UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQÜICULTURA

Avaliação da qualidade de pastas de microalgas produzidas em laboratório de larvicultura de moluscos no Sul do Brasil.

MOIRA NUNES

Florianópolis-SC
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQÜICULTURA

Avaliação da qualidade de pastas de microalgas produzidas em laboratório de larvicultura de moluscos no Sul do Brasil.

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

Orientador: Prof. Dr. Jaime Fernando Ferreira

MOIRA NUNES

Florianópolis- SC
2005

Nunes, M.

Avaliação da qualidade de pastas de microalgas produzidas em laboratório de larvicultura de moluscos no Sul do Brasil.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, Florianópolis, 2005, 35p.
Prof. Orientador: Dr Jaime Fernando Ferreira.

1. microalgas; 2. pasta de microalgas; 3. microbiologia; 4. Hatchery

Avaliação da qualidade de pastas de microalgas produzidas em laboratório de larvicultura de moluscos no Sul do Brasil

Por

MOIRA NUNES

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQÜICULTURA

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

_____

Profa. Débora Machado Fracalossi, Dra.
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

_____

Dr. Jaime Fernando Ferreira - *Orientador*

_____

Dra. Lúcia Helena Sipauba Tavares

_____

Dra. Sirlei de Castro Araújo

"O amor tem sido para mim sempre o maior dos assuntos, ou antes, o único".

Stenshal

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Jaime F. Ferreira, pela oportunidade única e interminável muito alem da orientação, por toda paciência, ensinamentos, enfim, por sempre me surpreender com sua enorme sabedoria e coração.

Aos membros da banca Prof. Dr. Lúcia Helena Sipaúba Tavares, Sirlei de Castro Araújo e Silvana Oshe, por estarem prontamente dispostas a me auxiliar, pelas valiosas correções que ajudaram a tornar esse trabalho melhor, e por me mostrarem outras formas de ver a solução.

Aos meus amados pais, minha irmã Luana e à pequena família 'desunida', por de qualquer forma sempre ofertarem e apoiarem minhas opções e escolhas, por todo apoio e segurança que me proporcionaram meios para tudo que tenho e sou hoje. E a Raja, por estar sempre me dando momentos prazerosos, pela sua lealdade e chamego....

À Adriana Pereira, meu anjo da guarda guerreiro, pela constante presença na minha vida e por estar sempre me mostrando diversos caminhos para que eu me torne uma pessoa melhor que no dia de hoje. Por toda paciência, convivência, confiança, ensinamentos, oportunidades, ombro amigo, momentos deliciosos, e pelo exemplo de luta diária no LMM e na vida.....

A todo pessoal mais que especial do LMM: minha amada amiga Marisa B. Canozzi, Francisco Carlos da Silva, Carlos Henrique, Cláudio Blacher, Cláudio M. R. Mello, Micheline M. de Bem, Lin, Duda, Sino, Zezé e Alexandre, por todos os deliciosos momentos e valiosos conhecimentos compartilhados, mas principalmente por serem tão importantes e presentes na minha vida.

Às pessoas não menos valiosas presentes durantes esses inesquecíveis anos no LMM: Ari, Gaúcho, João Paulo, Celso, Pedro, Kiko, Gui, Tathi, Yasmine, Simone e 'seu respectivo' Pancho. Em especial à querida Fanny, pela convivência maravilhosa e constante, aprendizado e sabedoria 'oriental'.

Aos amigos e colegas de mestrado, em especial à presença do Baiano, Aparício, Andréia, Patrícia, Zé, André, Cláudio, Pancho, Casulo, Júlio.

À TODOS, MUITO OBRIGADA PELA OPRTUNIDADE DE CONVIVER E CRESCER JUNTO À VOSSA COMPANHIA.....

Ao Carlito, pela paciência e pelas ajudas nas horas difíceis. Valeu por sempre facilitar, não importa em qual velocidade.....

A todos que direta e indiretamente estiveram ligados ao meu crescimento como pessoa e profissional dentro do LMM/UFSC/CCA e às oportunidades ofertadas durante esse processo, inclusive à EPAGRI, CNPq e ao povo brasileiro, pelo apoio financeiro incondicional!!!!!!!!

SUMÁRIO

Lista de Figuras..... vii

Resumo..... viii

Abstract..... ix

Introdução Geral..... 1

Corpo do artigo científico..... 9

Abstract..... 9

Introdução..... 10

Material e métodos..... 11

Resultados..... 14

Discussão..... 20

Conclusão..... 23

Agradecimentos..... 23

Referências Bibliográficas..... 24

Referencias Bibliográficas da Introdução..... 27

Normas de publicação..... 35

Lista de Figuras

Figura 1 – Densidade celular máxima de *Chaetoceros muelleri* obtida através da curva de crescimento da microalga do cultivo fresco e da pasta recém produzida. 15

Figura 2 - Quantidade de bactérias marinhas totais presentes no cultivo fresco e na pasta recém produzida das espécies de microalgas *Chaetoceros muelleri, Chaetoceros calcitrans e Skeletonema* sp. 15

Figura 3 - Influência da centrifugação sobre a taxa de viabilidade das células das microalgas *Chaetoceros muelleri, Chaetoceros calcitrans* e *Skeletonema* sp. 16

Figura 4 - Influência do armazenamento sobre a taxa de viabilidade das células da pasta das microalgas: A) *Chaetoceros muelleri*; B) *Chaetoceros calcitrans;* C) *Skeletonema* sp. 18

Figura 5 - Quantidade de bactérias marinhas totais detectadas na pasta armazenada das espécies: A) *Chaetoceros muelleri; B) Chaetoceros calcitrans; C) Skeletonema sp*. 19

Figura 6 - Densidades celulares máximas da microalga *Chaetoceros muelleri*, obtidas através das curvas de crescimento a partir de amostras das pasta armazenadas. 20

Resumo

O presente trabalho teve como objetivo definir uma metodologia para a produção e armazenamento de pasta de microalgas. Os cultivos de microalgas foram realizados em tanques de fibra de vidro de 500 L, temperatura 20±2°C, meio de cultura F/2 de Guillard e iluminação contínua com intensidade de 203-234 µmol photons m^{-2} s^{-1}. Na fase exponencial, as culturas foram centrifugadas a 2.800 rpm. Para verificar a qualidade das células de microalgas após a centrifugação e durante o armazenamento, foram realizadas análises utilizando o corante azul de Evan e variação do número de bactérias marinhas totais. Na pasta produzida foi aplicado tratamentos com e sem aditivo e esta foi distribuída em potes plásticos de 100 mL vedados, armazenada sob refrigeração a 4±1ºC. Os resultados indicaram que na pasta da espécie *Chaetoceros muelleri* a centrifugação não danificou as células e reduziu significativamente o número de bactérias marinhas totais de $2,9 \times 10^6$ para $8,3 \times 10^5$ UFC mL^{-1} . As pastas das microalgas *C. muelleri* e *C. calcitrans*, armazenadas com adição de 0,1% do aditivo Ácido Ascórbico, mostraram um tempo de prateleira inferior a 2 semanas. Para o tratamento sem aditivo, os resultados com o corante Azul de Evan indicaram que as células permaneceram viáveis (99%) até a sexta semana para a espécie *C. muelleri*, sétima para a *Skeletonema* sp. e oitava para a microalga *C. calcitrans*. Não houve incremento do número de bactérias durante o armazenamento da pasta para as espécies *C. calcitrans e Skeletonema* ($p>0,05$). Para *C. muelleri*, foi observado um incremento no número de bactérias ($p<0,05$) a partir da sexta semana. Este estudo demonstrou a viabilidade de produção e armazenamento de pastas de microalga, por um período de 6 a 8 semanas, permitindo ser utilizada como alimento, otimizando o uso das microalgas produzidas no laboratório.

Abstract

The present study aimed at defining a methodology to produce and store microalgae paste. Microalgae were cultured in 500-l fiberglass tanks, under temperature of 20 ± 2°C, Guillard F/2 culture medium, and continuous light intensity of 203-234 µmol photons m^{-2} s^{-1}. Cultures were centrifuged at 2,800 rpm at the exponential phase. Microalgae cell quality after centrifugation and during storage was determined by analyses with Evan's blue and by counting the number of total marine bacteria. Treatments with and without additive were applied to the microalgae paste produced, which was distributed into 100-ml plastic containers, capped and stored under refrigeration at 4 ± 1 °C. Results indicated that in the *Chaetoceros muelleri* paste centrifugation did not damage the cells and the number of total marine bacteria reduced significantly from 2.9×10^6 to 8.3×10^5 CFU ml^{-1}. *C. muelleri* and *C. calcitrans* pastes stored with addition of 0.1% ascorbic acid had a shelf life of less than 2 weeks. For the treatment without additive, results with Evan's blue dye showed that cells (99%) remained viable until the sixth, seventh and eighth week of storage for *C. muelleri*, *Skeletonema* sp. and *C. calcitrans*, respectively. The number of bacteria did not increase during storage for *C. calcitrans* and *Skeletonema* ($p>0.05$). For *C. muelleri* an increase of bacteria ($p<0.05$) was observed from the sixth week of storage on. This study demonstrated the feasibility to produce and store microalgae paste for a period of 6 to 8 weeks, which allows it to be used as food source and also optimizes the use of microalgae cultured in laboratory.

1. INTRODUÇÃO

A aqüicultura destacou-se mundialmente como o setor que apresentou a maior taxa de crescimento em relação aos outros setores produtores de alimentos de origem animal. Neste foi registrada a maior taxa relativa de crescimento (9,2%) desde 1970, frente ao setor de pesca extrativista (1,4%) e de produção de animais terrestres (2,8%) (FAO, 2003).

Esta atividade engloba uma ampla diversidade de espécies, sistemas de cultivo, práticas de manejo, inovações tecnológicas e desenvolvimento de alimentos alternativos específicos.

Na aqüicultura, as microalgas são utilizadas como alimento de moluscos, peixes, crustáceos e zooplânctontes. Fornecidas, em geral, na forma fresca (alimento vivo), são essenciais em algum estágio de desenvolvimento ou ainda, em todo o ciclo de vida destes organismos.

Paralelamente ao crescimento da aqüicultura, o setor produtivo de microalgas se fortalece, não somente por ser a base da cadeia alimentar de organismos aquáticos, mas também, pela ampla variedade de indústrias que exploram seus componentes bioativos (LI et al., 2001; PULZ et al., 2001) tais como, metabólitos, enzimas, antioxidantes, pigmentos, vitaminas e ácidos graxos poliinsaturados. Sua utilização abrange ainda, outros aspectos como melhoria de qualidade de água em tanques de cultivo de espécies aquáticas (DUERR et al., 1998) e o tratamento de efluentes (WILDE & BENEMANN, 1993; GONZALEZ et al., 1997; SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2003).

Na busca de microalgas para uso como fonte de alimento na aqüicultura, muitas espécies foram e continuam sendo estudadas. As preferidas são aquelas que reúnem qualidades ideais de nutrição e digestibilidade, apresentam tamanhos celulares adequados a cada espécie nos seus diferentes estágios de desenvolvimento e suportam as condições de cultivo (SILVA et al., 2004).

