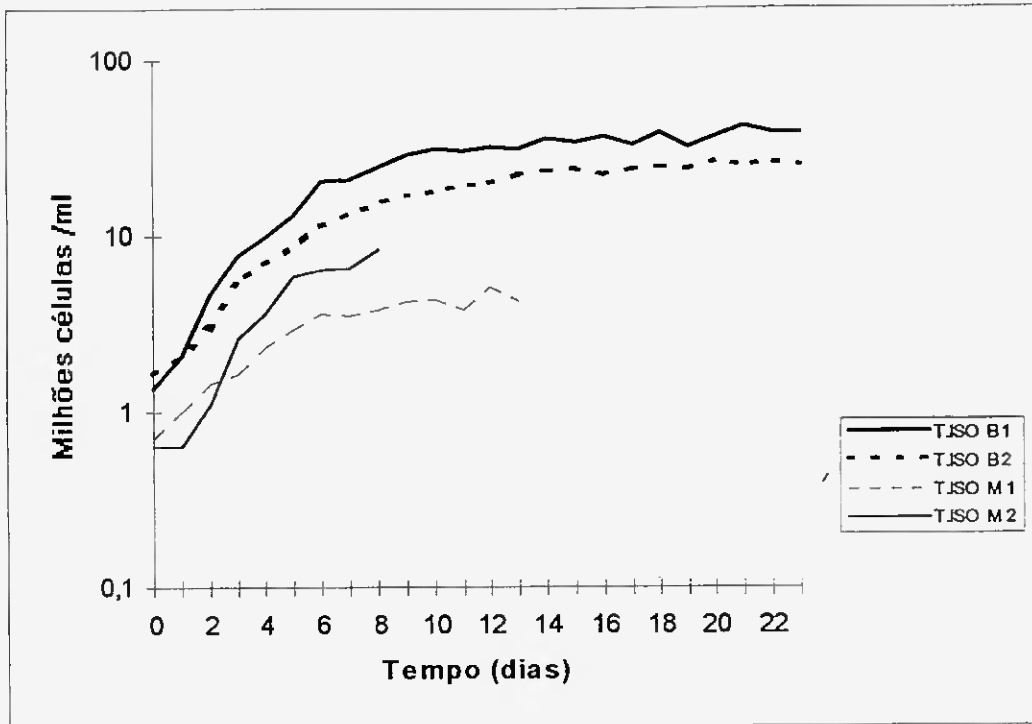


Figura 5 - Curvas de crescimento (escala logarítmica) de *Isochrysis* sp. (T.ISO) e *Chlorella* sp. (CHL), das culturas em balões (B) e em mangas (M) .

3.5 Biomassa

A biomassa, expressa em peso seco de alga por ml, aumentou com o desenvolvimento da cultura (Fig. 6). A espécie *Chlorella sp.*, tanto em balão como em manga, atingiu valores de biomassa bastante superiores aos da *Isochrysis sp.*, tendo sido atingido o valor máximo de 1700 µg peso seco /ml. É também possível verificar a existência de diferenças entre os valores de biomassa obtidos nos balões e nas mangas, atingindo estes últimos valores bastante inferiores aos dos balões.

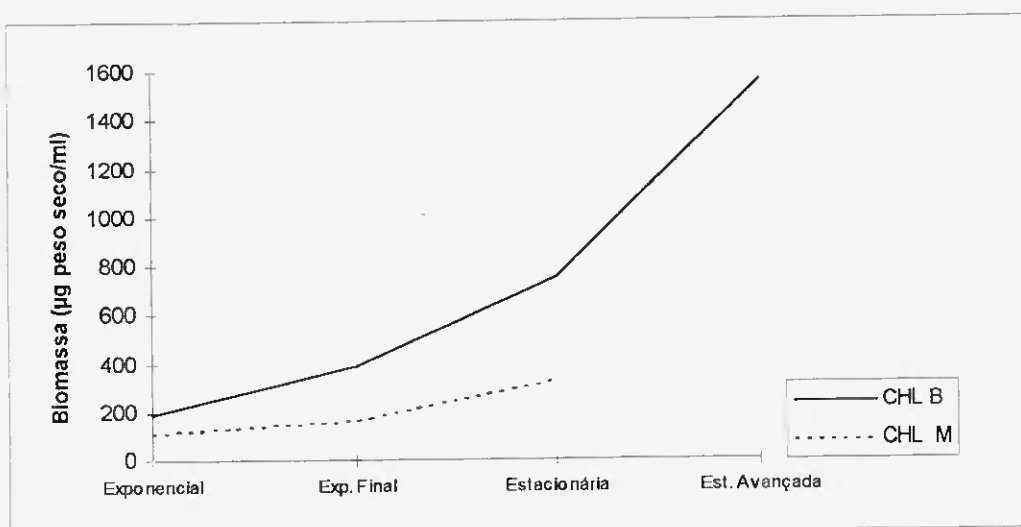
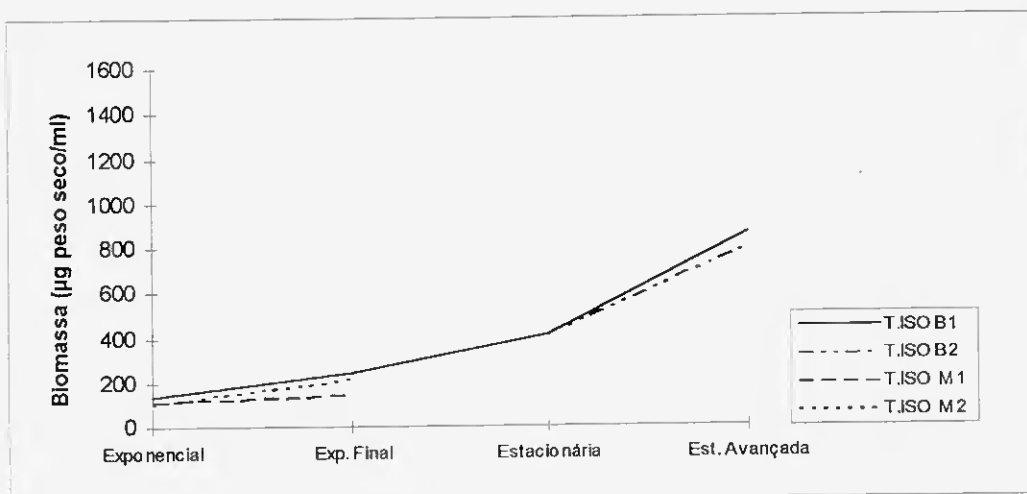


Figura 6 - Evolução da biomassa das duas espécies estudadas, nas culturas em balões (B) e em mangas (M).

3.6 Peso seco

Os resultados dos pesos secos encontram-se representados na Figura 7. Os pesos secos por célula, para ambas as espécies cultivadas em balões, foram máximos na fase estacionária avançada, onde se obtiveram valores de 35 pg/célula para *Isochrysis* e 26 pg/célula para *Chlorella sp.*.

O peso seco por célula diminuiu sempre entre a fase exponencial e a fase exponencial final, excepto no ensaio CHL B. Nos casos em que foi medido, o peso seco aumentou entre a fase estacionária e a fase estacionária avançada, com excepção de CHL B.

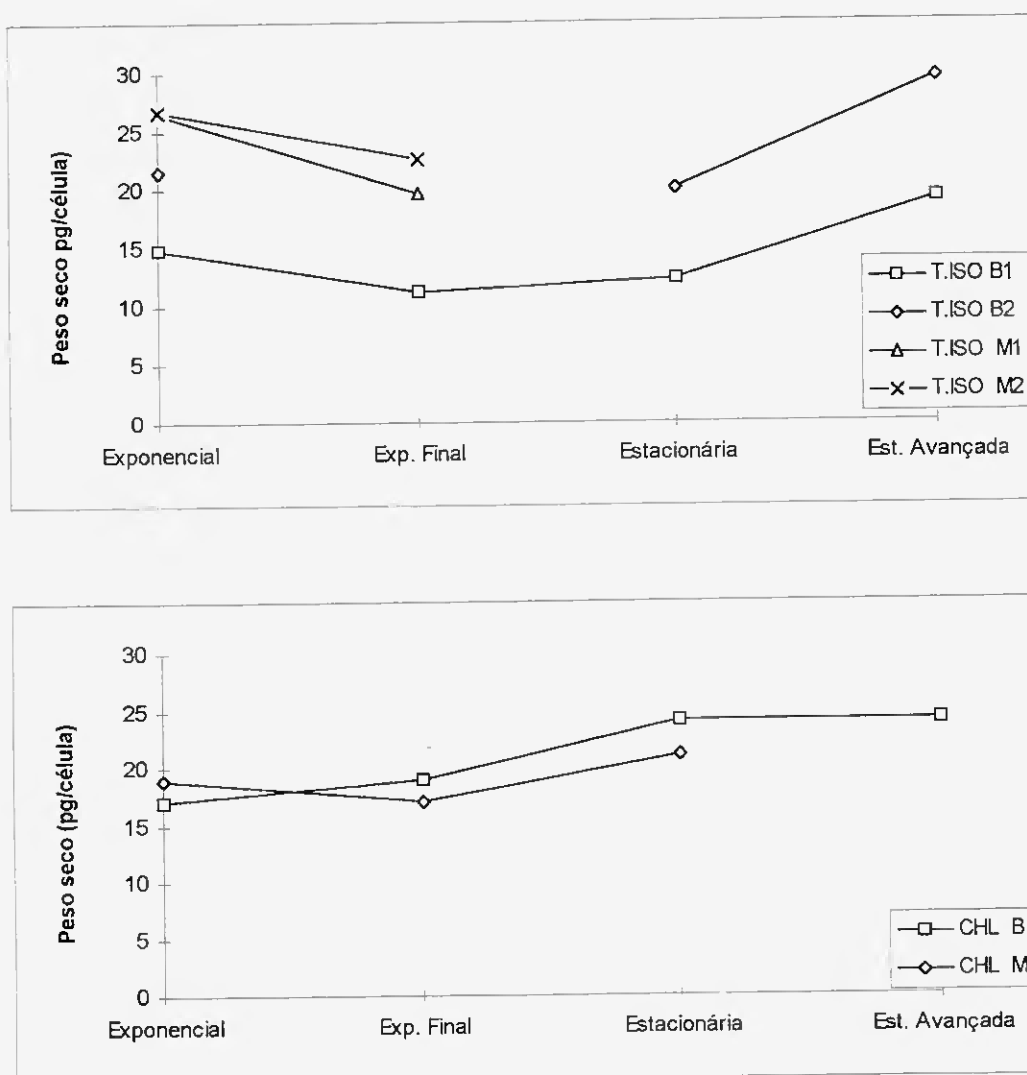


Figura 7 - Evolução do Peso seco por célula ao longo do período de amostragem nas culturas em balões (B) e em mangas (M), das duas espécies estudadas.

3.7 Teores pigmentares

Na figura 8 estão representados os valores de clorofila *a* por célula, para ambas as espécies. Nas microalgas cultivadas em balões, a quantidade de clorofila *a* por célula variou com a idade da cultura, sendo os máximos observados na fase estacionária avançada, onde se obtiveram valores de 0.96 pg/célula para *Isochrysis* e 0.57 pg/célula para *Chlorella sp.*. Em relação às mangas, também se observa o aumento de clorofila *a* com a idade da cultura, apesar de este aumento ser pouco acentuado na espécie *Isochrysis*.

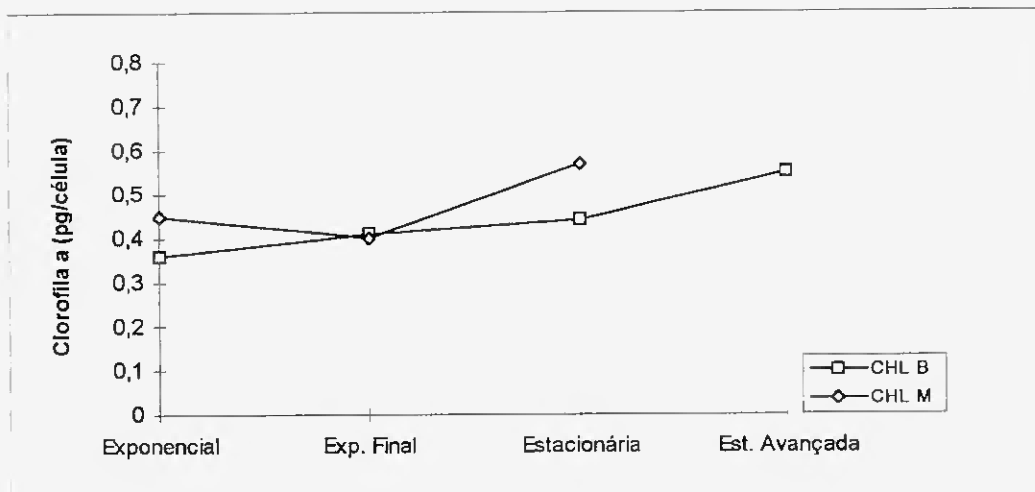
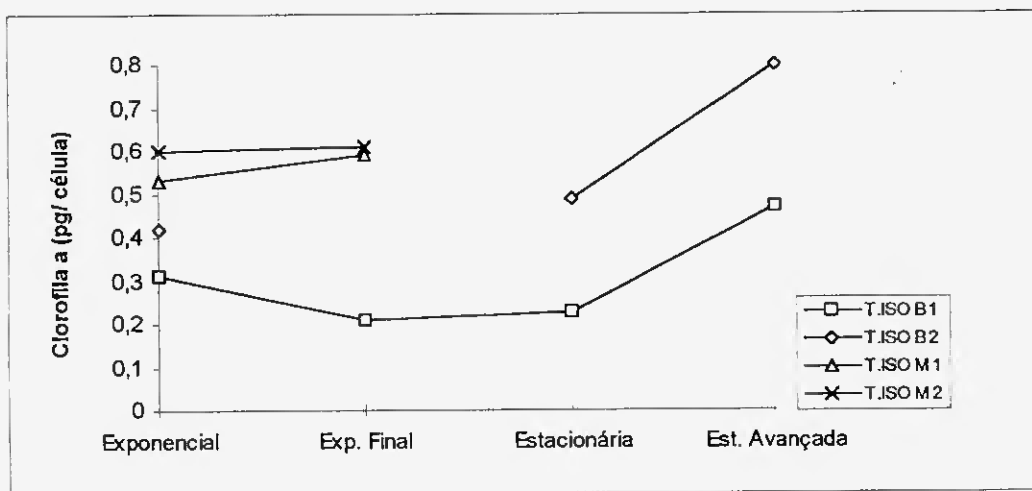


Figura 8 - Evolução da clorofila *a* por célula, ao longo do período de amostragem, nas culturas em balões (B) e mangas (M), das duas espécies estudadas.

3.8 Composição em proteínas, hidratos de carbono e lípidos

A composição bioquímica das microalgas cultivadas em balão encontra-se representada na Figura 9.

Registaram-se diferenças significativas entre as duas espécies. A espécie *Isochrysis* sp. é mais rica em lípidos, os quais representam uma fracção bastante elevada da composição bioquímica desta espécie. Por seu lado, a espécie *Chlorella* sp. é mais rica em hidratos de carbono, os quais constituem um dos componentes bioquímicos mais importantes desta microalga.

No que diz respeito à evolução da composição bioquímica com a idade da cultura, verificou-se para a espécie *Isochrysis* sp. em ambos os ensaios, um aumento acentuado do teor em lípidos e hidratos de carbono da fase exponencial para a fase estacionária avançada.

Na espécie *Chlorella* sp. notou-se apenas o aumento em hidratos de carbono com o envelhecimento da cultura. Os lípidos e proteínas não apresentaram nenhuma tendência de variação nesta espécie.

Notou-se, ainda, o aumento do conteúdo em matéria orgânica por célula, observado na fase estacionária avançada em todos os ensaios.

Relativamente à composição bioquímica das algas cultivadas em mangas (Fig. 10), não foi possível seguir todas as fases de crescimento e também não é possível observar nenhuma evolução da composição bioquímica celular. Nota-se no entanto, na espécie *Chlorella* sp. um aumento ligeiro do conteúdo total de matéria orgânica na fase estacionária.

Tal como nos balões, também nas mangas se observa uma predominância do conteúdo em lípidos na espécie *Isochrysis* sp. e de hidratos de carbono em *Chlorella* sp..

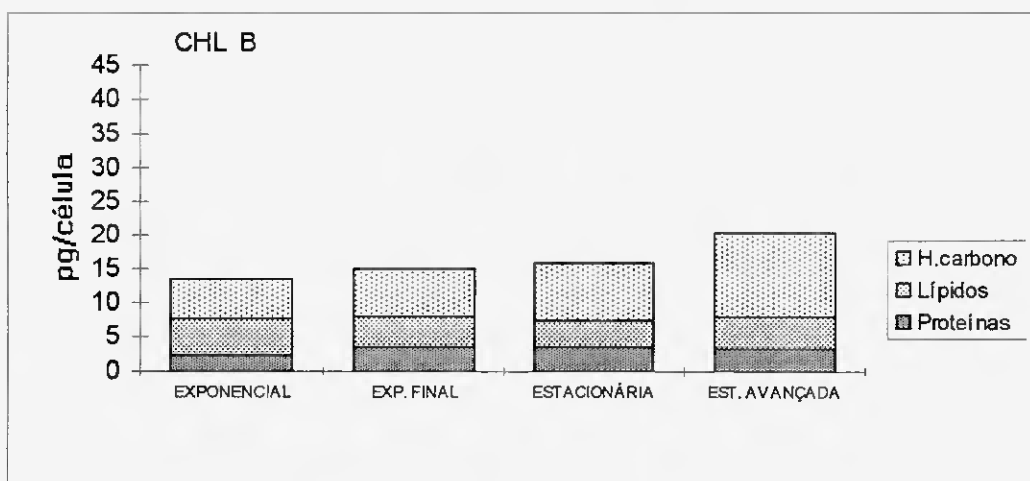
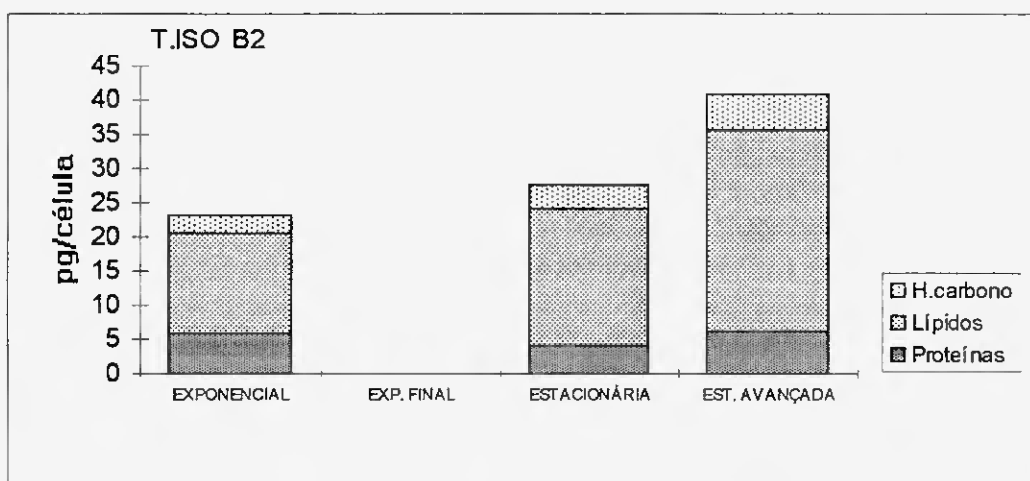
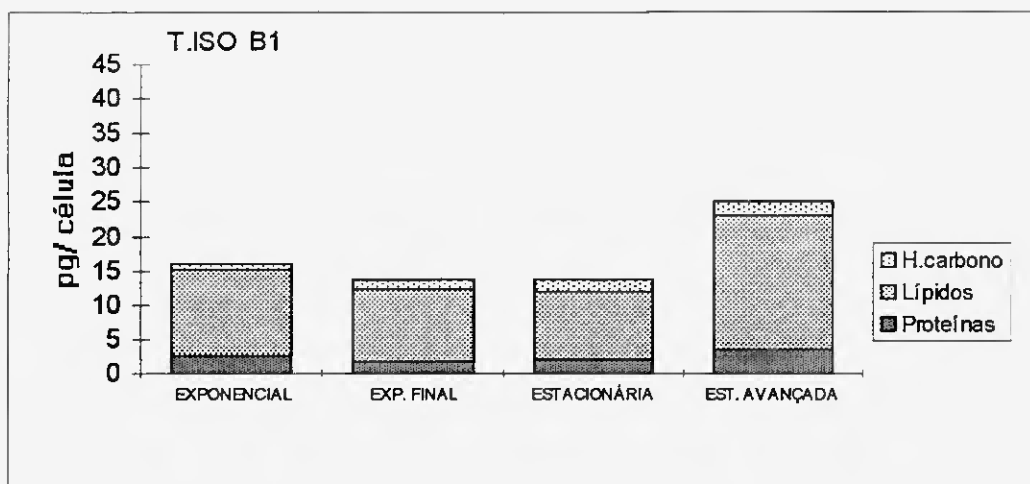


Figura 9 - Composição bioquímica (pg/célula de proteínas, hidratos de carbono e lípidos) das duas espécies de microalgas, nas diferentes fases de crescimento (culturas em Balões).

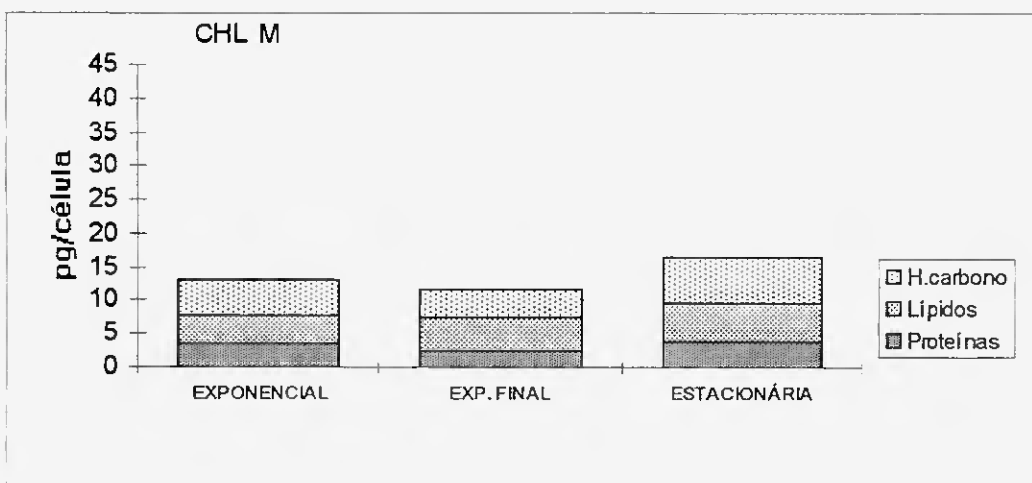
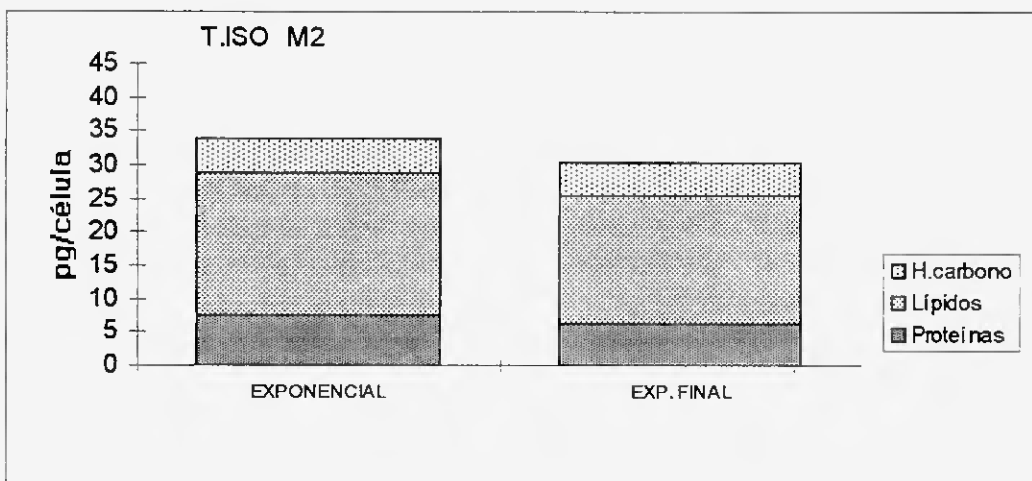
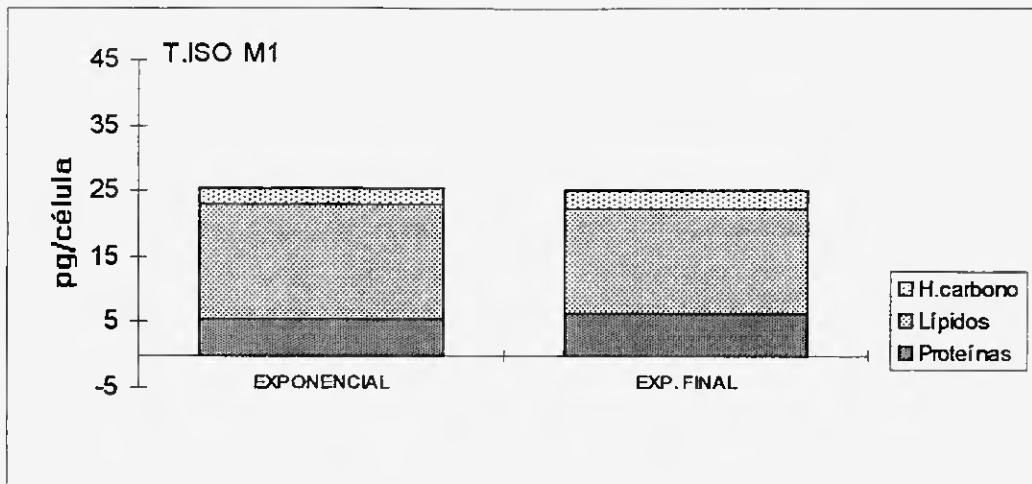


Figura 10 - Composição bioquímica (pg/célula de proteínas, hidratos de carbono e lípidos) das duas espécies de microalgas, nas diferentes fases de crescimento (culturas em Mangas).

3.9 Composição em ácidos gordos

Na Tabela II são apresentados, em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco, os valores da composição em ácidos gordos saturados, monoinsaturados, e poliinsaturados.

Da análise dos resultados pode-se observar que os valores de ácidos gordos totais são bastante superiores na espécie *Isochrysis sp.*, variando entre 59,6 e 112,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco nesta espécie, e entre 22,8 e 46,4 na espécie *Chlorella sp.*.

A composição em ácidos gordos totais aumentou, nos ensaios realizados em balão, na fase estacionária avançada das duas espécies. Nas culturas realizadas em mangas o conteúdo em ácidos gordos foi mais elevado na fase exponencial, tendo o ensaio T.ISO M2 constituído uma excepção, com os valores a aumentarem de 59.6 para 106.6 5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco na fase exponencial final.

Tabela II - Composição em ácidos gordos ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco) saturados, monoinsaturados e poliinsaturados das microalgas *Isochrysis sp.* (T.ISO) e *Chlorella sp.*. Onde **Exp.**- Fase Exponencial; **Exp. Final** - Fase exponencial final; **Est.** - Fase Estacionária; **Est. ava.** - Fase Estacionária avançada

	<i>Chlorella sp.</i>				<i>Isochrysis sp. (T.ISO)</i>					
	BALÃO		MANGA		BALÃO 2		MANGA 1		MANGA 2	
	Exp.	Est. ava.	Exp.	Est.	Exp.	Est. ava.	Exp.	Exp.final	Exp.	Exp.final
Ácidos gordos saturados										
Subtotal	7,545	13,475	13,03	12,67	32,06	32,195	33,44	26,66	30,37	32,77
Ácidos gordos monoinsaturados										
Subtotal	3,31	4,26	3,04	4,39	15,50	21,58	17,51	15,27	16,23	20,61
Ácidos gordos poliinsaturados										
Subtotal	11,99	22,20	30,37	18,84	48,92	58,75	51,00	42,50	13,00	53,21
Total	22,84	39,93	46,44	35,90	96,48	112,52	101,95	84,43	59,60	106,59

Na Tabela III são apresentados em percentagem (%) todos os ácidos gordos identificados, assim como a abundância relativa em ácidos gordos saturados, monoinsaturados, e poliinsaturados. Ambas as espécies possuem valores de ácidos gordos poliinsaturados superiores aos ácidos gordos saturados e monoinsaturados. O ensaio T.ISO M2 em fase exponencial é a única exceção, apresentando como mais elevados os valores de ácidos gordos saturados.