Dentre as mais utilizadas, podemos citar as diatomáceas *Chaetoceros muelleri, Chaetoceros calcitrans, Skeletonema constatum, Thalassiosira pseudonana, T. weissflogii, Phaeodactylum tricornutum,* as flageladas *Tetraselmis tetrathele, T. suecica, T. chuii,*

Isochrysis galbana, Isochrysis sp. e *Pavlova lutheri* e ainda, a clorofícea *Nannochloropsis oculata* (BROWN et al., 1989).

Em geral, as diatomáceas contêm mais carboidratos e concentrações significativas de EPA - ácido eicosapentanóico – 20:5n-3, enquanto as flageladas possuem maior teor de lipídeos, em especial DHA - ácido docosahexanóico -22:6n-3 (BROWN, 1991; BROWN et al., 1997). O teor desses componentes presentes em cada espécie de microalga é um fator importante no crescimento e desenvolvimento dos organismos marinhos que se beneficiam delas (BROWN et al., 1989; SOUDANT et al., 1998; SILVA et al., 2004), podendo variar de acordo com as condições de cultivo e a fase de seu ciclo de vida (HU, 2004).

A obtenção diversificada de grande biomassa de microalgas de alta qualidade nutricional é primordial na aqüicultura. Sua produção é um dos pontos críticos em muitos laboratórios, representando, em alguns casos, mais da metade dos custos totais na produção dos animais cultivados (LAING & HELM, 1981; KUBAN et al., 1983; BENEMANN, 1992; COUTTEAU & SORGELOOS, 1992; KNAUER & SOUTHGATE, 1999; ROSA, 1999; CANÃVATE & FERNÁNDES-DÍAZ, 2001).

Os custos dependem do volume diá 13olume diá 13olu oITa0Uoa198t392; KNAUER

alimentos inertes microencapsulados (NUMAGUCHI e NELL, 1991; MEDINA-REYNA et al., 2005), emulsões lipídicas (COUTTEAU et al., 1996), leveduras (NELL et al., 1996), bactérias (DOUILLET, 1993, DOUILLET & LANGDON, 1993), e concentrados de microalgas preservados por diversas técnicas (CURATOLO et al., 1993; LUBZENS et al., 1995; CORDERO ESQUIVEL & VOLTOLINA LOBINA, 1996; PAPANDROULAKIS et al., 1996; ALBENTOSA et al., 1997; NAVARRO & SARASQUETE, 1998; KNAUER & SOUTHGATE, 1999; HEASMAN et al., 2000; SOUZA et al., 2000; CAÑAVATE & FERNÁNDES-DÍAZ, 2001; HEASMAN et al., 2001; BROWN & ROBERT, 2002; SOUZA et al., 2002).

Alguns autores obtiveram resultados positivos na substituição do alimento vivo, mas mesmo assim, conforme relatado por COUTTEAU & SORGELOOS (1992), laboratórios de produção de organismos marinhos em todo o mundo têm testado e descartado substitutos para o cultivo fresco de microalga.

Dentre as diversas fontes de alimento alternativas desenvolvidas, os concentrados de microalgas, como a pasta, apresentaram os melhores resultados na substituição total ou parcial da fonte de alimento tradicional (PONIS et al., 2003).

Estudos demonstraram que, a combinação de pastas de duas microalgas pode sustentar o crescimento e sobrevivência de larvas e juvenis de bivalves com taxas similares às obtidas utilizando-se alimento vivo (NELL & O'CONNOR, 1991; HEASMAN et al., 2001).

Diversos autores (MOLINA GRIMA et al., 1994; O'CONNOR & HEASMAN, 1997; McCAUSLAND et al., 1999; HEASMAN et al., 2000; HEASMAN et al., 2001; ROBERT et al, 2001; BROWN & ROBERT, 2002; COUTTEAU & SORGELOOS, 1992) relataram que em alguns casos a pasta de microalga ainda não pode substituir integralmente o alimento tradicional em laboratórios de produção de formas jovens de moluscos, mas pode ser utilizada como dieta suplementar em conjunto com cultivo fresco (dieta mista) em todas as etapas da produção.

Nesse contexto, a exploração da produção sazonal de microalga para produção de concentrados de microalgas, como a pasta, seria benéfica para substituir o alimento vivo caso a produção de microalgas seja interrompida por alguma razão (HOLLIDAY et al., 1991), promovendo, assim, maior segurança ao setor de microalgas em "hatcheries".

A pasta tem sido utilizada em outras opções de cultivo de moluscos bivalves, como no assentamento remoto de *Crasssotrea gigas* na costa oeste dos Estados Unidos, principal região produtora do país. Essa técnica desenvolvida por JONES & JONES (1988) promove maior fluidez no sistema produtivo de moluscos, já que não há necessidade de manutenção dos animais em condições de laboratório até a fase de semente.

O uso da pasta de microalga também se torna importante para subsidiar o balanceamento adequado dos nutrientes essenciais na dieta dos animais cultivados, em casos em que os laboratórios não têm condições de realizar produção diversificada.

Um outro exemplo de aplicação citado por GALVÃO et al. (1996), relata que a espécie *Nannochloropsis oculata* perde suas qualidades nutricionais quando cultivada em temperaturas acima de 28°C, pois a biossíntese do ácido graxo essencial EPA é prejudicada. O efeito da temperatura no metabolismo das microalgas é um dos fatores ambientais que mais influenciam na composição bioquímica dessas (HU, 2004; ARAÚJO & GARCIA, 2005). A pasta de microalgas de espécies que se comportam de forma semelhante à *N. oculata* pode ser produzida no inverno (período de entre safra) e estocada para ser fornecida no verão.

A pasta de microalgas pode ser ainda utilizada como alimento em aquários que contém moluscos bivalves, artêmias, anêmonas e corais (REEF CENTRAL, 2005); na alimentação de camarões (SOUZA et al., 2000; SOUZA et al., 2002); peixes (PAPANDROULAKIS et al., 1996; NAVARRO & SARASQUETE, 1998; CAÑAVATE & FERNÁNDES-DÍAZ, 2001); rotíferos (LUBZENS et al., 1995); bio-ensaios e pesquisas onde existe a dificuldade de obtenção de cultivo fresco.

O sucesso da utilização de concentrados na substituição do alimento fresco depende das espécies de microalgas a serem trabalhadas, da forma de obtenção e estocagem da pasta e, principalmente, da qualidade do cultivo fresco a ser concentrado e do animal a ser alimentado.

O potencial de uma microalga a ser utilizada para a produção de pasta varia entre as espécies e depende muito, da sua resistência ao processo de concentração e armazenamento (HEASMAN et al., 2000; HEASMAN et al., 2001). Dentre as espécies mais utilizadas para produção de concentrados podemos citar as do gênero *Tetraselmis* sp., *Chaetoceros* sp., *Skeletonema* sp., *Thalassiosira* sp. (WIKFORS et al., 1996; DUERR

et al., 1998; HEASMAN et al., 2000; HEASMAN et al., 2001; ROBERT, et al., 2001; MONTAINI et al., 1995). Já as espécies flageladas *Isochrysis sp.* e *Pavlova lutheri* , por serem muito delicadas, são facilmente danificadas e deterioram rapidamente (NELL & O'CONNOR, 1991; McCAUSLAND et al., 1999; HEASMAN et al., 2000; HEASMAN et al., 2001; BROWN & ROBERT, 2002).

O concentrado de microalgas pode ser obtido por meio de diversos processos como: floculação química, eletrofloculação, sedimentação, decantação, filtração, centrifugação (HEASMAN et al., 2000; HEASMAN et al., 2001) ou ainda, através da combinação entre estes (PONIS et al., 2003).

O método de centrifugação, além de ser o mais viável, é o que tem apresentado os melhores resultados para a obtenção de grande biomassa visando a produção de pasta de alga (MONTAINI et al., 1995; GALVÃO et al., 1996; MCCAUSLAND et al., 1999; HEASMAN et al., 2000; HEASMAN et al., 2001; ROBERT et al., 2001). Este processo ainda possibilita melhorar a qualidade da pasta, através da diminuição das bactérias agregadas às células e em suspensão, no meio de cultivo (VIEIRA, 1975; NELL & O'CONNOR, 1991; HEASMAN et al., 2000).

Vários métodos têm sido aplicados na preservação e armazenamento das células concentradas. Dentre os principais estão os de liofilização (CORDERO ESQUIVEL & VOLTOLINA LOBINA, 1996; ALBENTOSA et al., 1997), de secagem na forma de pó (CURATOLO et al., 1993), de congelamento (LUBZENS et al., 1995; GALVÃO et al., 1996; PAPANDROULAKIS et al., 1996; CORDERO, & VOLTOLINA, 1997) e ainda, de refrigeração (NELL & O'CONNOR, 1991; MONTAINI et al., 1995; HEASMAN et al., 2000; HEASMAN et al., 2001).

A baixa temperatura é uma técnica muito utilizada na conservação de alimentos (McCAUSLAND et al., 1999). Ela promove a diminuição do metabolismo das células e a redução da velocidade dos processos que ocorrem pós-morte, incluindo a desnaturação oxidativa de vitaminas essenciais e de ácidos graxos poliinsaturados, a autólise e a degradação microbiana (HEASMAN et al., 2000). A respiração celular ainda causa uma rápida degradação dos carboidratos (BEARDALL et al., 1994 apud BRONW & ROBERT 2002).

Segundo MONTAINI et al. (1995), o armazenamento da pasta no escuro contribui para evitar a oxidação lipídica e, o tipo de vedação dos recipientes influencia diretamente na qualidade. Culturas estocadas hermeticamente vedadas perderam sua viabilidade mais rapidamente que aquelas mantidas com tampões de algodão, sugerindo que a formação de oxigênio ou a acumulação de metabólitos gasosos (como exemplo $C0_2$), ou ambos, influenciaram na qualidade da pasta. Quanto maior a concentração celular maior a influência do tipo de vedação (MONTAINI et al. 1995).

Trabalhos de vários autores têm demonstrado que a utilização de aditivos melhora significativamente a qualidade das pastas de microalgas (MOLINA GRIMA et al. 1994; CORDERO, & VOLTOLINA, 1997; HEASMAN et al., 2000; HEASMAN et al., 2001; TZOVENIS et al., 2004). Substâncias aditivas são utilizadas na indústria alimentícia para aumentar o tempo de prateleira dos alimentos. São classificadas de acordo com o seu modo de ação. Entre os tipos de aditivos pode-se destacar os antioxidantes (como o ácido ascórbico), os ácidos alimentares (como o ácido cítrico), crioprotetores (como o glicerol e o proplileno glicol) e vitaminas. Antioxidantes agem prevenindo a oxidação de substâncias lipídicas, entre elas os importantes ácidos graxos poliinsaturados. Já os ácidos alimentares agem abaixando o pH e inibindo o crescimento de outros microrganismos contaminantes. Os crioprotetores previnem danos à integridade das membranas celulares (quando congeladas) causados pela formação de cristais de gelo intracelulares.

Durante o processo de produção e armazenamento deve-se buscar a manutenção das qualidades nutricionais das algas. Esta deve manter-se atrativa e palatável, além de estar ainda viável quando re-suspendida em água do mar e disponível para que o animal possa capturá-la, ingeri-la e digeri-la (HEASMAN et al, 2000; HEASMAN et al, 2001). Todas essas características e preocupações são importantes uma vez que a nutrição adequada dos organismos cultivados nas diferentes etapas de produção é um fator que influencia diretamente no desenvolvimento e resistência ao estresse durante a sua manipulação.