O principais ácidos gordos identificados na espécie *Isochrysis sp.* (T.ISO) foram: 14:0, 16:0, 16:1 ω 7, 18:1 ω 9, 18:2 ω 6, 18:3 ω 3, 18:4 ω 3 e 22:6 ω 3 e em *Chlorella sp.* foram 16:0, 16:3 ω 1, 18:1 ω 9, 18:2 ω 6, 18:3 ω 3 e 18:4 ω 3.

Observaram-se alterações das quantidades relativas de alguns ácidos gordos entre a fase exponencial e estacionária. No ensaio T.ISO B2 registou-se um pequeno decréscimo de ácidos gordos saturados, e um ligeiro aumento dos monoinsaturados da fase exponencial para a fase estacionária avançada. Neste ensaio, apesar de o total de ácidos gordos poliinsaturados não variar, registou-se um aumento de C18:2 ω 6 e C18:3 ω 3 e um decréscimo de C18:4 ω 3 e C22:6 ω 3 na fase estacionária avançada.

No ensaio T.ISO M1 não se observou nenhuma variação em termos percentuais da composição em ácidos gordos, entre as duas fases estudadas. O mesmo não se observa no ensaio T.ISO M2, onde se registou um aumento em ácidos gordos monoinsaturados (16 para 20%) e poliinsaturados (13 para 53 %) no final da fase exponencial. É de realçar que, nestes dois ensaios, a variação dos totais de ácidos gordos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados acompanha a variação dos principais ácidos gordos de cada grupo.

Em relação à microalga *Chlorella sp.* cultivada em balão, observam-se apenas pequenas variações dos ácidos gordos saturados e monoinsaturados, entre as duas fases de crescimento estudadas. Nos ácidos gordos poliinsaturados, com a exceção do 18:2 ω 6 que aumenta e do 16:3 ω 1 que baixa na fase estacionária avançada, também não se registam variações importantes.

No ensaio realizado em mangas, registou-se um aumento dos ácidos gordos saturados e monoinsaturados na fase estacionária avançada. Por outro lado, foi nesta fase que se registaram valores mais baixos dos principais ácidos poliinsaturados, com exceção do ácido gordo C18:2 ω 6.

É importante notar a ocorrência de ácidos de cadeia ramificada iso e anteiso, em especial i17:0 e a17:0, que registou valores elevados na microalga *Chlorella sp.*.

Tabela III - Composição percentual em ácidos gordos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados das microalgas *Isochrysis* sp. (T.ISO) e *Chlorella* sp.. Onde Exp.- Fase Exponencial; Exp. Final - Fase exponencial final; Est. - Fase Estacionária; Est. ava. - Fase Estacionária avançada; i-iso ; a - anteiso

FASE	<i>Chlorella</i> sp.				<i>Isochrysis</i> sp. (T.ISO)					
	BALÃO		MANGA		BALÃO 2		MANGA 1		MANGA 2	
	Exp.	Est. ava.	Exp.	Est.	Exp.	Est. ava.	Exp.	Exp.final	Exp.	Exp.final
12:0	0,34	0,38	0,28	0,31	0,06	0,07	0,05	0,07	0,07	0,03
13:0	1,47	1,49	1,59	1,36	0,84	1,13	1,05	1,26	0,07	0,97
14:0	2,31	3,03	2,35	2,92	20,05	16,52	20,00	18,31	31,61	19,02
i15:0	0,20	0,15	0,28	0,00	0,58	0,48	0,67	0,63	0,00	0,65
a15:0	0,65	0,51	0,69	1,06	0,32	0,76	0,37	1,08	0,15	0,45
15:0	0,18	0,23	0,13	0,33	0,24	0,39	0,29	0,41	0,40	0,35
i16:0	0,89	0,88	0,93	0,78	0,50	0,70	0,68	0,72	0,20	0,61
a16:0	0,48	0,12	0,11	0,06	0,04	0,09	0,06	0,09	0,08	0,07
16:0	15,90	14,21	14,45	15,79	9,51	8,09	8,70	7,91	17,62	7,95
i17:0	2,99	3,67	2,95	4,90	0,09	0,16	0,09	0,21	0,35	0,10
a17:0	4,46	7,64	3,57	6,18	0,25	0,14	0,29	0,20	0,12	0,15
i18:0	0,64	0,49	0,39	0,39	0,26	0,34	0,26	0,36	0,02	0,21
18:0	0,80	0,88	0,28	0,58	0,30	0,25	0,26	0,27	0,27	0,15
20:0	0,90	0,05	0,06	0,61	0,05	0,04	0,02	0,05	0,00	0,06
22:0	0,00	0,39	0,00	0,00	0,35	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Subtotal	32,21	34,13	28,06	35,29	33,44	29,15	32,80	31,58	50,96	30,74
Ácidos gordos monoinsaturados										
14:1 ω 5	0,34	0,22	0,32	0,19	0,05	0,12	0,10	0,18	0,30	0,08
15:1	0,88	0,63	0,54	0,50	0,36	0,54	0,44	0,58	0,08	0,44
16:1 ω 9	0,44	0,37	0,00	2,73	0,07	0,04	0,09	0,11	0,00	0,00
16:1 ω 7	1,15	2,67	1,96	1,42	3,75	6,81	5,28	6,63	2,68	5,96
16:1 ω 5	1,74	0,18	0,02	0,06	0,04	0,04	0,03	0,05	0,29	0,03
17:1 ω 8	0,74	0,60	0,11	0,22	0,14	0,15	0,12	0,27	0,23	0,08
18:1 ω 9	4,22	2,91	2,84	5,04	10,77	9,34	9,88	8,33	7,11	11,21
18:1 ω 7	1,84	1,70	0,58	1,39	0,61	1,59	1,10	1,78	0,00	1,41
18:1 ω 5	0,64	0,16	0,06	0,00	0,03	0,03	0,03	0,04	4,66	0,05
20:1 ω 9	0,35	0,49	0,06	0,31	0,02	0,14	0,02	0,04	0,96	0,01
20:1 ω 7	0,46	1,17	0,04	0,36	0,09	0,26	0,10	0,09	10,91	0,08
Subtotal	12,81	11,10	6,55	12,23	15,92	19,06	17,18	18,09	27,23	19,34
Ácidos gordos poliinsaturados										
16:2 ω 4	1,19	0,65	0,13	0,19	1,16	1,41	0,98	1,10	0,35	0,75
16:3 ω 1	14,17	11,49	15,46	10,72	0,00	0,50	0,00	0,00	0,23	0,69
16:4 ω 3	0,00	0,17	0,00	0,11	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
16:4 ω 1	0,44	0,27	0,02	0,06	0,11	0,45	0,00	0,32	0,00	0,23
18:2 ω 6	9,85	13,05	7,56	12,26	3,73	6,48	6,71	6,95	1,71	16,13
18:3 ω 3	18,62	18,71	24,14	15,57	8,18	14,05	9,17	10,70	1,66	8,44
18:4 ω 3	2,82	2,33	7,00	3,84	20,37	14,31	17,84	16,24	5,54	10,61
20:2 ω 6	0,64	1,08	0,13	0,70	0,14	0,25	0,12	0,01	0,94	0,04
20:3 ω 6	1,88	1,55	1,21	0,97	0,08	0,23	0,06	0,27	1,29	0,09
20:3 ω 3	1,04	2,06	0,65	1,23	0,15	0,24	0,00	0,41	2,30	0,07
20:4 ω 6	1,08	1,38	0,50	0,84	0,14	0,39	0,19	0,40	1,02	0,40
20:4 ω 3	1,86	1,30	2,67	1,50	0,04	0,26	0,00	0,31	2,18	0,03
20:5 ω 3	2,72	3,65	5,86	4,48	0,89	0,65	0,54	0,59	1,53	0,63
22:5 ω 3	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
22:6 ω 3	0,21	0,13	0,09	0,00	15,85	12,56	14,42	13,03	3,05	11,81
Subtotal	56,52	58,14	65,40	52,48	50,85	51,79	50,02	50,34	21,81	49,92

3.10 - Resultados da análise estatística

Os resultados obtidos mostram a existência de diferenças significativas na composição bioquímica entre as duas espécies, assim como entre as diferentes fases de cultura. Os replicados não foram significativamente diferentes.

Os resultados da análise estatística estão representados na Tabela IV. Para todas as variáveis analisadas o factor tempo foi significativo para valores de $p < 0.01$.

Tabela IV - Resultados da análise de variância. G.L - Graus de Liberdade; Pr - Probabilidade e F - Factor F

VARIÁVEL	G.L	F	Pr > F
Nº Células/ml	2	19.28	0.0194
Biomassa/ml	2	28.23	0.0113
Peso seco/célula	2	14.38	0.0290
Proteína/célula	2	295.05	0.0004
H. Carbono/célula	2	282.49	0.0004
Lípidos/célula	2	69.00	0.0031
Clorofila a /célula	2	10.95	0.0418

4. DISCUSSÃO

4.1 Parâmetros físico-químicos

O incremento do pH observado na fase exponencial pode ser atribuído à incorporação de CO₂ e NaNO₃ pelas células durante a fotossíntese. A adição de CO₂ no meio de cultura permitiu estabilizar o pH, após o incremento inicial registado em todas as culturas. Contudo, apesar do suplemento de CO₂, o pH nos balões situou-se um pouco acima dos níveis ideais. Os valores do suplemento de CO₂ referidos neste trabalho deverão estar sobrestimados uma vez que, para além de serem extremamente elevados, os valores de pH seriam muito mais baixos que os observados. Segundo Kain & Fogg (1958 *in* Fabregas *et al.*, 1985a), o crescimento de *Isochrysis* é inibido quando o pH é superior ou igual a 8.75. Num estudo com *Chlorella*, Guckert & Cooksey (1990) observaram a ocorrência de stress em culturas com pH elevado, o que resultou na inibição do ciclo celular e, indirectamente, na acumulação de triglicéridos.

As diferenças de pH registadas entre os balões e as mangas poderão ser resultantes de um menor consumo de CO₂ nas mangas devido à concentração celular inferior.

A adição de CO₂ ao meio de cultura, para além de baixar o pH, tem também uma influência sobre a composição bioquímica das algas. Segundo Hamza & Robin (1992), a síntese de lípidos nas algas é influenciada pelo CO₂, e parece aumentar com a disponibilidade deste no meio de cultura.

Os elevados valores de pH observados podem ter influenciado os resultados quer do crescimento quer da composição bioquímica, tornando-se mais difícil a interpretação dos resultados obtidos.

Se as algas dispuserem dos nutrientes necessários e o pH for mantido dentro dos níveis de tolerância da espécie, a produção máxima de uma cultura é determinada pela luz recebida (Harrison *et al.*, 1990). Como já foi anteriormente referido, realizou-se um segundo ensaio, T.ISO M2, por se considerar que as culturas em mangas apresentavam níveis de crescimento muito baixos. Uma das hipóteses consideradas para explicar estes resultados, foi a de a intensidade luminosa estar a funcionar como factor limitante do crescimento. Uma das possíveis causas desta deficiência é o grande diâmetro das mangas utilizadas, o que limita a penetração da luz. Apesar de no segundo ensaio, realizado com mangas de diâmetro e volume inferiores, se terem obtido melhores resultados de crescimento, não se pôde confirmar esta hipótese, uma vez que a temperatura também foi diferente. É possível que as diferenças no diâmetro da manga e da temperatura em conjunto, tenham contribuído para os resultados

obtidos. Este ensaio permitiu apenas mostrar que as condições em que esta espécie está a ser cultivada podem ser melhoradas, o que permitiria obter melhores resultados de crescimento das culturas.

O aumento de salinidade registado nas culturas é atribuído à evaporação que ocorre normalmente neste tipo de sistemas. Teria sido aconselhável evitar esta variação da salinidade. No entanto, neste estudo propunha-se estudar as microalgas nas condições em que estas eram produzidas na "hatchery" e não em condições óptimas e mais controladas, como seria o ideal. Num estudo com *Isochrysis*, Laing (1985) observou melhores crescimentos com salinidades situadas entre 15-30 ppm, registando-se um decréscimo significativo do crescimento com salinidades de 35 ppm. O aumento da salinidade registado com o evoluir das culturas, poderá também ter contribuído para a limitação do crescimento nesta espécie.

4.2 Condições de esterilidade

As culturas de microalgas analisadas neste estudo não foram realizadas em condições axénicas, uma vez que as condições de produção utilizadas na "hatchery" onde o trabalho foi realizado não o permitiam. Teria sido aconselhável que o estudo fosse realizado em culturas estéreis, uma vez que as culturas em massa realizadas em condições não estéreis estão mais susceptíveis à invasão por bactérias, algas competidoras ou por animais predadores, que poderão influenciar os resultados obtidos.

No presente trabalho foram detectados alguns casos de contaminação, especialmente por flagelados, que incidiram principalmente nas culturas realizadas em mangas. As contaminações, normalmente observadas a partir do 7º dia de cultura, impediram o prosseguimento do estudo numa percentagem relativamente elevada das mangas, tendo-se estudado apenas aquelas em que a contaminação não era evidente.

De entre as duas espécies estudadas, foi nas culturas com *Isochrysis sp.* que se observou um maior número de casos de contaminação por flagelados e onde estas atingiram níveis mais elevados. As contaminações observadas nas mangas impossibilitaram o estudo durante o período de tempo que se estipulou inicialmente, para abranger as diferentes fases de crescimento.

A ocorrência de valores elevados de ácidos gordos de cadeia ramificada iso e anteiso poderá indicar a existência de contaminação bacteriana, uma vez que estes ácidos gordos são constituintes característicos dos lípidos de bactérias (Abrahamsson *et al.* (1964) & Polgar, 1971 *in* Christie, 1973; Henderson *et al.*, 1993; Volkman *et al.* 1989). Os elevados valores

registados na microalga *Chlorella sp.* poderão significar elevados níveis de contaminação, que poderão ter influenciado os resultados de composição bioquímica obtidos.

Do ponto de vista da produção, o principal problema das culturas não estéreis e que estejam contaminadas com bactérias ou outros organismos, é a possibilidade de estas poderem ser prejudiciais para os animais a ser alimentados.

As implicações destas contaminações na "hatchery" onde este estudo foi realizado poderão não ser muito graves, uma vez que as culturas são utilizadas antes de os níveis de contaminação se tomarem elevados. No entanto, deverão ser feitos esforços no sentido de melhorar as condições de assepsia, o que poderia ser conseguido através de um maneio mais cuidadoso e condições de higiene mais rigorosas.

4.3 Eustigmatophyceae versus Chlorophyceae

Com o decorrer do trabalho e da análise dos resultados obtidos, observou-se que a espécie identificada como "*Nannochloropsis gaditana*" não apresentava algumas das características diagnosticantes das Eustigmatophyceae, nomeadamente a existência de quantidades vestigiais dos ácidos gordos poliinsaturados C20:5 ω 3 e que se encontram em quantidades apreciáveis na Classe Eustigmatophyceae, e em especial no Género *Nannochloropsis* (Dunstan *et al.*, 1993; Mourente *et al.*, 1990; 1993).

A composição dos ácidos gordos da microalga inicialmente identificada como "*Nannochloropsis gaditana*" identifica-se mais com o padrão típico da classe Chlorophyceae, em especial do género *Chlorella*, cujos representantes são em geral deficientes em ácidos gordos poliinsaturados C20 e C22 (James & Abu-Rezeq, 1988; Dunstan *et al.*, 1993), em particular em C20:5 ω 3 e C22:6 ω 3 (Mourente *et al.*, 1990). Por outro lado, esta classe contém grandes quantidades de ácidos gordos C16 e C18 (Chu & Dupuy, 1980; Cojocarú *et al.*, 1988; Menzel & Wild, 1989), que são os principais ácidos gordos observados na microalga estudada.

Por outro lado, as culturas de *Nannochloropsis gaditana* caracterizam-se frequentemente por alterações de cor com o avançar da idade, o que é causado pela diminuição de clorofila *a* e pelo aumento relativo dos carotenoides. Este fenómeno, observado nas Eustigmatophyceae, deve-se à ausência de clorofila *b* ou *c*, as quais, quando presentes, por se degradarem mais lentamente permitem que as culturas permaneçam verdes/castanhas durante mais tempo (Lubián & Establier, 1982; 1983). Nas culturas estudadas não foram observadas as alterações de cor características das culturas de *Nannochloropsis gaditana*, que passam de verde a castanho/avermelhado. A quantificação de clorofila *b* teria

sido um bom indicador na identificação da classe mas, como já foi anteriormente referido, não foi possível quantificar este pigmento.

Tendo em conta os resultados de ácidos gordos e de comportamento das algas em cultura, considera-se haver uma forte possibilidade da existência de um engano na designação da microalga estudada, não se tratando de uma Eustigmatophyceae mas sim de uma Chlorophyceae.

4.4 Crescimento das culturas

Os resultados de crescimento das microalgas obtidos neste estudo situaram-se, em geral, dentro dos valores normais para as espécies estudadas.

As diferenças nas condições de cultivo, nomeadamente o volume de cultura e os parâmetros físico-químicos, entre este estudo e os numerosos estudos publicados (Brown *et al.*, 1993b; Sukenik & Wahnou, 1991), limitam possíveis comparações de resultados. Quando sujeitas a diferentes condições as microalgas poderão ter diferentes respostas, apresentando valores de crescimento e composição química muito diferentes.

Na produção massiva de microalgas ocorre uma redução considerável da penetração da luz na cultura, designada por autoensombramento devido ao aumento do número de células na cultura. A diminuição da luz provoca um declínio da actividade fotossintética, reduzindo a energia disponível para a síntese proteica e crescimento e provocando, por outro lado, um aumento da síntese de clorofilas (Dubinsky, 1989; Sukenik & Wahnou, 1991).

Em geral, o conteúdo em clorofila *a* das algas aumenta em condições sub-óptimas de luz, apesar de tal não corresponder necessariamente a um maior conteúdo da maquinaria enzimática responsável pelas reacções escuras da fotossíntese e a um aumento da taxa de crescimento (Beardall & Morris, 1976 *in* Lubián, 1986). O aumento acentuado da concentração de clorofila *a* observado nas culturas em fase estacionária avançada poderá sugerir que a luz funcionou como factor limitante do crescimento das culturas estudadas.

No que diz respeito às taxas de crescimento das microalgas estudadas é interessante notar a diferença existente entre as culturas de *Isochrysis* cultivadas em mangas com diferentes condições de cultivo (T.ISO M1 e T.ISO M2). A taxa de crescimento da cultura T.ISO M2, que cresceu com temperaturas mais altas, foi duas vezes superior à da cultura T.ISO M1. Considerando estes resultados, e tendo em atenção que a temperatura óptima de crescimento da espécie *Isochrysis sp.* (T.ISO) é de 26°C, poder-se-á afirmar que as

condições de temperatura a que esta espécie foi cultivada ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$ em T.ISO M1 e $23,5\pm 2^{\circ}\text{C}$ em T.ISO M2) não foram as mais favoráveis ao seu crescimento. Porém, é importante não esquecer que as condições mais favoráveis ao crescimento poderão não ser as mais favoráveis do ponto de vista bioquímico. Saoudi-Helis, *et al.* (1994), num estudo com *Isochrysis sp.* (T.ISO) observou alterações na composição dos ácidos gordos poliinsaturados com a taxa de crescimento. Do mesmo modo, Thompsom *et al.*, (1992b), num estudo com *Isochrysis sp.* (T.ISO) a crescer a diferentes temperaturas (10 a 25°C), verificou que a taxa de crescimento, a concentração de clorofila a e proteína aumentaram com a temperatura, sendo máximos a 25°C . No entanto, segundo o mesmo autor, as quantidades relativas dos ácidos gordos podem variar com a temperatura, verificando-se um aumento de alguns ácidos gordos com a diminuição da temperatura. Este autor registou para a espécie *Isochrysis sp.* (T.ISO), a 20°C , uma taxa de crescimento de 0.84. Este valor é muito aproximado aos obtidos nos ensaios T.ISO B1 (0.88) e T.ISO M2 (0.83).

No que diz respeito à diferença de volume e diâmetro das mangas entre os ensaios T.ISO M1 e T.ISO M2, as mangas mais pequenas possuem uma maior área superficial relativamente ao volume, tendo como consequência uma maior penetração da luz. Laing (1985) num estudo com *Isochrysis* (T.ISO) em regime semi-contínuo observou a existência de vantagens, a nível biológico e económico, em usar mangas de 80 l em oposição às de 250 l, uma vez que a produção máxima é a mesma, obtendo-se maiores densidades celulares num volume mais pequeno. Neste estudo obtiveram-se também densidades celulares mais elevadas nas mangas mais pequenas.

A temperatura e o tamanho da manga poderão em conjunto ter contribuído para as diferenças de crescimento observadas nestes dois sistemas.

Tendo em consideração estes resultados, pensa-se ser possível melhorar os resultados de crescimento das microalgas, através do aumento da temperatura e diminuição do tamanho das mangas.

A evolução da biomassa nas diferentes fases de crescimento é igual nas duas espécies. O aumento da biomassa, que foi bastante acentuado na fase estacionária avançada, terá resultado de um aumento do peso seco de cada célula.

Apesar de na espécie *Isochrysis sp.* (T.ISO), nos ensaios T.ISO B2 e T.ISO M1 e M2, se registarem valores de peso seco por célula superiores aos da espécie *Chlorella sp.*, esta última apresentou valores de biomassa superiores. O maior número de células existente nas culturas desta espécie poderão explicar estes resultados.

As diferenças registadas entre os ensaios T.ISO B1 e T.ISO B2, nomeadamente a taxa de crescimento que foi superior no ensaio T.ISO B1, e o peso seco/célula, conteúdo em clorofila a e a composição bioquímica que foram nitidamente superiores em T.ISO B2, apontam para a existência de células com características diferentes nos dois "lotes" estudados,

apesar de estas pertencerem à mesma espécie. Note-se que, apesar destes dois ensaios apresentarem diferenças em alguns parâmetros, a evolução dos mesmos nas diferentes fases de crescimento é igual nos dois ensaios.

Apesar de no ensaio T.ISO B1 se registarem valores de peso seco/célula inferiores a T.ISO B2, a biomassa é muito idêntica entre os dois ensaios T.ISO B1 e B2. A maior densidade celular alcançada em T.ISO B1 poderá explicar este resultado.

4.5 Composição bioquímica das microalgas

Os numerosos estudos relativos à composição bioquímica nas diferentes fases de crescimento, exponencial e estacionária revelam um comportamento padrão, observando-se um aumento da composição em lípidos e hidratos de carbono e a diminuição de proteínas na fase estacionária, devido à limitação em azoto (Utting, 1985; Brown *et al*, 1989, 1993b; Dubinsky, 1989). Quando uma cultura é privada de um nutriente essencial, interrompe-se a divisão celular, e a fracção de carbono transferida para os lípidos e hidratos de carbono aumenta, em detrimento da síntese de proteínas (Sukenic & Wahnou, 1991). No entanto, as culturas podem entrar em fase estacionária por outras razões que não sejam a limitação de nutrientes, podendo-se assim observar um desvio a este comportamento padrão.

De acordo com o que seria de esperar, detectou-se uma evolução da composição bioquímica das microalgas nas várias fases de crescimento, a qual apresentou, no entanto, alguns desvios relativamente ao padrão normalmente observado. A evolução da composição proteica das duas espécies de microalgas estudadas não apresentou nenhuma tendência de evolução, não sendo detectado o decréscimo característico da fase estacionária. O comportamento dos lípidos no ensaio CHL B também não apresentou nenhuma tendência de evolução, sendo provável que os resultados estejam subestimados, devido a um possível erro na extracção.

A razão para estas discrepâncias relativamente ao padrão normal não é clara, mas possivelmente a deplecção de nutrientes não foi o único factor limitante do crescimento das culturas. A diminuição da intensidade luminosa devido ao autoensombramento, associada aos valores de pH e salinidade, que atingiram nesta fase valores acima dos ideais, poderá ter contribuído para que as culturas entrassem em fase estacionária. Teria sido importante determinar a concentração de nutrientes do meio na fase estacionária para validar esta hipótese.

O estudo das alterações da composição química de uma alga nas diferentes fases de crescimento de uma cultura é muito complexo, uma vez que esta pode ser condicionada

simultaneamente por vários factores, como a exaustão de nutrientes, autoensombramento, acumulação progressiva de metabolitos no meio, entre outros. Os resultados obtidos neste estudo apontam para a possibilidade de as culturas terem entrado em fase estacionária devido a um conjunto de factores e não apenas à exaustão de nutrientes.

Nas culturas em volume limitado, as condições de cultivo, incluindo luz e disponibilidade de nutrientes, variam com o tempo. Nestas condições torna-se mais difícil analisar os resultados porque é impossível avaliar o efeito de cada parâmetro separadamente.

Nas culturas realizadas em mangas não foi possível observar nenhuma evolução dos parâmetros bioquímicos, o que é justificado pelo comportamento das culturas, nomeadamente o grande número de contaminações observadas.

Tentou-se comparar os resultados obtidos neste estudo com os apresentados por outros autores para as mesmas espécies. Este exercício revestiu-se de algumas dificuldades, uma vez que existem diferenças, entre os vários estudos, relativas às condições de cultivo (temperatura, luz, concentração de nutrientes), às técnicas de cultivo (contínuo, semi-contínuo e volume limitado), aos métodos analíticos ou à fase de crescimento estudada, que na maioria dos estudos se limita unicamente a uma fase de crescimento.

Apesar de as condições de crescimento serem muito distintas das do presente estudo, tentou-se comparar a composição bioquímica da espécie *Isochrysis* (T.ISO) com a registada noutros estudos. A composição em proteínas e hidratos de carbono é idêntica à observada por Sukenik & Wahnou (1991) e Brown *et al.* (1993a), com a excepção do ensaio T.ISO B1 que apresenta valores mais baixos. No entanto, a composição em lípidos totais foi bastante superior à obtida por Sukenik & Wahnou (1991), Brown *et al.* (1993a) e Dunstan *et al.* (1993), que registaram valores entre 4.4 e 8.5 pg/célula.

A composição das microalgas em ácidos gordos é característica da espécie (Ben-Amotz *et al.*, 1987; Cojocarú *et al.*, 1988), ocorrendo alterações das quantidades relativas dos ácidos gordos poliinsaturados em células cultivadas em diferentes condições e durante as várias fases de crescimento (Cojocarú *et al.*, 1988). A composição em ácidos gordos é influenciada por factores como a luz (Thompson *et al.*, 1990), temperatura (Hoppe *et al.*, 1979, Thompson *et al.*, 1992b) e conteúdo em azoto no meio de cultura (Hoppe *et al.*, 1979). Segundo Thompson *et al.* (1992b) a variação da composição de ácidos gordos e em especial do grau de insaturação em função da temperatura é bastante complexo, sendo também função da taxa de crescimento.

A diminuição da percentagem dos ácidos gordos C18:4 e C22:6 em T.ISO B2 observada na fase estacionária avançada, terá resultado da diminuição da intensidade

luminosa, devido ao aumento da densidade celular observada nesta fase. Embora não tenha sido efectuada a quantificação dos nutrientes no meio de cultura, considera-se igualmente possível que a diminuição da sua concentração tenha contribuído para este resultado. Em vários estudos realizados com a espécie *Isochrysis* sp. (T.ISO) observou-se igualmente uma redução do conteúdo em 22:6 ω 3 quando sujeita a baixas intensidades luminosas (Harrison *et al.*, 1990; Thompson *et al.*, 1990). Sukenik & Wahnnon (1991), num estudo realizado com a mesma espécie, observaram uma diminuição da percentagem dos ácidos gordos C18:4 e C22:6, tipicamente associados a lípidos estruturais, quando sujeitos a uma limitação em azoto.