Assim, torna-se necessário a realização de testes de qualidade da pasta, a fim de garantir que o método de processamento (concentração), a técnica e o tempo de armazenamento sejam adequados a cada espécie.

Na avaliação da qualidade e do tempo de armazenamento da pasta de microalgas são utilizados diferentes critérios. Segundo os autores MOLINA GRIMA et al. (1994); HEASMAN et al. (2000); HEASMAN et al. (2001), uma metodologia eficiente e simples de avaliação do tempo de viabilidade das células é o padrão de coloração ao corante Azul de Evan´s. Sua ação é a de fixar a matéria orgânica em decomposição, dentro e em torno da célula, na cor azul escuro. As células vivas intactas não se coram, pois a membrana celular repele o corante.

A curva de crescimento das microalgas concentradas também pode ser utilizada na avaliação da qualidade da pasta. Por meio de acompanhamento desta, pode-se calcular a densidade celular máxima (DCM) (GUILLARD, 1973). Com a diminuição da taxa desse parâmetro, diminui também, a qualidade do concentrado. Além dos critérios citados acima, parâmetros como odor, contaminação bacteriana (microbiologia), pH, comportamento ao ser re-suspendida, exame de integridade física e formação de agregado de células mortas, também são usados para avaliar a qualidade da pasta (HEASMAN et al., 2000; HEASMAN et al., 2001).

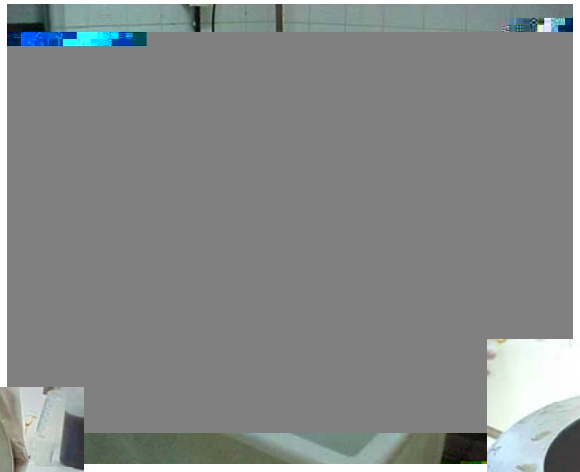
No Brasil, até o momento, a única forma de obtenção de pasta é através de importação. As empresas produtoras não fornecem informações sobre os métodos de produção e hoje, com o crescimento da aqüicultura brasileira, estão surgindo necessidades de novos produtos e por isto a importância deste estudo.

Tendo em vista as diversas utilizações da pasta de microalgas dentro do processo produtivo de organismos aquáticos, o objetivo deste trabalho foi definir uma metodologia de produção e armazenamento de pasta para, posteriormente produzi-la nas condições do Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LMM-UFSC). Durante cerca de um ano, foram realizados diferentes experimentos buscando a padronização dos métodos referentes à produção e manutenção da qualidade do concentrado de microalgas. As etapas estudadas para definição da metodologia consistiram em ensaios com diferentes espécies de microalgas testando velocidades de centrifugação, fluxos de alimentação da centrífuga, taxas de retenção das células durante a centrifugação, armazenamento da pasta com diferentes concentrações, uso de aditivos e formas de avaliação da qualidade do concentrado. Nesse sentido, os estudos foram

realizados visando um produto que não perca a qualidade durante o processo de produção e armazenamento.

ESQUEMA GERAL DE TRABALHO PARA PREPARAÇÃO DA PASTA DE MICROALGAS

Tubos cilíndricos de fibra com culturas de microalgas.



Aspectos da sala de produção e da centrífuga utilizada.

Armazenamento das amostras de pasta sob refrigeração

Análises de viabilidade das células

A*quatic Living Resources*

Avaliação da qualidade de pastas de microalgas produzidas em laboratório de larvicultura de moluscos no Sul do Brasil.

Quality evaluation of microalgae paste produced in mollusk hatchery at southern Brazil.

Moira Nunes[1], Adriana Pereira[2] e Jaime Fernando Ferreira[3 *]

[1] Curso de Pós Graduação em Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, [2]Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina - EPAGRI, [3] Departamento de Aqüicultura, Universidade Federal de Santa Catarina,CP 476, 88040-900; Florianópolis - SC – Brazil.

Abstract - The present study aimed at defining a methodology to produce and store microalgae paste. Microalgae were cultured in 500-l fiberglass tanks, under temperature of 20 ± 2°C, Guillard F/2 culture medium, and continuous light intensity of 203-234 µmol photons m^{-2} s^{-1}. Cultures were centrifuged at 2,800 rpm at the exponential phase. Microalgae cell quality after centrifugation and during storage was determined by analyses with Evan's blue and by counting the number of total marine bacteria. Treatments with and without additive were applied to the microalgae paste produced, which was distributed into 100-ml plastic containers, capped and stored under refrigeration at 4 ± 1 °C. Results indicated that in the *Chaetoceros muelleri* paste centrifugation did not damage the cells and the number of total marine bacteria reduced significantly from 2.9 x 10^6 to 8.3 x 10^5 CFU ml^{-1}. *C. muelleri* and *C. calcitrans* pastes stored with addition of 0.1% ascorbic acid had a shelf life of less than 2 weeks. For the treatment without additive, results with Evan's blue dye showed that cells (99%) remained viable until the sixth, seventh and eighth week of storage for *C. muelleri*, *Skeletonema* sp. and *C. calcitrans*, respectively. The number of bacteria did not increase during storage for *C. calcitrans* and *Skeletonema* ($p>0.05$). For *C. muelleri* an increase of bacteria ($p<0.05$) was observed from the sixth week of storage on. This study demonstrated the feasibility to produce and store microalgae paste for a period of 6 to 8 weeks, which allows it to be used as food source and also optimizes the use of microalgae cultured in laboratory.

Keywords: microalgae; algae paste; microbiology; hatchery.

*autor para correspondência – jff@cca.ufsc.br

1. INTRODUÇÃO

Na aqüicultura, as microalgas são utilizadas, na forma fresca, como dieta tradicional para diversos organismos aquáticos cultivados, sendo primordial a obtenção diversificada de grande biomassa de alta qualidade nutricional.

Sua produção é um dos pontos críticos em muitas “hatcheries” pois envolvem diversos fatores de risco que tornam o setor altamente susceptível (Okauchi, 1991; Molina Grima et al., 1994; Duerr et al., 1998) além de representar, em alguns casos, mais da metade dos custos totais na produção dos animais cultivados (Laing & Helm, 1981; Fulks & Main, 1991; Benemann, 1992; Coutteau & Sorgeloos, 1992; Borowitzka, 1997; Canãvate & Fernándes-Díaz, 2001). Estas questões têm incentivado, nas últimas décadas, muitas pesquisas enfocando o desenvolvimento de fontes de alimento alternativas às microalgas vivas (cultivos frescos), como por exemplo: dieta formulada micro-particulada (Amjad & Jones, 1992), alimentos inertes microencapsulados (Numaguchi & Nell, 1991; Medina-Reyna et al., 2005), emulsões lipídicas (Coutteau et al., 1996), leveduras (Nell et al., 1996), bactérias (Douillet, 1993, Douillet & Langdon, 1993) e concentrados de microalgas preservados por diversas técnicas (Curatolo et al., 1993; Cordero Esquivel & Voltolina Lobina, 1996; Papandroulakis et al., 1996; Albentosa et al., 1997; Knauer & Southgate, 1999; Brown & Robert, 2002).

Dentre as diversas fontes de alimento alternativas, os concentrados de microalgas, como a pasta, apresentaram resultados promissores na substituição total ou parcial (dieta mista) da fonte de alimento tradicional. Exemplos de utilização foram descritos para moluscos (Jones & Jones, 1988; Nell & O’connor, 1991; Coutteau & Sorgeloos, 1992; O’Connor & Heasman, 1997; McCausland et al., 1999; Knauer & Southgate, 1999; Ponis et al., 2003), camarões (Souza et al., 2000; Souza et al., 2002), peixes (Papandroulakis et al., 1996; Navarro & Sarasquete, 1998; Cañavate & Fernándes-Díaz, 2001), rotíferos (Lubzens et al., 1995), aquários que contém moluscos bivalves, corais, artêmias e anêmonas (Reef Central, 2005).

O potencial de uma microalga a ser utilizada para a produção de pasta varia entre espécies e depende muito da sua resistência ao processo de concentração e

armazenamento (Heasman et al., 2000). O concentrado pode ser obtido por diferentes métodos, sendo o processo de centrifugação o citado apresentando bons resultados (Montaini et al., 1995; McCausland et al., 1999; Robert et al., 2001; Heasman et al., 2001).

Na preservação da qualidade das células concentradas durante o armazenamento, vários métodos têm sido utilizados. Dentre os principais estão a aplicação de aditivos (Molina Grima et al. 1994; Heasman et al., 2000; Tzovenis et al., 2004), a liofilização (Cordero Esquivel & Voltolina Lobina, 1996; Albentosa et al., 1997), a secagem na forma de pó (Curatolo et al., 1993), o congelamento (Lubzens et al., 1995; Papandroulakis et al., 1996; Cordero & Voltolina, 1997) e a refrigeração (Nell & O'connor, 1991; Montaini et al., 1995; McCausland et al., 1999; Heasman et al., 2001).

Tendo em vista as diversas utilizações da pasta de microalgas dentro do processo produtivo de organismos aquáticos, o objetivo deste trabalho foi definir uma metodologia de produção e armazenamento de pasta para posteriormente produzi-la nas condições do Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LMM-UFSC).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Durante cerca de um ano, foram realizados diferentes experimentos buscando a padronização dos métodos referentes à produção e manutenção da qualidade do concentrado de microalgas. As etapas estudadas para definição da metodologia consistiram em ensaios com diferentes espécies de microalgas testando velocidades de centrifugação, fluxos de alimentação da centrífuga, taxas de retenção das células durante a centrifugação, armazenamento da pasta com diferentes concentrações, uso de aditivos e formas de avaliação da qualidade do concentrado. Nesse sentido, os estudos foram realizados visando um produto que não perca a qualidade durante o processo de produção e armazenamento.

2.1. Espécies utilizadas

As espécies de microalgas utilizadas na produção de pasta foram obtidas do estoque de cepas do Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina. As microalgas foram as diatomáceas: *Chaetoceros muelleri* (CCMP 1316), *Skeletonema* sp. (CCMP 795) e *Chaetoceros calcitrans* (CCMP 1315).

2.2. Cultivo das microalgas

As espécies foram cultivadas utilizando o método padrão "batch" (Coutteau, 1996 citado por Silva et al., 2004). Inóculos em fase exponencial (90L) foram adicionados a tubos verticais de fibra de vidro com capacidade de 500L contendo água do mar (35-36‰) filtrada (1 μm), esterilizada (UV + 25 ppm de cloro) e enriquecida com meio de cultura Guillard f/2, modificado com relação ao silicato sódio adicionado (Silva et al., 2004). As microalgas cresceram sob condições controladas de temperatura (20±2°C), iluminação contínua (203-234 μmol photons m^{-2} s^{-1}) e adição de 0,5% de CO_2 no total da aeração fornecida, mantendo o pH na faixa de 7,2 a 8,5.