Segundo Shifrin (1984), os principais lípidos que tendem a acumular em situações de stress ambiental, como seja a deficiência em azoto, são os triacilglicerois com grandes fracções de ácidos gordos palmítico (C16:0) e linoleico (C18:2). Idênticas condições de stress ambiental e deficiência em azoto, que terão ocorrido na fase estacionária avançada, poderão explicar o aumento dos ácidos gordos C18:2 ω 6 registado em todos os ensaios deste estudo.

Os ensaios T.ISO M1 e T.ISO M2 apresentaram um padrão de variação dos ácidos gordos muito distinto. A elevada percentagem de ácidos gordos saturados registada no ensaio T.ISO M2 na fase exponencial resultou da existência de quantidades muito baixas de ácidos poliinsaturados como, se pode observar na Tabela III. Na fase exponencial final a quantidade de ácidos gordos poliinsaturados aumentou drasticamente, o que resultou no aumento percentual destes ácidos, assim como no decréscimo da abundância relativa dos ácidos gordos saturados, apesar de a sua abundância absoluta não ter variado muito. Estas diferenças entre os dois ensaios são justificadas pelas diferentes condições a que as culturas foram sujeitas. No entanto para se tirarem algumas conclusões seria necessário fazer um estudo mais pormenorizado e com todos os parâmetros ambientais devidamente controlados, a fim de se poder estudar o efeito da temperatura ou da luz na variação dos ácidos gordos.

Os resultados de ácidos gordos obtidos neste estudo para a espécie *Isochrysis* (T.ISO) são idênticos aos apresentados por outros autores, apesar de os trabalhos serem realizados em diferentes condições de cultura. Os principais ácidos gordos da espécie *Isochrysis* sp. (T.ISO) registados neste estudo 14:0, 16:0, 16:1 ω 7, 18:1 ω 9, 18:2 ω 6, 18:3 ω 3, 18:4 ω 3 e 22:6 ω 3, foram também os observados por Mourente *et al.*, (1990), Napolitano *et al.* (1990), Whyte & Nagata (1990), Thompson *et al.* (1990), Sukenik & Wahnnon (1991), Brown *et al.* (1993), Dunstan *et al.* (1993) e Reitan *et al.* (1993) para a mesma espécie (ver Tabela V). Os resultados obtidos para esta espécie enquadram-se bem nos perfis de ácidos gordos da Classe, sendo a acumulação de C22:6 ω 3 uma característica desta espécie.

Os resultados dos numerosos trabalhos existentes sobre composição das microalgas em ácidos gordos, são sempre apresentados como valores percentuais, pelo que se torna difícil comparar os resultados em termos quantitativos, sendo apenas possível analisar a

composição relativa em cada ácido gordo. Nas tabelas V, VI e VII é apresentada a composição nos principais ácidos gordos da espécie *Isochrysis* sp. (T.ISO), e de microalgas das Classes Chlorophyceae e Eustigmatophyceae obtidas por outros autores. Como não é possível incluir nas tabelas as condições de cultivo de cada trabalho, importa referir que estas variam de autor para autor. Os valores apresentados nas tabelas, relativos a este trabalho, são os obtidos na fase exponencial das culturas em balões.

Tabela V - Abundância relativa dos principais ácidos gordos em *Isochrysis* sp. (T.ISO) referidos por outros autores. Os valores são apresentados em percentagem de ácidos gordos totais.

Autores	14:0	16:0	16:1 ω 7	18:1 ω 9	18:2 ω 6	18:3 ω 3	18:4 ω 3	22:6 ω 3
Neste trabalho	20.05	9.51	3.75	10.77	3.73	8.18	20.37	15.85
Volkman <i>et al.</i> , 1989	16.00	14.50	4.20	20.10	2.50	3.60	17.40	8.30
Mourente <i>et al.</i> , 1990	21.70	8.80	4.30*	10.90	9.60	7.10	9.80	6.90
Napolitano <i>et al.</i> , 1990	15.80	10.80	2.70	11.00	3.94	5.40	14.31	20.47
Thompson <i>et al.</i> , 1990	17.60	10.30	0.82	22.00	6.29	3.07	8.47	14.38
Whyte & Nagata, 1990	15.47	8.33	3.77	8.89	8.72	7.72	18.55	10.84
Sukenik & Wahnou, 1991	16.70	12.30	3.50	22.70	4.80	—	18.90	16.20
Brown <i>et al.</i> , 1993a	17.00	13.30	5.80	11.40	1.60	4.80	20.10	12.90
Dunstan <i>et al.</i> , 1993	18.40	9.30	5.00	7.60	3.70	5.70	26.80	9.00
Reitan <i>et al.</i> , 1993	11.40	14.50	4.10	16.10	8.60	4.50	15.40	19.40

* Esta alga apresenta ainda 15.59 % do ácido gordo 18:3 ω 6

Da análise deste quadro é possível observar a existência de alguma variação das percentagem dos principais ácidos gordos, o que terá certamente resultado das diferentes condições em que as microalgas foram cultivadas. No entanto, os principais ácidos gordos da espécie são comuns em todos os trabalhos.

Tabela VI - Abundância relativa dos principais ácidos gordos de algumas Chlorophyceae, referidos por outros autores. Os valores são apresentados em percentagem de ácidos gordos totais.

Autores	Espécie	16:0	16:1 ω 7	16:3 ω 3	18:1 ω 9	18:2 ω 6	18:3 ω 3
Neste trabalho	<i>Chlorella</i> sp.	15.90	1.15	--	4.22	9.90	18.62
Chu & Dupuy, 1980	<i>Chlorella</i> sp.	26.68	2.70	2.25	9.18	6.98	12.70
Mourente <i>et al.</i> , 1990	<i>C. stigmatop.</i>	24.20	5.30	13.20	5.00	10.50	18.40
Whyte & Nagata, 1990	<i>C. sacharophi.</i>	40.77	4.48	--	2.67	19.32	2.98*
Volkman <i>et al.</i> , 1989	<i>Nann. atomus</i>	20.10	0.60**	14.40	4.90	10.30	21.70
Mourente <i>et al.</i> , 1990	<i>Nannochl. sp.</i>	28.30	0.80	11.20	4.30	25.60	15.30

*Esta alga apresenta ainda 15.59 % do ácido gordo 18:3 ω 6

** Esta alga apresenta ainda 8.9% do ácido gordo 16:1 ω 13

Tabela VII - Abundância relativa dos principais ácidos gordos de algumas Eustigmatophyceae, referidos por outros autores. Os valores são apresentados em percentagem de ácidos gordos totais.

Autores	Espécie	16:0	16:1 ω 9	16:1 ω 7	18:1 ω 9	20:5 ω 3
Neste trabalho	<i>Chlorella sp.</i>	15.90	0.44	1.15	4.22	2.72
Mourente <i>et al.</i> , 1990	<i>N. gaditana</i>	17.30	14.00	26.80	1.40	17.20
Mourente <i>et al.</i> , 1990	<i>N. oculata</i>	29.50	2.00	23.70	4.80	17.80
Dunstan <i>et al.</i> , 1993	<i>N. oculata</i>	16.40	--	21.8	2.1	39.80
Servel <i>et al.</i> , 1994	<i>Nannoch. sp.</i>	30.9	--	19.6	4.4	30.1

Na tabela VII pode-se observar a diferença existente entre os resultados obtidos neste estudo para a espécie *Chlorella sp.* e os resultados obtidos por Mourente *et al.* (1990) para a espécie *Nannochloropsis gaditana*. As principais diferenças entre a microalga estudada e as microalgas do género *Nannochloropsis* são relativas à percentagem dos ácidos gordos 16:1 ω 7 e 20:5 ω 3, que se encontram em grandes quantidades nas Eustigmatophyceae e em quantidades vestigiais na microalga estudada. Por outro lado, e apesar de algumas variações, a composição dos principais ácidos gordos da microalga estudada identifica-se mais com a das microalgas da classe Chlorophyceae como se depreende da análise da Tabela VI.

Uma vez que o valor nutricional de uma dada espécie depende do seu conteúdo em ácidos gordos, das duas microalgas estudadas, a espécie *Isochrysis sp.* (T.ISO) será a mais adequada como alimento para os organismos produzidos na "hatchery" estudada. A corroborar esta afirmação cita-se um estudo sobre indução da reprodução sexuada de *Brachionus plicatilis* (Ben-Amotz & Fichler 1982), em que se verificou que *Isochrysis galbana* suporta uma boa taxa de reprodução, sendo algumas espécies de *Chlorella* classificadas como dietas pobres.

4.6 Manipulação da composição bioquímica

A composição bioquímica das algas pode ser substancialmente alterada através da manipulação das condições de cultivo, uma vez que a sua composição é dependente da concentração de nutrientes (Fabregas *et al.*, 1985a), da composição do meio de cultura, temperatura, fotoperíodo, intensidade e comprimento de onda da luz e da fase de crescimento na altura da colheita (Mykelstad, 1974; Brown *et al.*, 1989).

Em culturas de volume limitado, a exaustão de nutrientes essenciais resulta na senescência celular, e quando a limitação de azoto é o primeiro factor limitante do crescimento observa-se um aumento da produção de lípidos. A temperatura, salinidade e luz

afectam a taxa de crescimento celular e determinam a taxa de depleção dos nutrientes, o início da senescência e o aumento do conteúdo lipídico.

Apesar de a exaustão de nutrientes levar à produção de maiores quantidades de lípidos, um prolongamento dessa carência, que ocorre em culturas de volume limitado, pode também levar à agregação das células, sedimentação súbita e aumento da contaminação bacteriana. Estes problemas podem ser reduzidos se forem utilizados outros parâmetros para manipular a composição em ácidos gordos das microalgas, como sejam os níveis de radiação e a temperatura. Apesar do padrão de ácidos gordos observados nas microalgas, as quantidades relativas dos mesmos podem variar com a temperatura, verificando-se um aumento de alguns ácidos gordos com a diminuição da temperatura (Thompson *et al.*, 1992b).

Os ácidos gordos poliinsaturados são considerados essenciais para o crescimento e sobrevivência de muitos animais marinhos. As microalgas, directamente ou via zooplankton são a principal fonte destes ácidos, tornando-se importante que o seu conteúdo seja maximizado (Watanabe, *et al.*, 1983, Dunstan *et al.*, 1993:).

A manipulação, quer das condições de cultivo, quer do regime de colheita, é importante do ponto de vista prático, uma vez que as proporções relativas dos vários nutrientes na dieta alimentar de um animal podem influenciar a sua taxa de crescimento. Por exemplo, as larvas de peixes necessitam de grandes quantidades de proteínas (Jobling, 1993) e ácidos gordos poliinsaturados, que se encontram em maior quantidade em algas na fase exponencial. Os hidratos de carbono são muito importantes na alimentação das ostras, as quais crescem mais rapidamente quando alimentadas com dietas mais ricas em hidratos de carbono do que em proteínas (Flaak & Epifanio, 1978; Wikfors *et al.*, 1984). Segundo Enright *et al.* (1986), os baixos níveis de hidratos de carbono observados em *Isochrysis* sp. (T.ISO) são responsáveis pelo crescimento medíocre de juvenis de *Ostrea edulis*. Das duas espécies de microalgas estudadas, a microalga *Chlorella* sp., mostrou-se, quando em fase estacionária avançada particularmente rica em hidratos de carbono e a espécie *Isochrysis* sp. (T.ISO) em fase estacionária avançada, rica em lípidos, muito importantes no crescimento de peixes, bivalves e crustáceos.

Apesar de já se conhecerem as necessidades nutritivas de muitos animais e a composição do seu alimento, persistem ainda muitas dúvidas. Uma vez conhecidas as necessidades nutritivas dos animais que se quer alimentar é importante saber como varia a composição química do alimento, neste caso das microalgas, com as diferentes condições de cultivo, para se poder manipular essas mesmas condições de forma a obter um alimento que vá ao encontro das necessidades do animal.

4.7 Algumas considerações sobre a colheita e cultivo das microalgas

Segundo Brown *et al.*, as taxas de produção (1993a) e a composição química (1993b) de microalgas cultivadas com regimes de iluminação L:D (Luz : Escuro), são semelhantes às das culturas sujeitas a iluminação contínua. Este autor observou que culturas de *Isochrysis* sp. (T.ISO) a crescer com fotoperíodos de 12:12 L:D contêm mais lípidos e menos hidratos de carbono que as culturas em regime iluminação contínua. Do mesmo modo Toro (1989 *in* Brown *et al.*, 1993a) sugere a utilização de ciclos de luz L:D em vez de iluminação contínua, o que permitiria reduzir os custos mantendo os mesmos níveis de produção. Dadas as vantagens económicas inerentes a uma alteração do regime contínuo para o regime L:D, sugere-se que se estude o efeito nos níveis de produção e até mesmo na composição bioquímica das microalgas produzidas na "hatchery" estudada, com o objectivo da sua implementação.

Nas "hatcheries" que utilizam microalgas na sua cadeia alimentar, é importante o conhecimento do comportamento das culturas nas várias fases de crescimento uma vez que podem ocorrer alterações importantes na composição bioquímica das algas com a fase de crescimento. A determinação das melhores condições de crescimento e da fase mais apropriada para a utilização (colheita) de microalgas cultivadas em massa e utilizadas como fonte alimentar em aquacultura, deve ter em consideração tanto a composição bioquímica, como as taxas relativas de produção das espécies.

A utilização das microalgas no correcto período da sua vida é importante do ponto de vista nutritivo e eficiente do ponto de vista de produção. A colheita de microalgas realiza-se frequentemente durante a fase exponencial ou início da fase estacionária (Ben-Amotz & Fishler, 1982; Yúfera & Pascual, 1984; Pozuelo & Lubián, 1993; Whyte, *et al.*, 1994), quando a densidade é suficientemente alta para o fornecimento de um volume razoável de cultura aos animais a alimentar, e antes que as células entrem em senescência e os metabolitos se comecem a acumular. Uma outra razão para a utilização das culturas na fase exponencial prende-se com o facto de, em geral, ser nesta fase que o seu conteúdo proteico é maior.

Tal como se referiu na Introdução, um dos principais objectivos deste trabalho foi encontrar uma resposta à questão " Qual a fase de crescimento das microalgas mais apropriada do ponto de vista nutritivo para a alimentação de larvas de peixe?". Da análise dos resultados de composição bioquímica obtidos, constata-se não haver nenhuma vantagem em alterar o regime de colheita utilizado (ao 7º dia), uma vez que as principais variações da composição bioquímica se observam apenas na fase estacionária avançada. Apesar de, nesta fase, se registarem os valores mais elevados de matéria orgânica total (proteínas, hidratos

de carbono e lípidos) por célula, as culturas já se encontram bastante envelhecidas e existe uma elevada probabilidade de ocorrer a morte súbita de toda a cultura. Adicionalmente, a manutenção das culturas durante um período tão longo seria impraticável e pouco eficiente do ponto de vista produtivo. Os resultados de ácidos gordos vêm reforçar esta afirmação, uma vez que, e apesar do conteúdo total em ácidos gordos poliinsaturados aumentar na fase estacionária avançada, se observou um decréscimo dos ácidos gordos da cadeia $\omega 3$ (18:3 $\omega 3$ e 22:6 $\omega 3$) nesta fase.

Pensa-se que, neste caso, a manipulação dos parâmetros físico-químicos seria mais eficaz do que a alteração do regime de colheita, na manipulação da composição bioquímica das microalgas produzidas.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em conta que o valor nutricional de uma dada espécie de alga depende do seu conteúdo em ácidos gordos, das duas microalgas analisadas, a espécie *Isochrysis* sp. (T.ISO) será a mais adequada como alimento para os organismos produzidos na "hatchery" estudada. A microalga *Chlorella* sp. apresentou algumas deficiências nutritivas principalmente em ácidos gordos poliinsaturados de cadeia longa (C20 e C22). No entanto, as deficiências nutritivas de uma microalga podem ser ultrapassadas através da utilização de várias espécies cuja composição seja complementar. A composição bioquímica das duas microalgas estudadas é um bom exemplo de duas microalgas que se completam, uma vez que uma é rica em hidratos de carbono e a outra em proteínas, lípidos e ácidos gordos da cadeia ω3.

Da análise dos resultados de composição bioquímica obtidos neste estudo, constata-se não haver vantagens em alterar o regime de colheita utilizado na "hatchery" estudada. Apesar de se ter registado na fase estacionária avançada um aumento do conteúdo em matéria orgânica por célula, nesta fase, as culturas já se encontram bastante envelhecidas e existe uma elevada probabilidade de ocorrer a morte súbita de toda a cultura. Por outro lado, a manutenção das culturas durante um período tão longo seria impraticável e pouco eficiente do ponto de vista produtivo. Pensa-se que, neste caso, a manipulação dos parâmetros físico-químicos seria mais eficaz do que a alteração do regime de colheita na manipulação da composição bioquímica das microalgas produzidas.

O facto de as microalgas estudadas terem sido produzidas numa "hatchery", impôs algumas limitações, as quais teriam sido minimizadas se o trabalho fosse realizado em condições laboratoriais, mais controladas. No entanto, neste estudo propunha-se estudar as microalgas nas condições em que estas eram produzidas na "hatchery" e não em condições óptimas. Uma das principais limitações com que nos deparámos foi a impossibilidade de estudar as culturas em condições de esterilidade, como seria aconselhável, uma vez que as culturas em massa realizadas em condições não estéreis estão mais susceptíveis à invasão por algas competidoras e outros organismos. Outra limitação foi a impossibilidade em manter estáveis alguns parâmetros, como a salinidade e o pH, o que poderá ter influenciado os resultados obtidos.

No decorrer deste trabalho detectaram-se alguns problemas na produção de microalgas na "hatchery" estudada, os quais afectaram de algum modo o trabalho realizado. Os principais problemas encontrados registaram-se ao nível do crescimento e de contaminações, os quais incidiram principalmente nas culturas realizadas em mangas. As implicações destas contaminações na cadeia alimentar da "hatchery" poderão não ser muito graves, uma vez que as culturas são utilizadas antes de os níveis de contaminação se tornarem elevados. No

entanto, deverão ser feitos esforços no sentido de melhorar as condições de assépsia. Relativamente aos problemas de crescimento, pensa-se que a produtividade das microalgas, principalmente da espécie *Isochrysis* sp. (T.ISO), pode ser substancialmente melhorada através da alteração de alguns parâmetros, como a temperatura e o volume de cultura. Apesar de o trabalho realizado não ter sido direccionado nesse sentido, sugere-se que se realizem estudos mais aprofundados do efeito do tamanho das mangas na produtividade das culturas, e da alteração de alguns parâmetros como a temperatura e regime de iluminação.

A manutenção de uma estrutura de produção intensiva de microalgas numa "hatchery" acarreta custos operacionais e organizacionais bastante elevados e muitas vezes para se reduzirem as despesas põe-se em causa o trabalho realizado. No decorrer deste estudo foi possível observar a ocorrência de problemas que poderiam ser facilmente solucionados se existisse um acompanhamento permanente de um técnico especializado. A detecção das causas dos problemas e o estudo no sentido de encontrar soluções para a resolução dos mesmos seria vantajoso em termos de produtividade, assim como do ponto de vista económico.

A produção de microalgas em grande escala implica custos elevados, havendo uma pressão no sentido de substituir as microalgas por outras dietas como os micro-encapsulados. No entanto, a substituição do alimento vivo por alimentos inertes ainda apresenta alguns problemas pelo que enquanto as novas dietas são produzidas e testadas, o cultivo de algas e rotíferos deverá permanecer em muitas "hatcheries".

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEN-AMOTZ, A.; R. FISHLER & A. SCHNELLER (1987) - Chemical composition of dietary species of marine unicellular algae and rotifers with emphasis on fatty acids. Marine Biology **95**: 31-36.

BLIGH, E.G. & W. J. DYER (1959) - A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. **37**: 911-917.

BRADFORD, M. (1976) - A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein dye-binding. Anal. Biochem., **72**: 248-254.

BROWN, M. R.; S. W. JEFFREY & C. D. GARLAND (1989). Nutritional aspects of microalgae used in mariculture; a literature review, CSIRO Marine laboratories. Report **205**, 44pp.

BROWN, M. R.; G. A. DUNSTAN; S. W. JEFFREY; J. K. VOLKMAN; S. M. BARRETT & J.-M. LEROI (1993a) - The influence of irradiance on the biochemical composition of the prymnesiophyte *Isochrysis sp.* (clone T.ISO). Journal Phycology **29**: 601-612.

BROWN, M. R.; C. D. GARLAND; S. W. JEFFREY; I. D. JAMESON & J.M. LEROI (1993b) - The gross and amino acid compositions of batch and semi-continuous cultures of *Isochrysis sp.* (clone T.ISO), *Pavlova lutheri* and *Nannochloropsis oculata*. Journal of Applied Phycology **5** : 285-296.

CHU, F-L. E. & J. L. DUPUY (1980) - The fatty acid composition of three unicellular algae species used as food sources for larvae of the American oyster *Crassostrea virginica*. Lipids **15**(5): 356-364.

COBELAS, M. A. & J. Z. LECHADO (1989) - Lipids in microalgae. A review I. Biochemistry. Grasas e Aceites **40**(2): 118-145.

COJOCARU, M.; M. SHLOSBERG; Z. DUBINSKY & A. FRINKEL (1988) - Gas chromatographic/mass spectrometric analysis of fatty acids found in aquatic algae. Biomed.- Environ.-Mass-Spectrom. **16** (1-12): 477-480.

CHRISTIE, W. W. (1973) - Lipid analysis. Isolation, separation, identification and structural analysis of lipids. Pergamon Press, Oxford, 338p.

DE PAUW, N.; J. MORALES & G. PERSOONE (1984) - Mass culture of microalgae in aquaculture systems: Progress and constraints. Hydrobiologia **116-117**: 121-134.

DHERT, P.; P. LAVENS; M. DURAY & P. SORGELOOS (1990) - Improved larval survival at metamorphosis of Asian seabass (*Lates calcarifer*) using W3-HUFA-enriched live food. Aquaculture **90**: 63-74.

DUBINSKY, Z. (1989) - The application of environmental stress in the biotechnological exploitation of microalgae. Program of the first International marine Biotechnology conference (I.M.B.C.) 306-308p.

DUNSTAN, G. A.; J. K. VOLKMAN; S. M. BARRETT & C. D. GARLAND (1993) - Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of the microalgae grown in mass culture. Journal of Applied Phycology **5**: 71-83.

ENRIGHT, C. T.; G. F. NEWKIRK; J. S. CRAIGIE & J.D. CASTELL (1986) - Evaluation of phytoplankton as diets for juvenile *Ostrea edulis* L. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **96**: 1-13.

FABREGAS, J. ; C. HERRERO; J. ABALDE & B. CABEZAS (1985a) - Growth, chlorophyll a and protein of the marine microalga *Isochrysis galbana* in batch cultures with different salinities and high nutrient concentrations. Aquaculture **50**:1-11.

FABREGAS, J.; C. HERRERO; B. CABEZAS & J. ABALDE (1985b) - Mass culture and biochemical variability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch) with high nutrient concentrations. Aquaculture **49**: 231-244.

FABREGAS, J.; C. HERRERO; J. ABALDE; R. LIAÑO & B. CABEZAS (1986a) - Biomass production and biochemical variability of the microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with high nutrient concentrations. Aquaculture **53**: 187-199.

FABREGAS, J., C. HERRERO, B. CABEZAS & J. ABALDE (1986b) - Biomass production and biochemical composition in mass cultures of the marine microalga *Isochrysis galbana* Parke at varying nutrient concentrations. Aquaculture **53**: 101-113.

FERNÁNDEZ-REIRIZ, M. J.; A. PEREZ-CAMACHO; M. J. FERREIRO; J. BLANCO; M. PLANAS; M.J. CAMPOS & U. LABARTA (1989) - Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. Aquaculture **83**:17-37.

FLAAK, A. R. & C. E. EPIFANIO (1978) - Dietary protein levels and growth of the oyster *Crassostrea virginica*. Marine Biology **45**: 157-163.

GRIMA, E. M.; J. A. S. PÉREZ; F. G. CAMACHO; J. M. F. SEVILLA & F. C. A. FERNÁNDEZ (1994) - Effect of growth rate on the eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid content of *Isochrysis galbana* in chemostat culture. Appl. Microbiol. biotechnol **41**: 23-27.

GUARY, J.-C.; M. KAYAMA; Y. MURAKAMI & H.J. CECCALDI (1976) - The effects of a fat-free diet and compounded diets supplemented with various oils on moult, growth and fatty acid composition of prawn, *Penaeus japonicus* Bate. Aquaculture **7**: 245-254.

GUCKERT, J. B. & K. E. COOKSEY (1990) - Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in *Chlorella* (Chlorophyta) during high pH induced cell cycle inhibition. J. Phycol. **26**: 72-79.

GUILLARD, R.R.L. (1973a) - Division rates. In J.R. Stein Ed. - Handbook of phycolgical methods. Culture Methods & Growth Measurements. Cambridge University Press, pp.289-312.

GUILLARD, R.R.L. (1973b) - Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In Smith, W.; Chanley, M. (Editors) - Culture of marine invertebrate animals. Plenum Press. pp. 29-60.

HAMZA, N. & J. ROBIN (1992) - Influence du CO₂ sur la composition lipidique de la chain algues-rotifères. Océanis **18**(2): 185-188.

HARRISON, P. J.; P. A. THOMPSON & G. S. CALDERWOOD (1990) - Effects of nutrient and light limitation on the biochemical composition of phytoplankton. J. Appl. Phycol. **2**: 45-56.

HENDERSON, R.J., R.-M. MILLAR, J.R. SARGENT & P.-P. JOSTENSEN (1993) - Trans-Monoenoic and polyunsaturated fatty acids in phospholipids of a *Vibrio* species of bacterium in relation to growth conditions. Lipids **28**(5): 389-396.

HOWELL, B. R. (1979) - Experiments on the rearing of larval turbot, *Scophthalmus maximus* L. Aquaculture **18**: 215-225.

JAMES, C. M. & T. S. ABU-REZEQ (1988) - Effect of different cell densities of *Chlorella capsulata* and marine *Chlorella* sp. for feeding the rotifer *Brachionus plicatilis*. Aquaculture **69**: 43-56.

JOBLING, M. (1993) - Nutrition, diet formulation and feeding practices. *In* Salmon aquaculture. Heen, K. ; Monaham, R. and Utter, F. (Editors). Fishing News Books. 83-26p.

KOCHERT, G. (1978) - Quantification of a macromolecular components of microalgae. *In* Handbook of Phycological Methods. Phycological and Biochemical Methods. Hellebust, J.A. and Cragie, J.S. (Editors). Cambridge University Press, London. 95-97p.

KOVEN, W. M.; A. TANDLER; G. W. KISSIL & D. SKLAN (1992) - The importance of n-3 highly unsaturated fatty acids for growth in larval *Sparus aurata* and their effect on survival, lipid composition and size distribution. *Aquaculture* **104**: 91-104.

LAING, I. & D. UTTING (1980) - The influence of salinity on the production of two commercially important unicellular marine algae. *Aquaculture* **21**: 79-86.

LAING, I. (1985) - Factors affecting the large-scale production of four species of commercially important marine algae. *Aquaculture* **44**: 161-166.

LEE, R. E. (1989) - Phycology. Cambridge University press, N.Y., 645p.

LORENZEN, C.F.(1967) - Determination of chlorophyll and phaeopigments: Spectrophotometric equations. *Limnology and oceanography* **12**(2): 343-346.

LUBIAN L. M. (1981) - Crecimiento en cultivo de cuatro cepas de *Nannochloris* (alga planctonica), estudio de su citología y composition de pigmentos, como base para el esclarecimiento de su situation taxonómica. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla. 185p.