2.3. Processo de concentração das células e técnicas de preservação (armazenamento)

Os cultivos frescos ao atingirem a fase exponencial foram quantificados (COULTER Z1) e centrifugados. Para a produção de pasta foi utilizada a centrífuga marca LAVIN, modelo 12-413V. A velocidade adotada foi de 2.800 rpm, com fluxo de alimentação de 130 L h^{-1}, ajustado para obter em média 80% de retenção das células. O volume centrifugado para cada espécie trabalhada foi de 2.000 litros.

Ao final do processo de centrifugação foram diluídas amostras da pasta produzida para determinação da concentração (COULTER Z1). A pasta produzida foi armazenada sem adição de aditivos e, no caso da *C. muelleri* e *C. calcitrans* a pasta também foi armazenada com a adição de solução do aditivo ácido ascórbico (0,1%), quantidade suficiente para o pH atingir de 4-4,5.

Potes plásticos de 100 mL, vedados com tampa, contendo as pastas produzidas, foram mantidos no escuro sob refrigeração a 4±1ºC, em geladeira comum (BOSCH – RD38). Para cada espécie de microalga foram armazenados 24 frascos que foram

analisados em triplicata, semanalmente, por período de até 8 semanas. O pH da pasta com aditivo foi mantido na faixa de 5,0±0,7 e na pasta sem aditivo, em torno de 7,0±0,7.

2.4. Avaliação da qualidade da pasta

Para verificar a integridade das células de microalgas após a centrifugação e a qualidade das células durante o armazenamento, foram realizadas análises de qualidade no cultivo fresco, na pasta recém produzida e, semanalmente, na pasta armazenada. Esses dados foram utilizados para determinar o período ideal de armazenamento (tempo de prateleira).

As amostras para análise foram preparadas re-suspendendo uma quantidade de pasta de microalga em água do mar estéril numa concentração semelhante ao do cultivo fresco que foi utilizado para produzir a mesma.

Os parâmetros de avaliação da qualidade da pasta utilizados foram:

- Viabilidade das células, avaliada pela resposta do corante Azul de Evan (Heasman et al., 2000). Para cada repetição foi realizada três análises, totalizando 9 amostragens semanais.
- Variação do número de bactérias marinhas totais. As amostras foram semeadas em placas de Pétri contendo meio Agar marinho (Marine Agar 2216 DIFCO). As placas foram incubadas no escuro a 25°C e após 72 h foi contado o número de UFC mL^{-1} de cada amostra.
- Densidade celular máxima (DCM) (GUILLARD, 1973), obtida através de acompanhamento das curvas de crescimento, avaliada para *Chaetoceros muelleri.*

Paralelamente, foi observada a característica organoléptica odor (classificado em escalas crescentes, onde “0” representava uma aparência normal fresca e “3” indicava células em decomposição, apresentando cheiro extremamente ofensivo), o aspecto morfológico das células (avaliado se houve formação de agregado celular ou não) e, como a pasta se comportava em termos de facilidade ao ser re-suspendida e formação ou não de grumos.

2.5. Análise estatística

Os dados relativos à densidade celular máxima (referentes somente à *C. muelleri*), à variação do número de bactérias marinhas durante o processo de centrifugação e no armazenamento, foram analisados através de ANOVA. Os valores de UFC mL^{-1} foram transformados para escala logarítima . A comparação semanal entre a média dos dados foi realizada através do método dos contrastes. Todas as análises foram realizadas com o programa SAS (versão 2002).

3. RESULTADOS

3.1. Processo de concentração das células

O volume de pasta produzido durante a realização de cada processo com as diferentes espécies foi de 4L. As concentrações da pasta obtidas para as espécies de microalgas *Chaetoceros muelleri, C. calcitrans* e *Skeletonema* sp. foram de 20,8; 14,0 e 4,16 células x 10^8 mL^{-1} , respectivamente.

Ao analisar as curvas de crescimento da microalga *C. muelleri* no cultivo fresco utilizado na produção da pasta e na pasta recém produzida (Figura 1) verificamos que não houve diferença significativa entre as densidades celulares máximas obtidas.

Com a centrifugação (Figura 2) observamos que houve redução significativa no número de bactérias marinhas totais na pasta produzida da espécie *Chaetoceros muelleri.* A quantidade de bactérias variou de 2,9 x 10^6 UFC mL^{-1} no cultivo fresco para 8,3 x 10^5 UFC mL^{-1} . Nas espécies *Skeletonema* sp. e *Chaetoceros calcitrans* este efeito não foi observado (Figura 2).

Na avaliação dos danos causados às células pela centrifugação (Figura 3), através da resposta ao corante Azul de Evan, observamos que menos de 1% das células sofreram injúria durante a centrifugação, para todas as espécies trabalhadas.

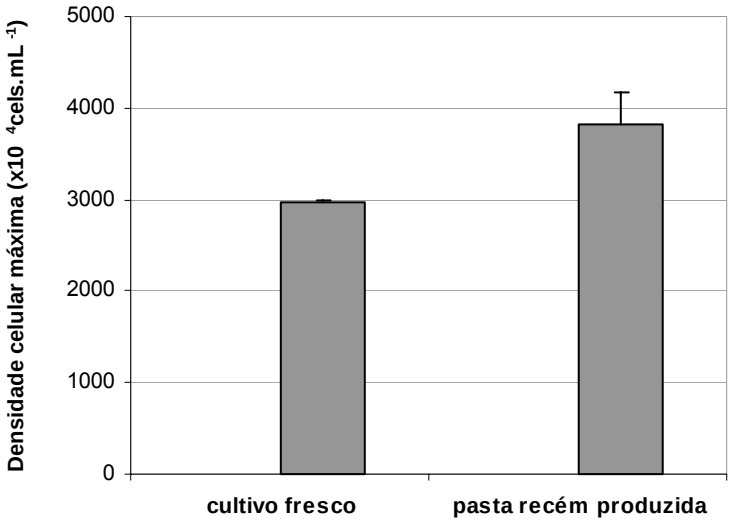


Figura 1- Densidade celular máxima de *Chaetoceros muelleri* obtida através da curva de crescimento da microalga do cultivo fresco e da pasta recém produzida. n = 3 para cada tratamento. Os resultados não diferiram significativamente (p > 0,05).

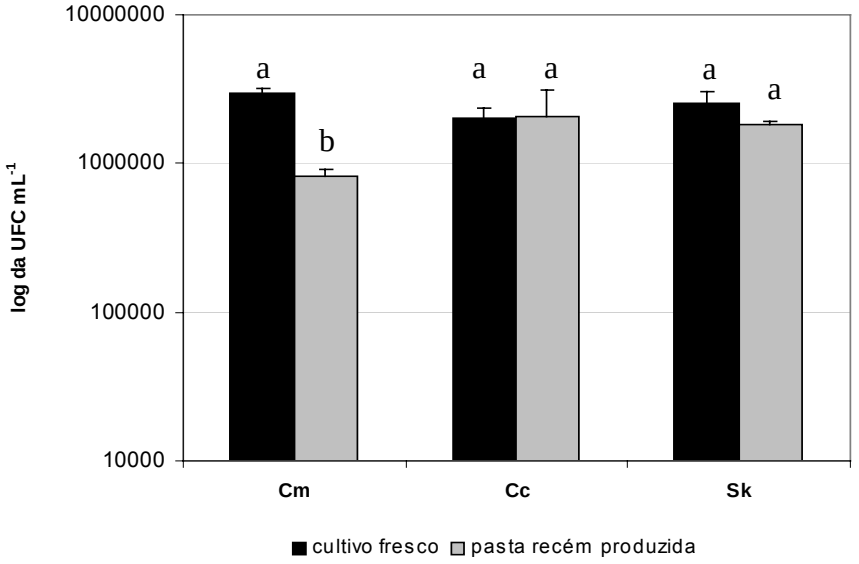


Figura 2 - Quantidade de bactérias marinhas totais presentes no cultivo fresco e na pasta recém produzida das espécies *de Chaetoceros muelleri, Chaetoceros calcitrans e Skeletonema* sp. n = 6 para cada espécie. Dados com a mesma letra não diferiram significativamente quando comparados os resultados separadamente, para cada uma das espécies (p > 0,05).

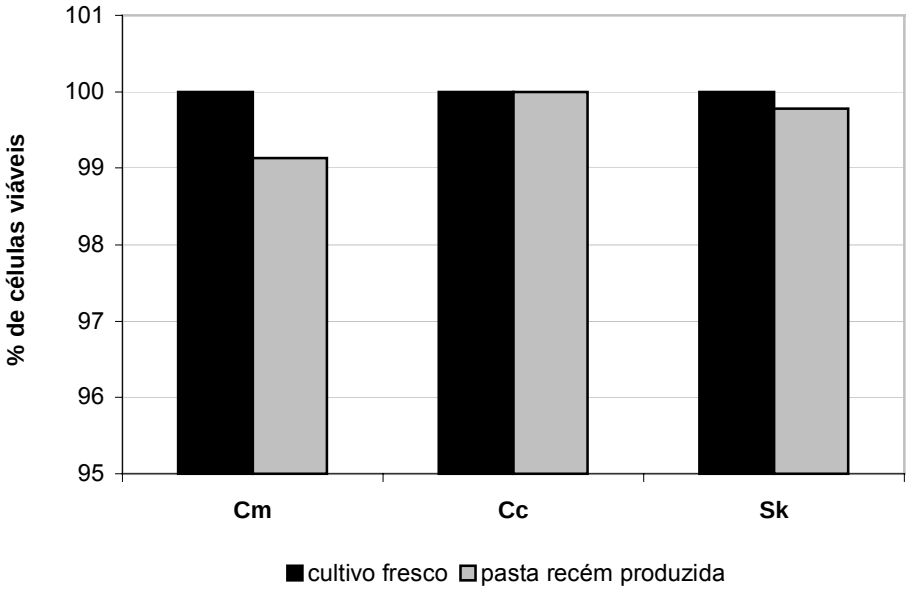


Figura 3 - Influência da centrifugação sobre a taxa de viabilidade das células (azul de Evan) das microalgas *Chaetoceros muelleri, Chaetoceros calcitrans* e *Skeletonema* sp. n = 9 para cada tratamento.

3.2. Avaliação da qualidade da pasta armazenada

As pastas das microalgas armazenadas com 0,1% do aditivo Vitamina C (*C. muelleri* e *C. calcitrans*) apresentaram tempo de prateleira inferior a 2 semanas, fase em que ocorreu um decréscimo abrupto da porcentagem de células viáveis (Figura 4 - A e B) . Com base nestes resultados não foi aplicado aditivo na microalga *Skeletonema* sp.

As respostas obtidas com as pastas armazenadas sem aditivo foram positivas. Os resultados com o corante Azul de Evan indicaram que as células permaneceram viáveis (mais de 99%) até a sexta semana para a espécie *C. muelleri*, sétima para a espécie *Skeletonema* sp. e oitava semana para a microalga *C. calcitrans*, como pode ser visualizado na Figura 4. Ao longo deste período, os concentrados apresentaram uma fácil re-suspenção quando diluídos em água do mar, sem formação de grumos nessa etapa.

Não houve diferença estatística no incremento do número de bactérias durante o armazenamento das pastas sem aditivo ao longo do experimento para as espécies *C. calcitrans* e *Skeletonema* sp.. No caso da *C. muelleri*, foi observado aumento significativo

no número de bactérias a partir da sexta semana. Esta variou de 8,3 x 10^5 UFC mL^{-1} para 14 x 10^5 UFC mL^{-1} (Figura 5).