LUBIAN, L. M. & R. ESTABLIER (1983) - Variaciones cuantitativas de los pigmentos de *Nannochloropsis gaditana* Lubian, 1983 (Eustigmatophyceae) durante su crecimiento. *Inv. Pesq.* **47**(1): 29-37.

LUBIAN, L. M.; R. ESTABLIER & E. RUIZ (1986) - La luz y el nitrato en el crecimiento y contenido de pigmentos en cultivos de *Nannochloropsis gaditana* Lubian. *Inv. Pesq.* **50**(4): 499-517.

LUBZENS, E.; A. MARKO & A. TEITZ (1985) - De Novo synthesis of fatty acids in the rotifer, *Brachionus plicatilis*. *Aquaculture* **47**: 27-37.

LUIS, O. J. (1989). Contribuição para o conhecimento da nutrição de *Palaemon serratus* e *Penaeus keraturus* (crustaceas, decapoda) com ênfase para o papel dos lípidos no crescimento e reprodução. Dissertação de candidatura ao grau de Doutor, apresentada à faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. 355p.

MARSH, J.B. & D.B. WEINSTEIN (1966) - Simple charring method for determination of lipids. J. of Lipid Research **7**: 574-576.

MENZEL, K. & A. WILD (1989) - Fatty acid composition in the lipids of some marine Chlorococcales and Eustigmatales. Z. Naturforsch. **44** (9):743-748.

MOURENTE, G., L. M. LUBIÁN & J. M. ODRIÓZOLA (1990) - Total fatty acid composition as a taxonomic index of some microalgae used as food in marine aquaculture. Hydrobiologia **203**: 147-154.

MOURENTE, G.; A. RODRIGUEZ; D. R. TOCHER & J. R. SARGENT (1993) - Effects of dietary docosahexanoic acid (DHA; 22:6n-3) on lipid and fatty acid compositions and growth in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larvae during first feeding. Aquaculture **112**: 79-98.

MYKLESTAD, S. (1974). - Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. I. Comparison of nine different species in culture. J. Exp. mar. Biol. Ecol. **15**: 261-274.

NAPOLITANO, G.E. ; R.G. ACKMAN & W.M.N. RATNAYKE (1990) - Fatty acid composition of three cultured algal species (*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis* and *Chaetoceros calcitrans*) used as food for bivalve larvae. J. World Aquaculture society **21**(2): 122-130.

NYJONJE, B. & J. RADULL (1991) - The effects of feeding freshwater *Chlorella*, baker's yeast and culture selco on the culture of rotifers (*Brachionus* sp.). Spec. Publ. Eur. Aquacult. Soc. , **15**: 106-109.

OIE, G.; K. I. REITAN & Y. OLSEN (1994) - Comparison of rotifer culture quality with yeast plus oil and algal-based cultivation diets. Aquaculture International **2**: 225-238.

PARSONS, T.R.; K. STEPHENS & J.D.H. STRICKLAND (1961) - On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankters. J. Fish. Res. Bd. Canada **18**(6):1001-1015.

PARSONS, R.T. ; Y. MAYTA & C.M. LALLI (1984) - A manual of chemical and biological methods for the seawater analysis. Pergamon press, Oxford, 123p.

POHL, P. & F. ZURHEIDE (1979) - Fatty acids and lipids of marine algae and control of their biosynthesis by environmental factors. Marine algae in pharmaceutical Science. H. A. Hoppe, T. Levring and Y. Tanaka. New York: 472-523.

PUGH, P. R. (1975) - Variations in the biochemical composition of the diatom *Coscinodiscus eccentricus* with culture age and salinity. Marine Biology **33**: 195-205.

REIMANN, B.; P. SIMONSEN & L. STENSGAARD (1989) - The carbon and chlorophyll content of phytoplankton from various nutrient regimes. J. Plankton Research **11**(5): 1037-1045.

REITAN, K. I.; J. R. RAINUZZU; G. OIE & Y. OLSEN (1993) - Nutritional effects of algal addition in first-feeding of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. Aquaculture **118**: 257-275.

RENAUD, S.M.; D.L. PARRY; L.V. THINH; C. KUO; A. PADOVAN & N. SAMMY (1991) - Effect of light intensity on proximate biochemical and fatty acid composition of *Isochrysis sp.* and *Nannochloropsis oculata* for use in tropical aquaculture. Journal of Applied Phycology, **3**(1): 43-53.

SAOUDI - HELIS, L.; J. P. DUBACQ; Y. MARTY; J.F. SAMAIN & C. GUDIN (1994) - Influence of growth rate on pigment and lipid composition of the microalga *Isochrysis aff. galbana* clone T.iso. Journal of Applied Phycology **6**: 315-322.

SAS (1988) - SAS/STATM User's guide, Release 6.06 Edition. Cary, NC:SAS institute INC., 1028p.

SCOTT, A. P. & C. MIDDLETON (1979) - Unicellular algae as a food for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. The importance of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids. Aquaculture **18**: 227-240.

SHIFRIN, N. S. & S. W. CHISHOLM (1980) - Phytoplankton lipids: environmental influences on production and possible commercial applications. Algae Biomass. G. Shelef and C. J. Soeder, Elsevier, 625-645p.

SUKENIK, A. & R. WAHNON (1991) - Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. I. *Isochrysis galbana*. Aquaculture **97**: 61-72.

THOMPSON, P. A.; P. J. HARRISON & J. N. C. WHYTE (1990) - Influence of irradiance on the fatty acid composition of phytoplankton. J. Phycol. **26**: 278-288.

THOMPSON, P. A.; M. GUO & P. J. HARRISON (1992a) - Effects of variation in temperature. I. On the biochemical composition of eight species of marine phytoplankton. J. Phycology **28**: 481-488.

THOMPSON, P. A.; M. GUO; P. J. HARRISON & J. N. C. WHYTE (1992b) - Effects of variation in temperature. II. On the fatty acid composition of eight species of marine phytoplankton. J. Phycology **28**: 488-497.

TIU, A. T.; D. VAUGHAN; T. CHILES & K. BIRD (1989) - Food value of eurytopic microalgae to bivalve larvae of *Cytopleura costata* (Linnaeus, 1758), *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) and *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758). J. Shell. Research **8**(2): 399-405.

UTTING, S. D. (1985) - Influence of nitrogen availability on the biochemical composition of three unicellular marine microalgae of commercial importance. Aquacultural Engineering **4**: 175-190.

VOLKMAN, J.K.; S.W. JEFFREY, P.D.; NICHOLS, G.I.; ROGERS & C.D. GARLAND (1989) - Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. **128**: 219-249.

VOLLENWEIDER, R. A. (1974) - Sampling techniques and methods for estimating quantity and quality of biomass. In A manual methods for measuring primary production in aquatic environments. (Vollenveider, R.A., Editor), I.B.P. Handbook N° 12 . Blackwell Scientific Publications, Oxford, 4-50p.

WALNE, P.R. (1966) - Experiments in the large scale culture of the larvae of *Ostrea edulis*. Fishery Invest. Lond. Ser. II, **25** (4), 53p.

WATANABE T.; C. KITAJIMA & S. FUJITA (1983) - Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: A review. Aquaculture **34**: 115-143. .

WEBB, K. L. & F.-L. E. CHU (1981) - Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. Second International Conference on Aquaculture nutrition, Baton Rouge, L.A., Louisiana State University. Pruder G.; Langdon, C.J.; Conklin, D.E. (Ed.), 272-291p.

WHYTE, J. N. C. & W. D. NAGATA (1990) - Carbohydrate and fatty acid composition of the rotifer, *Brachionus plicatilis*, fed monospecific diets of yeast or phytoplankton. Aquaculture **89**: 263-272.

WHYTE, J. N. C.; W. C. CLARKE; N. G. GINTHER & J. O. T. JENSEN (1994) - Influence of composition of *Brachionus plicatilis* and Artemia on growth of larval sablefish (*Anoplopoma fimbria* Pallas). Aquaculture **1994**: 47-61.

WILFORS, G. H.; J. W. TWAROG & R. UKELES (1984) - Influence of chemical composition of algal food sources on growth of juvenile oysters, *Crassostrea virginica*. Biol. Bull. **167**: 251-263.

WILKFORS, G. H. & G. W. PATTERSON (1994) - Differences in strains of *Isochrysis* of importance to mariculture. Aquaculture **123**: 127-135.

YÚFERA, M. & E. PASCUAL (1984) - Influencia de la dieta sobre la puesta del rotífero *Brachionus plicatilis* en cultivo. Inv. Pesq. **48**(3): 549-556.

YÚFERA, M. & L. M. LUBIÁN (1990) - Effects of microalgal diet on growth and development of invertebrates in marine aquaculture. Introduc. applied Phycology. I. Akatsuka. The Hague, SPB Academic Publishing, 209-227p.

ANEXO I - DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

DETERMINAÇÃO DE PESOS SECOS e PESOS SECOS SEM CINZAS (Utting, 1985)

1. Reagentes

- Formato de amónia

2. Material e equipamentos

- Filtros de fibra de vidro Whatman GF/C
- Kitazato
- Pinça
- Bomba de vácuo
- Estufa
- Mufla
- Excicador

3. Preparação dos reagentes

- Formato de amónia 0.9%: 9g / 1000 ml de água

4. Preparação dos filtros

- Lavar os filtros com 100 ml de água destilada
- Incinerar os filtros a 450° C durante 4 horas
- Colocar num excicador, deixar arrefecer, pesar e numerar os filtros

5. Determinação

- Filtrar as amostras em triplicado, sob vácuo não superior a 0.35 Kg/cm², nos filtros de fibra de vidro previamente tratados
- Depois da filtração, lavar os filtros com 80-100 ml de formato de amónia, ligando de seguida o vácuo, para retirar o líquido em excesso
- Colocar os filtros num tabuleiro com papel de alumínio
- Colocar os filtros na estufa e deixar secar a 80° C durante 48 horas
- Deixar arrefecer num excicador e pesar
- Colocar os filtros na mufla e incinerar a 450°C durante 4 horas
- Deixar arrefecer num excicador e pesar.

O peso seco sem cinzas obtém-se por subtracção do peso dos filtros após a incineração

DETERMINAÇÃO DA CLOROFILA *a* (Vollenweider, 1974)

1. Reagentes

- Metanol absoluto

2. Material e equipamentos

- Tubos de ensaio de 10 ml em plástico e com tampa
- Pipetas de 5 ml
- Cuvettes de vidro para espectrofotómetro
- Papel de alumínio
- Centrifugadora para tubos de 10 ml
- Sonda de ultra-sons e homogeneizador
- Espectrofotómetro

3. Preparação das amostras

- Centrifugar as amostras a 3000 rpm durante 15 minutos.
- Retirar o sobrenadante
- Juntar 5 ml de metanol absoluto a cada amostra
- Homogeneizar durante 30 segundos
- Cobrir os tubos com papel de alumínio e colocar no frigorífico a 4 ° C durante 24 horas para que se complete a extracção
- Preparar um branco com 5 ml de metanol
- Centrifugar durante 5 minutos a 3000 rpm
- Ler as absorvâncias a 665 nm contra branco de metanol em cuvettes de 1 cm

4. Cálculo da clorofila *a*

Concentração de clorofila *a* na amostra = $(13.9 \times \text{Abs } 665 \times v) / V$

Onde v = volume do extracto

V = volume da amostra

DETERMINAÇÃO DE HIDRATOS DE CARBONO

(Método do Fenol-sulfúrico - Kochert, 1978)

1. Reagentes

- Ácido cítrico 1- hidrat-
- Citrato tri-sódico bi- hidrat.
- Hidróxido de sódio
- Glucose-D (+) desidratada (D (+) Glucose wasserfrei, Merck nº 8569680)
- Fenol
- Acido sulfúrico concentrado (96% densidade= 1.84, pm=98.08)
- Água destilada

2. Materiais e equipamentos

- Micropipetas 50, 500 e 5000 μ l
- Balões volumétricos
- Tubos de ensaio de 15 ml, com tampa de enroscar
- Cuvettes para espectrofotómetro
- Balança de precisão
- Centrifugadora
- Sonda de ultra-sons
- Espectrofotómetro
- Bloco calefactor, estufa ou banho maria

3. Preparação dos reagentes

* Tampão cítrico-citrato (pH= 5)

Solução A: ácido cítrico 0.1 M (5,25 g /250 ml)

Solução B: citrato de sódio 0.1 M (7.35 g / 250 ml)

Juntar:	102.5 ml da solução A	ou	153.75 ml da solução A
	147.5 ml da solução B		221.25 ml da solução B
	50 ml de água destilada		75 ml de água destilada

*Solução NaOH 1N: (4 g / 100ml)

* Tampão citrato- soda: Solução tampão cítrico citrato mais solução de NaOH na proporção de 19:1 (95 ml de tampão : 5 ml NaOH)

* Solução standard de glucose (preparar de fresco) : 1 mg/ml

* Fenol 5%: 5g/100ml

4. Padrão

- 1ml da solução standard de glucose, perfaz-se até 20 ml com tampão Citrato -soda.
- A partir desta solução fazem-se as seguintes diluições com tampão Citrato-soda:

Diluição	Solução de glucose (ml)	Solução tampão (ml)	Concentração final de glucose ($\mu\text{g/ml}$)
Branco	0	2	0
1/8	0.250	1.75	6.25
1/4	0.500	1.5	12.5
1/2	1	1	25
1	2	0	50

- A cada uma destas soluções junta-se 1 ml de fenol e, rapidamente, 5 ml de ácido sulfúrico
- Homogeneizar e deixar arrefecer à temperatura ambiente
- Medir as absorvâncias a 485 nm.

5. Preparação das amostras

Intervalo ótimo de quantificação: 5-25 $\mu\text{g/ml}$

- Centrifugar a amostra 15 minutos a 3000 rpm
- Retirar o sobrenadante
- Juntar 2ml de NaOH
- Sonificar 5 minutos (com gelo)
- Aquecer a 110° C durante 10 minutos (bloco calefator, estufa ou banho maria)
- Deixar arrefecer à temperatura ambiente (centrifugar se houver precipitado)
- Retiram-se 0.5 ml para outro tubo e acrescentam-se 9.5 ml de tampão citrico -citrato

6. Determinação

- Retirar 2ml de cada diluição, ao qual se acrescenta 1ml fenol, e logo de seguida, 5 ml de ácido sulfúrico.
- Homogeneizar e deixar arrefecer à temperatura ambiente
- Fazer branco com tampão citrato-soda mais reagentes
- Medir a absorvancia a 485 nm

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

(Método de Bradford, 1976)

1. Reagentes

- Ácido cítrico 1- hidrat-
- Citrato tri-sódico bi- hidrat.
- Hidróxido de sódio
- Albumina standard (albumin standard-conc. For standard preparation with protein reagent Pierce nº 23200)
- Solução de azul coomassie (Coomassie protein assay reagent Pierce nº 2320)
- Água destilada

2. Materiais e equipamentos

- Micropipetas 50, 500 e 5000 μ l
- Balões volumétricos
- Tubos de ensaio de 15 ml, com tampa de enroscar
- Cuvettes para espectrofotómetro
- Balança de precisão
- Centrifugadora
- Sonda de ultra-sons
- Espectrofotómetro
- Bloco calefactor, estufa ou banho maria

3. Preparação dos reagentes

* Tampão cítrico - citrato (pH= 5)

Solução A: ácido cítrico 0.1 M (5,25 g / 250 ml)

Solução B: citrato de sódio 0.1 M (7.35 g / 250 ml)

Juntar:	102.5 ml da solução A	ou	153.75 ml da solução A
	147.5 ml da solução B		221.25 ml da solução B
	50 ml de água destilada		75 ml de água destilada

*Solução NaOH 1N : (4 g / 100ml)

* Tampão citrato - soda: Solução tampão cítrico citrato mais solução de NaOH na proporção de 19:1 (95 ml de tampão : 5 ml NaOH)

* Solução standard de albumina: 2 mg/ml

4. Padrão

- 100 ml da solução standard de albumina, perfaz-se até 10 ml com tampão citrato - soda, obtendo-se assim uma concentração de 20 µg/ml.
- A partir desta solução fazem-se as seguintes diluições com tampão Citrato -soda:

Diluição	Solução de albumina (ml)	Solução tampão (ml)	Concentração final de albumina (µg/ml)
Branco	0	1	0
1/8	0.150	0.875	2.5
1/4	0.250	0.750	5
1/2	0.500	0.500	10
1	1	0	20

- Retirar 1 ml de cada uma destas soluções e juntar 1ml de coomassie
- Agitar com cuidado
- Medir as absorvâncias a 595 nm.

5. Preparação das amostras

Intervalo óptimo de quantificação: 5-25 µg/ml

- Centrifugar a amostra 15 minutos a 3000 rpm
- Retirar o sobrenadante e juntar 2ml de NaOH
- Sonificar durante 5 minutos (com gelo)
- Aquecer a 110° C durante 10 minutos (bloco calefator, estufa ou banho maria)
- Deixar arrefecer à temperatura ambiente (centrifugar se houver precipitado)
- Retiram-se 0.5 ml para outro tubo e acrescentam-se 9.5 ml de tampão cítrico -citrato

6. Determinação

- Retirar 1ml de cada amostra diluída, ao qual se acrescenta 1ml de coomassie
- Agitar suavemente sem produzir espuma
- Fazer branco com 1ml de tampão citrato-soda mais 1ml de coomassie
- Medir a absorvância a 595 nm

DETERMINAÇÃO DOS LÍPIDOS

(Método de Marsh & Weinstein, 1966)

1. Extração

- Centrifugar a amostra
- Fazer branco com 2 ml de clorofórmio
- Adicionar 2 (3 ou 4) ml de clorofórmio mais 1 (1.5 ou 2) ml de metanol
- Ultrasons durante 10 minutos
- Guardar no frigorífico durante 24 horas
- Adicionar 1 ml de clorofórmio mais 1 ml de NaCl (0,7% V/W)
- Agitar bem e depois centrifugar durante 5 minutos
- Retirar o sobrenadante
- Retirar 2 ml da fase inferior
- Determinação

2. Padrão

- Fazer uma solução stock de tripalmitina a uma concentração de 0,34 mg/ml de clorofórmio
- Colocar em tubos 100, 200, 400 e 500 µl da solução stock , que neste caso tem uma concentração de 0,34 mg/ml , supõe concentrações de 34, 68, 136, e 170 µg de tripalmitina respectivamente
- Fazer um branco com 100 µl de clorofórmio
- Determinação

3. Determinação

- Evaporam-se os solventes com fluxo de azoto num banho a 80-100° C
- Arrefecer os tubos
- Adicionar 2ml de ácido sulfúrico concentrado
- Colocar os tubos a 200° C durante 15 minutos (Colocar papel de filtro nas rolhas)
- Pôr num banho de gelo (4° C) durante 15 minutos.
- Acrescentar 3 ml de água destilada, agitar bem e colocar de novo no gelo
- Depois de arrefecer deixar 10 minutos até que desapareçam as bolhas
- Ler as absorvâncias a 375 nm

Conc. Amostra= C extracto x 3/Volume concentrado

DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS GORDOS

1. Extração conjunta de lípidos totais e hidrocarbonetos (Método Bligh & Dyer, 1959)

- Amostra (1-5 g de peso húmido) liofilizada até peso seco constante
- Pesar a amostra
- Adicionar 10 ml de metanol + 5ml de clorofórmio + 4ml de água c/ NaCl
- Homogeneizar em potter 60 ml o material biológico durante 2 minutos
- Adicionar 5ml de clorofórmio e homogeneizar durante 2 minutos
- Adicionar 5ml de água c/NaCl e homogeneizar durante 30 segundos
- Filtrar o homogenato sobre um filtro de CeliteR num filtro com suporte poroso nº 3 e recolher o filtrado num kitasato de 250 ml
- Retirar a película superficial de Celite e transferi-la para o tubo de homogeneização.
- Adicionar 5ml de metanol + 2.5ml de clorofórmio + 2ml de água
- Homogeneizar durante 2 minutos
- Adicionar 2.5 ml de clorofórmio e homogeneizar durante 30 segundos
- Adicionar 2.5 ml de água e homogeneizar durante 30 segundos
- Filtrar novamente sobre o filtro poroso
- Lavar o potter com 5 ml de clorofórmio e filtrar
- Agitar suavemente o kitasato e transfira o filtrado para um tubo de centrifuga com tampa
- Centrifugar durante alguns segundos (3000 rpm) para separar as fases
 - Fase superior : água + metanol
 - Fase inferior: clorofórmio + lípidos totais
- Retirar cuidadosamente a fase superior com uma pipeta de 20 ml
- Recuperar a fase inferior contendo os lípidos totais para um balão em forma de pêra, previamente marcado e pesado, utilizando uma pipeta de pasteur
- Evaporar o clorofórmio no rotavapor a uma temperatura de 37° C .
- Parar o rotavapor, retirar o balão contendo o extracto lipídico
- Secar rapidamente o balão em papel sem tocar com os dedos e pesar para determinar o conteúdo em lípidos totais.

Lípidos totais = Peso final do balão c/ lípidos - peso inicial do balão

- Recuperar os lípidos rapidamente com 2ml de metanol e transferir os ácidos gordos para um tubo de ensaio de 50 ml com rolha de teflon
- Adicionar e recuperar ainda com 2 ml de benzeno, e transferir os restantes ácidos gordos para o mesmo tubo de ensaio
- Acrescentar 100µl de padrão (C19:0, 10 mg/ml em metanol), saturar a atmosfera com azoto, rolhar bem e congelar se não prosseguir imediatamente a metilação

2. Trans-metilação

- Adicionar a cada tubo de ensaio 3 ml de 14% BF₃-CH₃OH
- Saturar a atmosfera em azoto, rolar bem e agitar no vortex
- Colocar os tubos de ensaio em banho maria a 100° C durante 45 minutos, agitando no vortex aos 10 minutos
- Deixar os tubos arrefecer (t.a.), após o que se adiciona 5 ml de água destilada (para parar a reacção) seguido de 5ml de éter de petróleo
- Transferir as soluções para tubos de centrifuga com tampa e centrifugar 4 min. a 4000 rpm
- Recolher a fase superior (éter de petróleo contendo os ésters metílicos de ácidos gordos) para balões em forma de pêra (50 ml)
- Adicionar de novo 5ml de éter de petróleo, primeiro para os tubos de ensaio, e após agitá-los no vortex, transfira-os de novo para os tubos de centrifuga (a fase hidro-alcoólica pode conter ainda ésters metílicos de ácidos gordos), agitar bem e centrifugar de novo
- Transferir a fase superior para os balões periformes
- Evaporar o solvente no rotavapor (30-35° C) com vácuo e refrigerante e finalmente com corrente forte de azoto
- Dissolver os ésters metílicos de ácidos gordos em 2 ml de isooctano e transferi-los para tubos de ensaio de 5 ml com tampa de teflon.

3. Cromatografia em fase gasosa

- Cromatógrafo de fase gasosa: Varian 3300 com injector split/splitless e coluna capilar com temperatura do forno programada,

Gás de arrasto: hélio 1ml/min.

Programa de temperatura: 180° C a 200°C a 4° C/min., usando uma velocidade de registados de 0.5 cm/min.

- Coluna SP 1000 (SUPELCO) (OV-101, tipo SCOT), (polyethylene glycol modified with nitroterephthalic acid), cpilar 30m x0,32 mm i.d., estabilizadas a 180° C antes de usar
- Injector capilar (Varian 1075 split/splitless): 250 ° C, com septum em silicone (Varian amarelos), Glass liner; splitter
- Temperatura da coluna : 180° C a 200 °C a 4° C/min com o programa começado na eluição pico do solvente (isooctano)
- Dtector: ionização de chama a 250 °C com 10 ml/min. He como make-up gas e fluxos de hidrogénio e ar comprimido optimizados
- Electrómetro: 1x10⁻¹² A/mV com 1 segundo de resposta
- Registador: 1 mv e .5 cm/min. de avanço do papel até aos 40 min.
- 1 µl de solução injectada em solução de isooctano purificado

- Recolher 10 μ l de amostra com a seringa Hamilton e deposita-los no prato esquerdo (A) da microeletro balança CAHN 21. Aguardar que o solvente evapore, observando quando o registo digital da balança estabilizar /aprox. 12 minutos) e tome nota do valor do peso total da flame em 10 μ l de amostra. Extrapolar este valor para o volume total, reportando-o em relação ao peso seco liofilizado da amostra.

ANEXO II - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE WALNE

MEIO DE WALNE

(Walne , 1966)

1. Solução de Sais

Cl_3Fe a 30%		2 ml
BO_3H_3		33.6 g
EDTA 2.2 H_2O		52,3 g
NO_3Na		100 g
$\text{SO}_4\text{Zn}.7\text{H}_2\text{O}$	(2.20 g /100 ml)	2 ml
$\text{SO}_4 \text{Cu}.5\text{H}_2\text{O}$	(0.98 g /100 ml)	2 ml
$\text{Cl}_2 \text{Co}.6\text{H}_2\text{O}$	(1.00 g /100 ml)	2 ml
$\text{Cl}_2 \text{Mn}.4\text{H}_2\text{O}$	(18.0 g /100 ml)	2 ml
$\text{MoO}_4\text{Na}_2.2 \text{H}_2\text{O}$	(0.68 g /100ml)	2 ml

Adicionar água destilada até perfazer 1000 ml

2. Solução de Fosfatos

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}.2\text{H}_2\text{O}$	20 g / 1000 ml
------------------------------------------------------	----------------

3. Solução de Silicatos

$\text{NaSiO}_3.9\text{H}_2\text{O}$ a 3 %

4. Solução de vitaminas

Cianocobalamina (B12)	10 mg
Tiamina (B)	200 mg

Adicionar água até perfazer 200 ml

SOLUÇÃO STOCK:

1. Solução de Sais	1ml /l
2. Solução de Fosfatos	1 ml/l
3. Solução de Silicatos	1 ml/l
4. Solução de vitaminas	0.1 ml/l

Nota: A solução de silicatos é dispensável quando as algas não pertencem às diatomáceas .

ANEXO III - RESULTADOS DAS ANÁLISES EFECTUADAS

TABELA I - Resultados das análises efectuadas

Ensaio	Fase	Nº Células x106/ml	P. Seco (pg/cél.)	Biomassa (µg/ml)	Clorof. a (pg/cél.)	Proteínas (pg/cél.)	Lípidos (pg/cél.)	H.carbono (pg/cél.)
T.ISO B1	Exponencial	7,80	14,77	131,25	0,31	2,75	12,53	0,81
	Exp. Final	21,40	11,15	240,00	0,21	1,78	10,38	1,55
	Estacionária	30,80	12,28	410,00	0,23	1,99	10,1	1,74
	Est. Avan.	38,40	19,14	866,50	0,47	3,38	19,63	2,17
T.ISO B2	Exponencial	5,60	21,52	133,35	0,42	5,74	14,88	2,74
	Exp. Final	13,70						
	Estacionária	19,30	20,00	412,50	0,49	4,04	19,95	3,75
	Est. Avan.	25,50	29,40	803,00	0,8	6,06	29,46	5,34
T.ISO M1	Exponencial	3,60	26,50	121,00	0,53	5,44	17,61	2,38
	Exp. Final	4,90	19,70	146,00	0,59	6,44	15,91	2,56
T.ISO M2	Exponencial	3,60	26,76	110,00	0,6	7,47	21,39	5,12
	Exp. Final	8,28	22,53	220,00	0,61	6,44	18,95	5
CHL B	Exponencial	9,91	17,00	188,00	0,36	2,22	5,5	5,92
	Exp. Final	20,45	19,00	390,00	0,41	3,62	4,3	6,98
	Estacionária	28,80	24,00	748,00	0,44	3,55	3,86	8,34
	Est. Avan.	59,10	24,00	1556,26	0,55	3,28	4,74	12,22
CHL M	Exponencial	3,40	19,00	113,33	0,45	3,69	4,02	5,42
	Exp. Final	8,30	17,00	162,00	0,4	2,36	5,14	4,08
	Estacionária	15,80	21,00	332,67	0,57	3,91	5,76	6,62