Na pasta da microalga *C. muelleri* não foi observada a formação de aglomerado celular em nenhuma etapa do processo. No entanto, foi detectada deformação de algumas células, as quais apresentaram formato mais alongado e afinado, com seu conteúdo celular deslocado para um dos lados da célula. Quando avaliadas as espécies *C. calcitrans* e *Skeletonema* sp., tanto na pasta recém produzida, quanto na armazenada, observou-se grande quantidade de células aglomeradas e em cadeias durante o período de armazenamento.

A partir da segunda semana de armazenamento, o odor da pasta da microalga *C. calcitrans* apresentou um padrão definido como extremamente ofensivo, enquanto na pasta da *Skeletonema* sp., este efeito foi percebido na quarta semana. A pasta da espécie *C. muelleri* apresentou esse odor mais intenso a partir da sétima semana.

Na sexta semana, a curva de crescimento de *Chaetoceros muelleri* apresentou a menor DCM obtida entre as curvas analisadas ao longo do período de armazenamento ($p<0,05$). A partir da sétima semana, houve dificuldade em realizar a curva de crescimento. Durante as semanas anteriores não foi observada diferença significativa na DCM das pastas armazenadas (Figura 6).

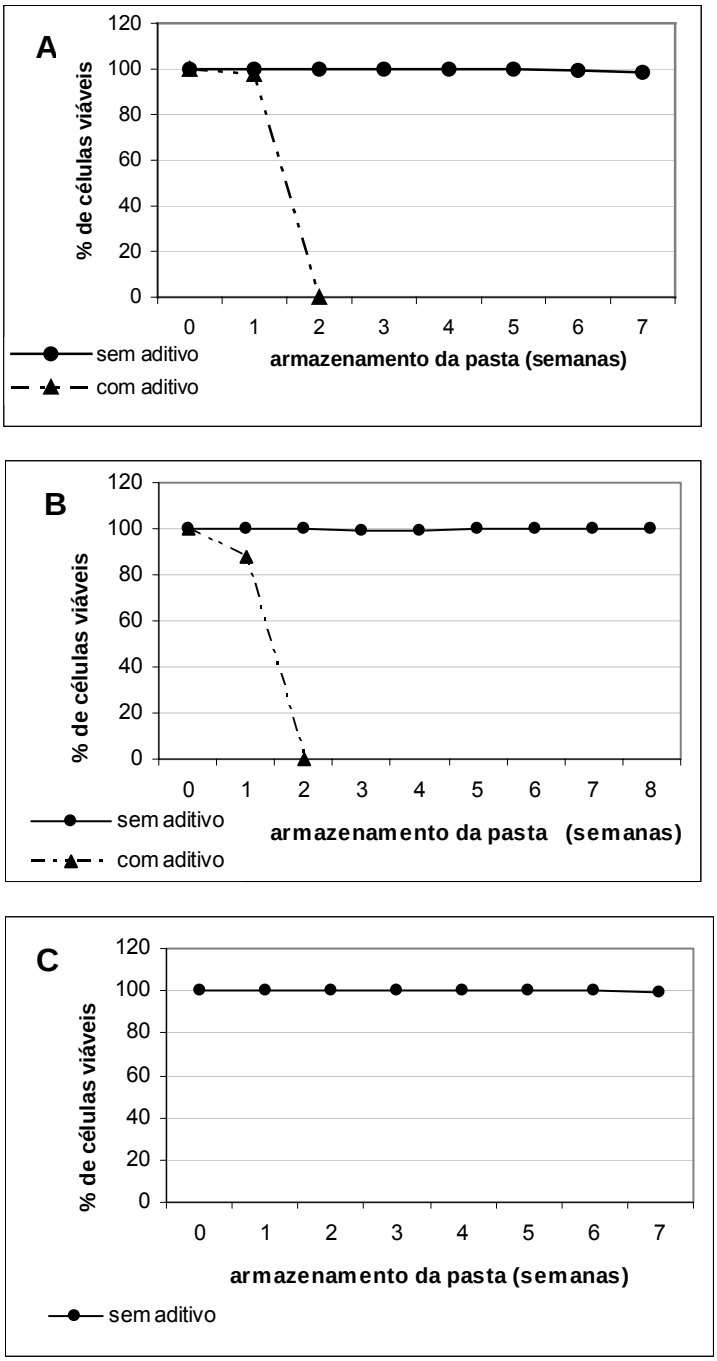


Figura 4 - Influência do armazenamento sobre a taxa de viabilidade das células da pasta das microalgas: A) *Chaetoceros muelleri*; B) *Chaetoceros calcitrans;* C) *Skeletonema* sp.

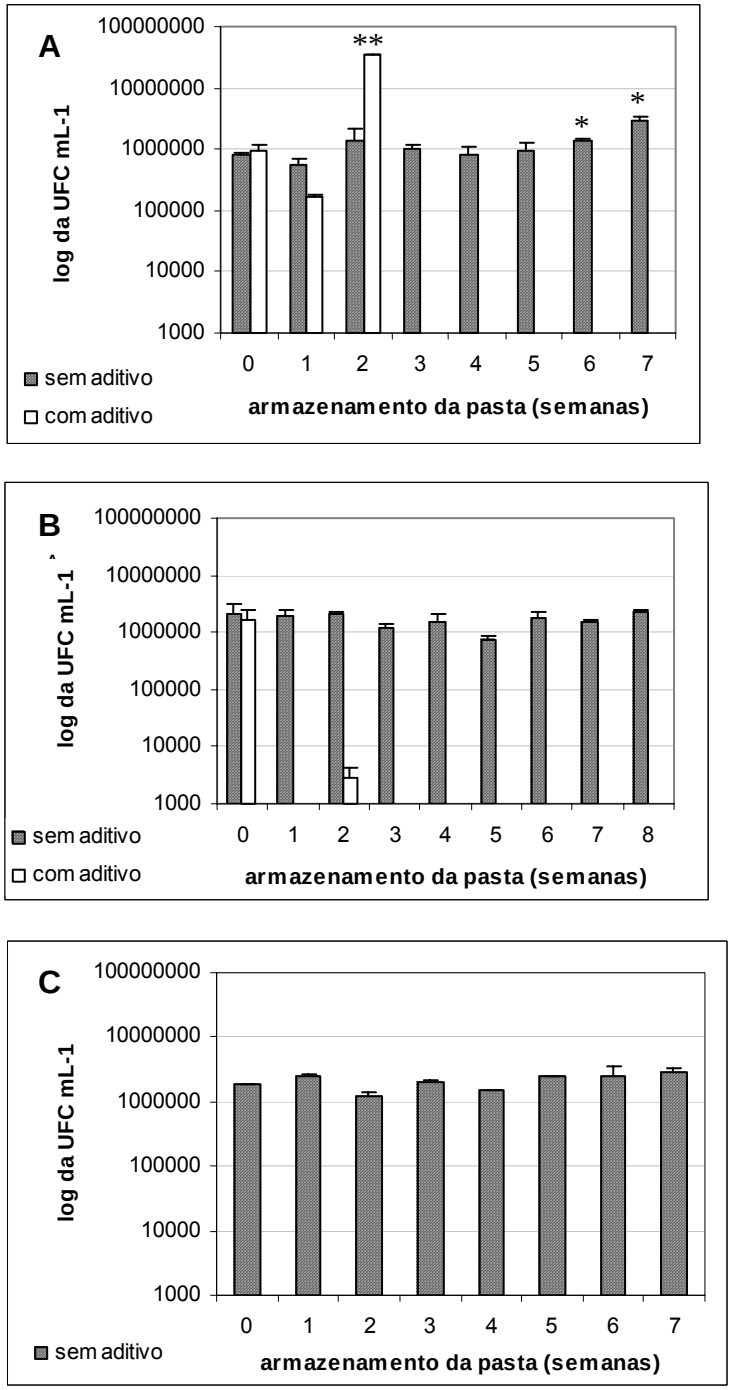


Figura 5 - Quantidade de bactérias marinhas totais detectadas na pasta armazenada das espécies: A) *Chaetoceros muelleri; B) Chaetoceros calcitrans; C) Skeletonema* sp. n = 6 para cada tratamento. Dados com * e ** diferiram significativamente quando comparados com seus resultados para o tempo inicial do experimento, em seus respectivos tratamentos (p>0,05).

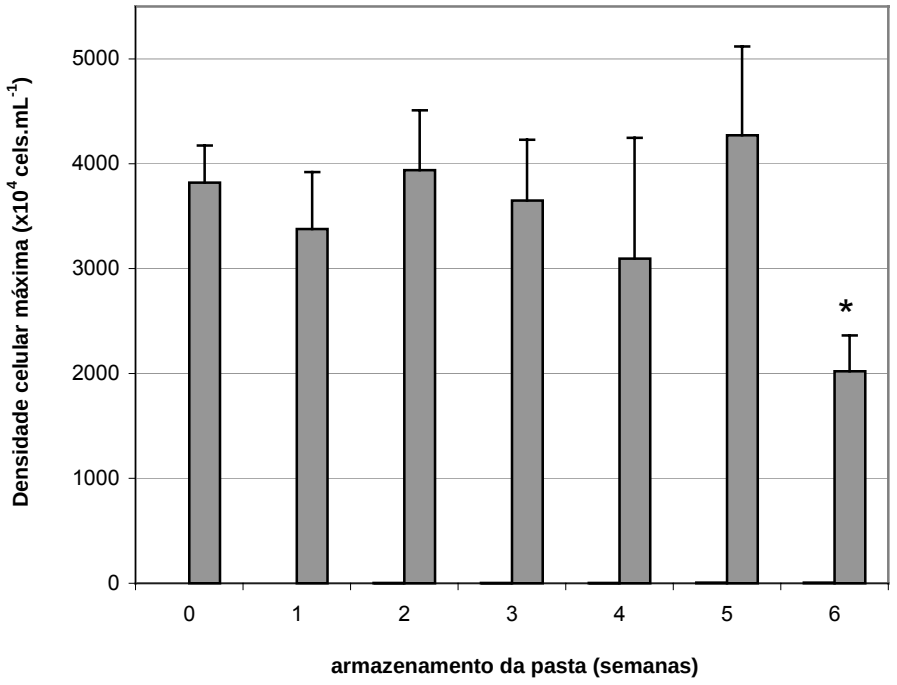


Figura 6 - Densidades celulares máximas da microalga *Chaetoceros muelleri*, obtidas através das curvas de crescimento a partir de amostras das pasta armazenadas. n = 3 para cada tratamento. O dado com * diferiu significativamente quando comparado com o resultado para o tempo inicial do experimento (p>0,05).

4. DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou a viabilidade de produção, pelo método de centrifugação, de pasta das microalgas *Chaetoceros muelleri, C. calcitrans* e *Skeletonema* sp. Os concentrados produzidos permaneceram com suas células viáveis por um período de 6 a 8 semanas quando estocados sob refrigeração.

O método de centrifugação é o mais citado (MONTAINI et al., 1995; MCCAUSLAND et al., 1999; ROBERT et al., 2001) e o que apresenta os melhores resultados para a obtenção de grande biomassa de microalgas, sendo utilizado por empresas produtoras de pasta de microalgas comercial (Instant Algae, 2005). Sabe-se que não é somente o método, nem a espécie de microalga que influencia no resultado, mas, também a

qualidade das células e do cultivo fresco a ser concentrado. Deve-se buscar obter cultivos com parâmetros microbiológicos adequados, além do que as células devem manter suas características morfológicas, não indicando nenhum tipo de estresse fisiológico.

As espécies de microalgas utilizadas no desenvolvimento deste trabalho resistiram ao processo de concentração por centrifugação. Os resultados deste trabalho mostraram viabilidade de 99% das células, o que é superior às obtidas por Heasman et al. (2001), trabalhando em condições semelhantes às deste estudo, em diferentes ensaios realizados com a microalga *C. muelleri*, onde foram alcançados valores máximos de viabilidade de 88%.

Segundo Lee & Shen (2004) o processo de centrifugação pode reduzir o número de bactérias marinhas totais presentes nos cultivos de microalgas, melhorando assim a qualidade do concentrado. Neste estudo, foi observada redução significativa no número de bactérias para a espécie *C. muelleri* (Figura 2). Para as outras espécies o processo de centrifugação não resultou no decréscimo do número de bactérias presentes. No entanto, é interessante reforçar, que o cultivo fresco e a pasta produzida apresentaram número de bactérias na faixa de 10^5-10^6 UFC mL^{-1}, valores citados na literatura para culturas de microalgas (Lodeiros, 1988; Sugumar et al., 1998; De Bem, 1999; Pereira, 2000).

De acordo com os resultados de viabilidade das células (Figura 3) as pastas produzidas com aditivo Vitamina C, apresentaram tempo de armazenamento inferior quando comparado com as armazenadas sem aditivo. Alguns autores têm demonstrado que a utilização de aditivos pode melhorar a qualidade das pastas de microalgas (HEASMAN et al., 2000; HEASMAN et al., 2001), no entanto, isso não foi observado neste trabalho. Durante a realização dos testes preliminares para definir a metodologia de produção descrita neste trabalho, foram testados os aditivos: ácido ascórbico (vitamina C) e ácido cítrico. Conforme recomendado por Heasman et al. (2000) e Heasman et al. (2001), inicialmente utilizamos a vitamina C na concentração de 1% juntamente com o ácido cítrico, até o pH atingir entre 4 e 4,5.

Ao trabalhar com a aplicação desses aditivos isoladamente, ou em combinação, os tratamentos com ácido cítrico apresentaram-se letais nos primeiros dias. Por essa razão, optou-se por não utilizá-lo, visto que o benefício que ele proporciona diminuindo o pH também foi observado na vitamina C. Devido a esta característica, somada à sua ação

preventiva na oxidação dos ácidos graxos, foi escolhido o ácido ascórbico como o único aditivo a ser utilizado nos experimentos deste trabalho.

Para trabalharmos dentro da faixa de pH indicada pelos autores citados acima que trabalharam nas mesmas condições, foi aplicada a vitamina C na concentração de 0,1%, quantidade suficiente para o pH atingir entre 4 e 4,5 no momento do armazenamento. Mesmo trabalhando com baixa concentração de aditivo (0,1%), os resultados obtidos foram negativos, ocorrendo perda total das células na segunda semana do experimento. Durante o armazenamento, o pH da pasta com aditivo esteve na faixa de 5,0±0,7 enquanto que o da pasta mantida sem aditivo ficou em torno de 7,0±0,7. O fato do pH da pasta com aditivo estar fora da faixa ideal citada pela literatura (Bourne et al., 1989, Coutteau, 1996) pode ter influenciado na qualidade das células.

A maioria dos trabalhos publicados avalia a qualidade da pasta indiretamente através da resposta ao crescimento e sobrevivência de formas jovens de animais alimentados. Neste estudo, avaliamos a qualidade da pasta pela sua resistência à centrifugação e posterior armazenamento a 4ºC.

As respostas obtidas neste trabalho com as pastas armazenadas sem aditivo alcançaram valores de viabilidade das células acima de 95% para todas as espécies utilizadas, durante 6 a 8 semanas. Trabalhando também sem aditivo, Heasman et al. (2001) obtiveram para a microalga do gênero *Skeletonema* uma viabilidade máxima de 85% das células após 8 semanas de armazenamento, já com a espécie *Chaetoceros calcitrans*, neste mesmo período, foi observado uma viabilidade máxima de 60% quando analisado a resposta ao corante Azul de Evan. No caso do *C. muelleri, o*s autores citados conseguiram uma viabilidade das células de apenas 14% após duas semanas de armazenamento. Os resultados de melhor viabilidade obtidos no presente estudo indicam que, além da espécie trabalhada, alguns fatores como estado fisiológico das microalgas, cuidados na manipulação e na realização dos cultivos, além da metodologia aplicada durante a centrifugação, podem interferir no resultado final.

Embora em geral, os resultados deste estudo tenham sido melhores do que os de Heasman et al. (2000) também, neste trabalho, o menor tempo de prateleira obtido foi com a espécie *C. muelleri*. As alterações da morfologia celular, observadas para esta espécie durante o armazenamento, não foram observadas nas outras espécies trabalhadas. Isto,

somado aos outros resultados, indica que as espécies *C. calcitrans* e *Skeletonema* sp. são mais resistentes.

Um dos fatores que pode levar à degradação da qualidade da pasta é a oxidação dos ácidos graxos, principalmente dos polinsaturados. Embora as pastas tenham sido mantidas em baixa temperatura e no escuro, fato que diminui a oxidação desses compostos (MONTAINI et al., 1995; McCAUSLAND et al., 1999; HEASMAN et al., 2000), para uma avaliação mais precisa da qualidade do concentrado, além das análises realizadas, seria importante avaliar suas propriedades bioquímicas durante o armazenamento, como formas de garantir a qualidade nutricional do produto produzido.

5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados de viabilidade das células e presença de bactérias ao longo do experimento, podemos definir que, nas condições experimentais apresentadas, as pastas das microalgas marinhas quando concentradas através da centrifugação e estocadas sem a adição de aditivos, no escuro, sob refrigeração a 4±1ºC, podem ser armazenadas por período de 6, 7 e 8 semanas para as espécies *C. muelleri*, *Skeletonema sp*. e *C. calcitrans*, respectivamente.

A definição dessa metodologia de produção e armazenamento da pasta contribui para otimizar o potencial produtivo do Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina (LMM-UFSC) e também, fornece subsídios para introduzir no mercado brasileiro um novo e promissor produto.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. Dr. Cláudio Manuel Rodrigues de Mello pelo auxílio nas análises estatísticas e, aos órgãos financiadores CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos), FAPESC (Fundação de Amparo à Pesquisa de Santa Catarina) e à Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina.

7. REFERÊNCIAS

Albentosa M., Pérez-Camacho A., Labarta, U., Fernández-Reiriz M. J., 1997, Evaluation of freeze-dried microalgal diets for the seed culture of *Ruditapes decussatus* using physiological and biochemical parameters. Aquaculture. 154, 305-321.

Amjad S., Jones D. A., 1992, A evaluation of artificial larval diets used in the culture of penaeid shrimp larvae *Penaeus monodon* (Fabricius). Pakistan J. Zoology. 24, (2), 135-142.

Benemann, J. R., 1992, Microalgae aquaculture feeds. J. Appl. Phycol. 4, 233-245.

Borowitzka M.A, 1997, Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. J. Appl. Phycol. 9, 393-401.

Bourne N., Hodgson C. A., Whyte C.A., 1989, Manual for scallop culture in British Columbia. Canadian technical report of fisheries and aquatic sciences, Nanaimo, n.1694, 215p.

Brown M.R., Robert R., 2002, Preparation and assessment of microalgal concentrates as feeds for larval and juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Aquaculture. 207, 289-309.

Cañavate J.P., Fernándes-Díaz C., 2001, Pilot evaluation of freeze-dried microalgae in the mass rearing of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. Aquaculture. 193, 257-269.

Cordero Esquivel B., Voltolina Lobina D., 1996, Nutricional value of preserved microalgae for subadult *Mytilus galloprovincialis*. Journal of the World Aquaculture Society. 27, 113-118.

Cordero B., Voltolina D., 1997, Viability of mass algal cultures preserved by freezing and freeze-druing. Aquacultural Engineering. 16, 205-211.

Coutteau P., Sorgeloos P., 1992, The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an internatinal survey. J. Shellfish Res. 11, 467-476.

Coutteau P., 1996, Micro-algae. In: Lavens P., Sorgeloos P. (Eds.) Manual on the production and use of live food for aquaculture, Rome, FAO Fisheries Technical Paper, n. 361, pp. 7-48.

Coutteau P., Castell J.D., Ackman R.G., Sorgeloos P., 1996, The use of lipid emulsions as carriers for essencial fatty acids in bivalves: a test case with juvenile *Placopecten magellanicus.* J. Shellfish Res. 15, 259-264.

Curatolo A., Ryan M. J., Mercer. J. P., 1993, An evaluation of the performance of Manila clam spat (*Tapes philippinarum*) fed on different ratios of spray-dried algae (*Tetraselmis suecica*). Aquaculture. 112, 179-186.

De Bem M.M., 1999, Efeitos da adição de antibióticos no cultivo de larvas de Nodipecten *nodosus* (LINNAEUS, 1758) (Bivalvia: Pectinidae). Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina.

Douillet P., 1993, Bacterivory in Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. Mar. Biol. 98, 123-134.

Douillet P., Langdon C.J., 1993, Efects of marine bacteria on the culture of axenic oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) larvae. Biol. Bull. 18, 36-51.

Duerr E.O., Molnar A., Sato V., 1998, Cultured microalgae as aquaculture feeds. J. Mar. Biotechnol. 7, 65-70.

Fulks W., Main K.L., 1991. The design and operation of commercial-scale live feeds production systems. In: Fulks, W., Main, K.L. (Eds.), Rotifer And Microalgae Culture Systems, Proceedings of a U.S. – Asia Workshop. The Oceanic Institute, Honolunu, pp. 03-52.

Guillard R. R. L. , 1973. Division rates. In: J. R. Stein (Eds.), Handbook of phycological methods – Culture Methods & Growth Measurements. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 289-311.

Heasman M., Diemar J., O'connor W., Sushames T., Foulkes L. , 2000, Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs – a summary. Aquaculture Research. 31, 637-659.

Heasman M. P.; Sushames T.M.; Diemar J. A.; O'connor W. A.; Foulkes L. A. , 2001, Production of Micro-algal Concentrates for Aquaculture. Part 2: Development and Evaluation of Harvesting, Preservation, Storage and Feeding Technology. Austrália: NSW Fisheries Final Report Series. 34, 150 p. (FRDC Project nº 93/123 & 96/342).

Instant Algae, 2004, [Disponível em http:// www.instantalgae.com].

Jones G.G., Jones B.L., 1988, Advances in the remote setting of oyster larvae. Aquaculture and commercial fisheries branch of the British Columbia Ministry of Agriculture and Fisheries. Canadá, 46p.

Knaue A

Navarro N., Sarasquete M.C., 1998, Use of freeze-dried microalgae for rearing gilthead seabream *Sparus aurata* larvae: Part I: Growth, histology and water quality. Aquaculture. 167, 179-193.
Nell J.A., O'connor W.A., 1991, The evaluation of fresh algae e stored algal concentrates as a food source for Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley). Aquaculture. 99, 277-284.
Nell J.A., Diemar J.A., Heasman M.P., 1996, Food value of live yeasts and dry yeast-based diets fed to Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis* spat. Aquaculture. 145, 235-243.
Numaguchi K., Nell J. A., 1991 , Effects of gelatin acacia microcapsule and alga meal supplementation of alga diets on growth of Sydney rock Oyster *Saccostrea commercialis* (Iredale an Roughley) larvae. Aquaculture. 94, 65-78.
O'connor W.A., Heasman, M.P., 1997 , Diet and feeding regimens for larval doughboy scallops, *Mimachlamys asperrima*. Aquaculture. 158, 289-303.
Okauchi M., 1991, The status of phytoplankton production as food organisms in Japan. In: Rotifer And Microalgae Culture Systems, Proceedings of a U.S. - Asia workshop. The Oceanic Institute, Honolunu, pp. 247-256.
Papandroulakis N., Kentouri M., Stefanakis S., Tredidi M., Divanach P., 1996, Comparative value of live and frozen marine (*Chlorella*) for seabream (*Sparus aurata*) larviculture with the pseudo green water technique. In: Refrigeration And Aquaculture, Proceeding of the conference of IIR Commission C2, France, Burdeaux, pp. 73-81.
Pereira A., 2000, Estudo da flora bacteriana associada a larvicutura de *Nodipecten nodosus* (LINNAEUS, 1758 - Bivalvia: Pectinidae). Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina.
Ponis E., Robert R., Parisi G., 2003, Nutritional value of fresh and concentrated algae diets for larval and juvenile Pacific oysters (*Crassotrea gigas*). Aquaculture. 221, 491-505.
Reef Central, 2005 [Disponível em http://www.reefcentral.com].
Robert R., Parisi G., Rodolfi L., Poli B. M., Tredici M. R., 2001, Use of fresh and preserved *Tetraselmis suecica* for feeding *Crassostrea gigas* larvae. Aquaculture. 192, 333-346.
Silva F.C., Pereira A., Canozzi M.B., Araújo S.C., 2004, Cultivo de microalgas marinhas. In: Poli C.R., Poli A. T. B., Andreatta E., Beltrame E. (Org.). Aqüicultura: Experiências brasileiras, Florianópolis, Multitarefa Editora Ltda, pp. 93-120.
Souza F.M.L.D., Lecossois D., Heasman M.P., Diemar J.A., Jackson C.J., Pendrey R.C., 2000 , Evaluation of centrifuged microalgae concentrates as diets for *Penaeus monodon* FABRICIUS larvae. Aquaculture Research. 31, 661 – 670.
Souza F.M.L.D., Knuckey R. M., Hohmann S., Pendrey R.C., 2002 , Floculated microalgae concentrates as diets for larvae of the tiger prawn *Penaeus monodon* FABRICIUS. Aquaculture Nutrition. 8, 113 – 120.
Sugumar G., Nakai T., Hirata Y., Matsubara D., Muroga K., 1998 , *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. Dis. Aquat. Org. 33, 111-118.
Tzovenis I., Triantaphyllidis G., Naihong X., Chatzinikolaou E., Papadopoulou K., Xouri G., Tafas T., 2004 , Cryopreservation of marine microalgae and potential toxicity of cryoprotectants to the primary steps of the aquacultural food chain. Aquaculture. 230, 457-473.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA INTRODUÇÃO

ALBENTOSA, M.; A. PÉREZ-CAMACHO; U. LABARTA; M. J. FERNÁNDEZ-REIRIZ. Evaluation of freeze-dried microalgal diets for the seed culture of *Ruditapes decussatus* using physiological and biochemical parameters. **Aquaculture,** v. 154, p. 305-321, 1997.

AMJAD, S.; JONES D. A. An evaluation of artificial larval diets used in the culture of penaeid shrimp larvae *Penaeus monodon* (Fabricius). **Pakistan J. Zoology**, v. 24, n. 2, p. 135-142, 1992.

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

BEARDALL, J., BURGER-WIERSMA, T., RIJKEBOER, M., SUKENIK, A., LEMOALLE, J., DUBINSKY, Z., FONTVIELLE, D. Studies on enhanced post-illumination respiration in microalgae. **J. Plankton Res**., v. 16, p. 1401-1410, 1994.

BENEMANN, J. R. Microalgae aquaculture feeds. **J. Appl. Phycol.,** v. 4, p. 233-245, 1992.

BOROWITZKA, M.A. Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. **J. Appl. Phycol.,** v. 9, p. 393-401, 1997.

BROWN, M.R.; JEFFREY, S.W.; GARLAND, C.D. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture; a literature review. **CSIRO Marine Laboratories Report**, v. 205, p. 1-43, 1989.

BROWN, M.R. The amino-acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.,** v. 145, p. 79-99, 1991.

BROWN, M.R.; JEFFREY, S.W.; VOLKMAN, J.K.; DUNSTAN, G.A. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture,** v. 151, p. 315-331, 1997.

BROWN, M.R.; ROBERT R. Preparation and assessment of microalgal concentrates as feeds for larval and juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Aquaculture,** v. 207, p. 289-309, 2002.

CAÑAVATE, J.P.; FERNÁNDES-DÍAZ, C. Pilot evaluation of freeze-dried microalgae in the mass rearing of gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae. **Aquaculture**, v. 193, p. 257-269, 2001.

CORDERO ESQUIVEL, B.; VOLTOLINA LOBINA, D. Nutritional value of preserved microalgae for subadult *Mytilus galloprovincialis*. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 27, p. 113-118, 1996.

CORDERO, B.; VOLTOLINA, D. Viability of mass algal cultures preserved by freezing and freeze-drying. **Aquacultural Engineering**, v. 16, p. 205-211, 1997.

COUTTEAU, P.; SORGELOOS, P. The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey. **J. Shellfish Res**., v. 11, p. 467-476, 1992.

COUTTEAU, P.; CASTELL, J.D.; ACKMAN, R.G.; SORGELLOS, P. The use of lipid emulsions as carriers for essencial fatty acids in bivalves: a test case with juvenile *Placopecten magellanicus.* **J. Shellfish Res.,** v. 15, p. 259-264, 1996.

CURATOLO, A.; M. J. RYAN; J. P. MERCER. An evaluation of the performance of Manila clam spat (*Tapes philippinarum*) fed on different rations of spray-dried algae (*Tetraselmis suecica*). **Aquaculture**, v. 112, p. 179-186, 1993.

DE PAUW, N.; PERSOONE, G.. Micro-algae for aquaculture. In: Borowitzka, M. A., Borowitzka, L. J. (Eds.). **Micro-algal Biotechnology**. Cambridge Univ. Press, Cambridge, p. 197-221, 1988.

DOUILLET, P. Bacterivory in Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. **Mar. Biol.**, v. 98, p. 123-134, 1993.

DOUILLET, P.; LANGDON, C.J. Efects of marine bacteria on the culture of axenic oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) larvae. **Biol. Bull.,** v. 18, p. 36-51, 1993.

DUERR, E.O.; MOLNAR, A.; SATO, V. Cultured microalgae as aquaculture feeds**. J. Mar. Biotechnol.,** v. 7, p. 65-70, 1998.

FAO, 2003. **Estado mundial da pesca e Aqüicultura em 2002.** Disponível em: <http://www.fao.org> Acesso em julho de 2005.

FULKS, W.; MAIN, K.L. The design and operation of commercial-scale live feeds production systems. In: ROTIFER AND MICROALGAE CULTURE SYSTEMS, 1991, Honolunu. **Proceedings of a U.S. – Asia Workshop.** Honolunu: The Oceanic Institute, p. 03-52. 1991.

GALVÃO, M. S. N; N. YAMANAKA; S. TANJI. Preservação de duas microalgas *Nannocloropsis oculata* e *Tetraselmis tetrathele* por resfriamento e congelamento. **B. Inst. Pesca,** São Paulo, v. 23, p. 1-11, 1996.

GONZALEZ, L.E.; CANIZARES, R.O.; BAENA, S. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. **Bioresource Technology**, v. 60, n. 3, p. 259-262, 1997.

GUILLARD, R. R. L. Division rates. In: J. R. Stein (Eds.). **Handbook of phycological methods – Culture Methods & Growth Measurements.** Cambridge, 1973. Cambridge University Press, p. 289-311.

HEASMAN, M.; DIEMAR, J.; O'CONNOR, W.; SUSHAMES, T.; FOULKES, L. Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs – a summary. **Aquaculture Research,** v. 31, p. 637-659, 2000.

HEASMAN, M. P.; SUSHAMES, T.M.; DIEMAR, J. A.; O'CONNOR, W. A.; FOULKES, L. A. **Production of Micro-algal Concentrates for Aquaculture. Part 2: Development and Evaluation of Harvesting, Preservation, Storage and Feeding Technology.** Austrália: NSW Fisheries Final Report Series, 2001. nº. 34, 150 p. (FRDC Project nº 93/123 & 96/342).

HOLLIDAY, J.E.; ALLAN, G.L.; FRANCES, J. Cold storage effects on setting of larvae of Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis* and the Pacific oyster *Crassostrea gigas.* **Aquaculture**, v. 92, p. 179-185, 1991.

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

JONES, G.G.; JONES, B.L. 1988. **Advances in the remote setting of oyster larvae.** Aquaculture and commercial fisheries branch of the British Columbia Ministry of Agriculture and Fisheries. Canadá, 46p.

KNAUER, J.; SOUTHGATE, P.C. A Review of the Nutritional Requeriments of Bivalves and the Development of Alternatives and Artificial Diets for Bivalve Aquaculture. **Reviews in Fisheries Science,** v. 7, p. 241-280, 1999.

KUBAN, F.J.; WINKENFELD, J.; LAWRENCE, A. Survival and growth of *Penaeus setiferus* and *Penaeus aztecus* larvae fed Artemia beginning at the protozoea two substage versus the mysis one substage. **World Mariculture Soc**., v. 14, p. 38-43, 1983.

LAING, I.; HELM, M.M. Factors affecting the semi-continuos production of *Tetraselmis suecica* (Kylin) Buth in 200 L vessels. **Aquaculture,** v. 22, p. 137-148, 1981.

LI, H.B.; CHEN, F.; ZHANG, T.Y.; YANG, F.Q.; XU, G.Q. Preparative isolation and purification of lutein from the microalga *Chlorella vulgaris* by high-speed counter-current chromatography**. J. Chromatogr A**, v. 905, p. 151-155, 2001.

LUBZENS, E.; GIBSON, O.; ZMORA, O.; SUKENIK, A. Potential advantages of frozen algae (*Nannochloropsis* sp.) for rotifer (*Brachionus plicatilis*) culture. **Aquaculture**, v. 133, p. 295-309, 1995.

MEDINA-REYNA, C.E.; RONSON-PAULIN, J.A.; HERNÁDEZ-ROJAS, F.; SANTIAGO-MORALES, I.; PEDROZA-ISLAS, R.; VERNON-CARTER, E.J. Dual benefits of whey Protein Concentrate in a microencapsulated diet for larval white shrimp, *Litopenaeus vannamei.* **Journal of the World Aquaculture Society,** v. 36, n. 3, p. 401-411, 2005.

McCAUSLAND, M. A.; M. R. BROWN; S. M. BARRETT; J. A. DIEMAR; M. P. HEASMAN. Evaluation of live microalgae and microalgal pastes as supplementary food for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). **Aquaculture**, v. 174, p. 323-342, 1999.

MOLINA GRIMA, E.; SÁNCHEZ PÉREZ, J.A.; GARGÍA CAMACHO, F.; ACIÉN FERNÁNDEZ, F.G.; LÓPEZ ALONSO, D.; SEGURA DEL CASTILLO, C.I. Preservation of the marine microalga, *Isochrysis galbana*: influence on the fatty acid profile. **Aquaculture,** v. 123, p. 377-385, 1994.

MONTAINI, E.; G. C. ZITTELLI; M. C. TREDICI; E. M. GRIMA; J. M. F. SEVILLA; J. A. S. PÉREZ. Long term preservation of *Tetraselmis suecica*: influence of storage on viability and fatty acid profile. **Aquaculture**, v. 134, p. 81-90, 1995.

NAVARRO, N.; SARASQUETE, M.C. Use of freeze-dried microalgae for rearing gilthead seabream *Sparus aurata* larvae: Part I: Growth, histology and water quality. **Aquaculture,** v. 167, p. 179-193, 1998.

NELL, J.A.; O'CONNOR, W.A. The evaluation of fresh algae and stored algal concentrates as a food source for Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley). **Aquaculture**, v. 99, p. 277-284, 1991.

NELL, J.A.; DIEMAR, J.A.; HEASMAN, M.P. Food value of live yeasts and dry yeast-based diets fed to Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis* spat. **Aquaculture**, v. 145, p. 235-243, 1996.

NUMAGUCHI, K.; NELL, J. A. Effects of gelatin acacia microcapsule and alga meal supplementation of alga diets on growth of Sydney rock Oyster *Saccostrea commercialis* (Iredale an Roughley) larvae. **Aquaculture,** v. 94, p. 65-78, 1991.

O'CONNOR, W.A.; HEASMAN, M.P. Diet and feeding regimens for larval doughboy scallops, *Mimachlamys asperrima*. **Aquaculture**, v. 158, p. 289-303, 1997.

OKAUCHI, M. The status of phytoplankton production as food organisms in Japan. In: ROTIFER AND MICROALGAE CULTURE SYSTEMS, 1991, Honolunu. **Proceedings of a U.S. - Asia workshop.** Honolunu: The Oceanic Institute, p. 247-256. 1991.

PAPANDROULAKIS, N.; KENTOURI, M.; STEFANAKIS, S.; TREDIDI, M.; DIVANACH, P. Comparative value of live and frozen marine (*Chlorella*) for seabream (*Sparus aurata*) larviculture with the pseudo green water technique. In: REFRIGERATION AND

AQUACULTURE, 1996, Burdeaux. **Proceeding of the conference of IIR Commission C2**, France, p. 73-81, 1996.

PONIS, E.; ROBERT, R.; PARISI, G. Nutritional value of fresh and concentrated algae diets for larval and juvenile Pacific oysters (*Crassotrea gigas*). **Aquaculture,** v. 221, p. 491-505, 2003.

PULZ, O.; SCHEIBENBOGEN, K.; GROSS, W. Biotechnology with cianobacteria and microalgae. In: REHM, H.J.; REED, G. **Biotechnology,** Weinheim: Wiley-VCH, v. 10, p. 105-136, 2001.

REEF CENTRAL, 2005. Disponível em <http://www.reefcentral.com> Acesso em agosto de 2005.

ROBERT, R.; TRINTIGNAC, P. Substitutes for live microalgae in mariculture: a review. **Aquat. Living Resource,** v. 10, p. 315-327, 1997.

ROBERT, R.; G. PARISI; L. RODOLFI; B. M. POLI; M. R. TREDICI. Use of fresh and preserved *Tetraselmis suecica* for feeding *Crassostrea gigas* larvae. **Aquaculture,** v. 192, p. 333-346, 2001.

ROSA, F.S. 1999. Apuração de custos de produção de sementes de ostra no Laboratório de Cultivo de Moluscos Marinhos da UFSC/SC. Trabalho de conclusão de curso para obtenção do grau de bacharel em Ciências Contábeis (Monografia). Florianópolis, 70p.

SILVA, F.C.; PEREIRA, A.; CANOZZI, M.B.; ARAÚJO, S.C. Cultivo de microalgas marinhas. In: Poli, C.R.; Poli, A. T. B.; Andreatta, E.; Beltrame, E. (Org.). **Aqüicultura: Experiências brasileiras.** Multitarefa Editora Ltda. Florianópolis, p. 93-120. 2004.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; ROCHA, O. **Produção de Plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para Alimentação de Organismos Aquáticos.** São Carlos: Rima, 106 p. 2003.

SOUDANT, P.; Y. MARTY; J. MOAL; H. MASSKI; J. F. SAMAIN. Fatty acid composition of polar lipid classes during larval development of scallop *Pecten maximus* (L.). **Comp. Biochem. Physiol. Part A**, v. 121, p. 279-288, 1998.

SOUZA, F.M.L.D.; LECOSSOIS, D.; HEASMAN, M.P.; DIEMAR, J.A.; JACKSON, C.J.; PENDREY, R.C. Evaluation of centrifuged microalgae concentrates as diets for *Penaeus monodon* FABRICIUS larvae. **Aquaculture Research**, v. 31, p. 661 – 670, 2000.

SOUZA, F.M.L.D.; KNUCKEY, R. M.; HOHMANN, S.; PENDREY, R.C. Floculated microalgae concentrates as diets for larvae of the tiger prawn *Penaeus monodon* FABRICIUS. **Aquaculture Nutrition**, v. 8, p. 113 – 120, 2002.

TZOVENIS I.; TRIANTAPHYLLIDIS, G.; NAIHONG, X.; CHATZINIKOLAOU, E.; PAPADOPOULOU, K.; XOURI, G.; TAFAS, T. Cryopreservation of marine microalgae and potential toxicity of cryoprotectants to the primary steps of the aquacultural food chain. **Aquaculture,** v. 230, p. 457-473, 2004.

VIEIRA, A.A.H. **Estudos experimentais em fitoplâncton marinho – cultura e aspectos ecofisiológicos.** 1975. 102 p. Tese (Mestrado). Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 1975.

WILDE, E.W.; BENEMANN, J.R. Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. **Biotcnol. Adv**., v. 11, n. 4, p. 781-812, 1993.

WIKFORS, G. H.; G. W. PATTERSON; P. GOSH; R. A. LEWIN; B. C. SMITH; J. H. ALIX. Growth of post-set oyster, *Crassostrea virginica*, on high lipid strains for algal flagellates, *Tretaselmis* sp. **Aquaculture,** v. 143, p. 411-419, 1996.

Instructions to Authors Aquatic Living Resources

Original papers only will be considered. Manuscripts are accepted for review with the understanding that the same work has not been and will not be nor is presently submitted elsewhere, and that its submission for publication has been approved by all the authors. There are no page charges.

Manuscript submission
Authors are invited to suggest the names of potential referees. On initial submission, authors can submit a single .doc, pdf or rtf file with tables and figures embedded at the
end of the paper.
Authors are encouraged to submit their manuscripts via email, but only through the Editor-in-chief at bmilcend@ifremer.fr Brigitte Milcendeau, Aquatic Living Resources, Ifremer, BP 21105, 44311 Nantes Cedex 3, France.
Authors can also send a single file, saved on a CD-Rom or a diskette.
In addition, one hard copy of the manuscript is required, accompanied by original figure artwork.

Revised manuscript
The revised manuscript should be sent by e-mail as an attachment with a covering letter outlining the main modifications.

Acceptance stage
Publication will follow receipt of a signed copyright agreement form. A signed copy of the completed Colour Work Agreement Form must be returned to EDP Sciences before colour work can be processed.
The author should provide the text in Latex format preferably. Word or RTF formats are also accepted. Figures may be provided in EPS, TIFF, Word format or PDF. Files of scanned line graphics can be accepted
preferably at a resolution of 1000 dpi, for scanned halftones (300 dpi) and scanned line/tones (500 dpi). Colour illustrations should be scanned in at 300 dpi (500 dpi for combination of both colour/line tones).

Categories of contribution
Full Paper – A full paper is a contribution describing original research, including theoretical exposition, extensive data and in-depth critical evaluation. Full papers should be approximately 5000–8000 words including abstract and references.

Review Paper – Only critical review papers will be considered. The format and length of review papers are more flexible than for a full paper.

Technical Note – Original contribution that describes an important process or technique in no more than 3000 words.

Prospective Note – Theoretical research with a limited range of results, or critical evaluation, emerging new deas and trends. The purpose of a prospective note is to inform readers of development in a subject aera. Limited to 3000 words.

Manuscript preparation
List all authors and their affiliations. The full mailing address of the corresponding author must be supplied along with E-mail address and Telephone/Fax numbers.
All pages of your manuscript including the title page, references, tables and illustrations must be numbered and possess ample margins. Line numbering should be applied to each page of text.

The preferred structure of a full paper is as follows:
Paper title, Author's name(s), affiliation address(es), Abstract, Keywords, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Conclusion, Acknowledgements (optional), References, Appendix (optional), Figure captions, Tables, Figures.
The abstract should not exceed 300 words and should summarize aims, methodology, results and the conclusions reached.
Abbreviations should be avoided.
Standard International units should be used throughout, e.g. µg min-1.

References

Journal titles should be abbreviated according to the List of Serial Title Word Abbreviations (ISO 4) published by the ISSN International Centre, 20 rue Bachaumont, F-75002 Paris. http://www.issn.org

References should be cited in the text, e.g. (Smith 1999; Martin 2005), and listed in alphabetical order in the reference list.

Examples:

Journal articles

Chae D.R, Pascoe S., 2005, Use of simple bioeconomic models to estimate optimal effort levels in the Korean coastral flounder fisheries. Aquat. Living Resour. 18, 93-101.

Books

Cressie N.A.C., 1993, Statistics for spatial data. Revised edition, New-York, Wiley. Wiley Series in Probability and Mathematical Statistics.

DeAngelis D.L., Mooij W.M., Basset A.,2003, The importance of spatial scale in the modeling of aquatic ecosystems. In: Seuront L., Strutton P.G. (Eds.) Handbook of scaling methods in aquatic ecology, London, CRC Press, pp. 383-400.

Tables and figures

Tables should be numbered consecutively throughout (use Table 1, etc.). Each table must be accompanied by a caption written in the same font as the table text and situated directly above the table. Vertical lines should be avoided.

Illustrations should be numbered consecutively throughout (use Fig. 1, etc.). Plan your illustrations for a journal column width of 80 mm.

Colour illustrations may be published in the print version of the journal at the author's expense. Authors should notify the journal at the time of submission if they wish colour illustrations to accompany their article.

Alternatively, illustrations may be published in the print copy in black and white format with a colour version appearing in the online version, free of charge.

Each table or illustration must be on a separate page and they should be placedat the end of the manuscript.

Electronic-only material

Electronic-only material is designed to provide supplementary information which is either too voluminous for printing or is designed specifically for the Web, such as illustration in colour. Electronic-only material may include but is not restricted to:

• (Large) tables
• Appendices
• Programmes
• Images, video

For more information on the submission of this material, (file requirements, etc.), please contact the productionoffice.

Proofs – Reprints – Offprints

Proofs: PDF files, will be sent to the corresponding author only and should be returned to the Publisher within 48 hours of receipt.

The corresponding author will receive a PDF "reprint" of his or her article. Printed offprints can be supplied if ordered on the offprint form which accompanies the proofs.