



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
CENTRO DE ESTUDOS AMBIENTAIS COSTEIROS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MARINHAS TROPICAIS**

NATHANIEL GOMES DE OLIVEIRA

**CULTIVO INTEGRADO DA MICROALGA *Nannochloropsis oceanica* EM MEIO DE
CULTIVO ALTERNATIVO DE BAIXO CUSTO ECONÔMICO E DO CAMARÃO
MARINHO *Litopenaeus vannamei* EM TANQUES BERÇÁRIOS**

FORTALEZA

2022

NATHANIEL GOMES DE OLIVEIRA

CULTIVO INTEGRADO DA MICROALGA *Nannochloropsis oceanica* EM MEIO DE
CULTIVO ALTERNATIVO DE BAIXO CUSTO ECONÔMICO E DO CAMARÃO
MARINHO *Litopenaeus vannamei* EM TANQUES BERÇÁRIOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais. Área de concentração: Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos.

Orientador: Prof. Dr. Alberto Jorge Pinto Nunes.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O48c Oliveira, Nathaniel Gomes de.

Cultivo integrado da microalga *Nannochloropsis oceanica* em meio de cultivo alternativo de baixo custo econômico e do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* em tanque berçários / Nathaniel Gomes de Oliveira. – 2022.
49 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Alberto Jorge Pinto Nunes.

1. Fertilizantes agrícolas. 2. Biofiltro. 3. Berçário. 4. Pós-larvas. I. Título.

CDD 551.46

NATHANIEL GOMES DE OLIVEIRA

CULTIVO INTEGRADO DA MICROALGA *Nannochloropsis oceanica* EM MEIO DE
CULTIVO ALTERNATIVO DE BAIXO CUSTO ECONÔMICO E DO CAMARÃO
MARINHO *Litopenaeus vannamei* EM TANQUES BERÇÁRIOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Marinhas Tropicais.

Área de concentração: Utilização e Manejo de Ecossistemas Marinhos e Estuarinos.

Aprovada em: ___/___/_____.

Prof. Dr. Alberto Jorge Pinto Nunes (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Alexandre Firmino Diógenes
Universidade Federal de Rondônia (UNIR)

Dra. Jordana Sampaio Leite
Universidade Federal do Ceará (UFC)

“Dificuldades preparam pessoas comuns para destinos extraordinários”. C. S. Lewis.

ABSTRACT

Shrimp farming is a very important activity in Brazil and in the world. The use of pre-nursery and nursery and the use of integrated cultivation systems have been techniques used to enable a greater stocking density of cultivated shrimp and a better economic performance of shrimp farms companies. The use of microalgae to control water quality parameters in intensive aquaculture systems has been widely used, a technique known as “green water”. However, the cultivation of microalgae for the most diverse applications faces an economic obstacle due to the high costs of implementation and operation of medium and large-scale cultures. The use of cheaper culture media and mixo or heterotrophic microalgae growth has been studied by several authors. The objective of this work is to evaluate the development of the microalgae *Nannochloropsis oceanica* cultivated in an alternative medium of low economic cost, made by agricultural fertilizers, in experimental nursery ponds for marine shrimp *Litopenaeus vannamei* and to determinate the zootechnical performance of shrimp cultivated in the described conditions. The shrimp were cultivated for 28 days. Physical and chemicals parameters of the water, the cell density of the *N. oceanica* through the study and the zootechnical performance of the animals were evaluated. The experimental treatments were a total of five, being carried out in nursery tanks: a control without fertilization and algal inoculation (CTL), a treatment with f/2 medium, a more complex and complete culture medium in the supply of compounds for the cultivation of microalgae (T1), one with fertilization by alternative medium (Fertilizante3) without inclusion of an organic carbon source (T2), one with alternative medium and inclusion of refined sugar (T3) and one with alternative medium and inclusion of sugarcane molasses (T4). Treatment T2 had the highest productivity per volume and the highest average cell density of *N. oceanica* throughout the experiment with a lower concentration of ammonia in the water at the end of the experimental period. The concentration of nitrite and nitrate increases along the culture in the treatments, showing that the phytoplankton cell density was not capable of mitigate the presence of these compounds. The integrated cultivation of the microalgae *N. oceanica* and *L. vannamei* using and alternative medium composed of agricultural fertilizers showed low cell growth under the conditions tested and, consequently, a low regulatory role of the microalgae in the control of nitrogen compounds, not being positive for the improvement of shrimp zootechnical performance.

Palavras-chave: Agricultural fertilizers; Biofiltration ; Nursery; Postlarvae.

RESUMO

A carcinicultura é uma atividade muito importante no Brasil e no mundo. A utilização de pré-berçários e berçários, e a utilização de sistemas de cultivo integrados têm sido técnicas usadas para possibilitar uma maior densidade de estocagem de camarões cultivados e um melhor desempenho econômico das fazendas e empreendimentos de carcinicultura. O uso de microalgas para controle de parâmetros de qualidade de água em sistemas intensivos de aquicultura tem sido bastante empregado, uma técnica conhecida como “água verde”. Entretanto o cultivo de microalgas para as mais diversas aplicações apresenta um entrave econômico devido aos altos custos de implementação e operação de cultivos de média e grande escala. Uma alternativa de mitigação desse problema é a utilização de meios de cultivo mais baratos e cultivos mixo ou heterotróficos. O objetivo desse trabalho é de avaliar o desenvolvimento da microalga *Nannochloropsis oceanica* cultivada em meio alternativo de baixo custo econômico (Fertilizante 3) composto de fertilizantes agrícola, em tanques-berçários experimentais do camarão marinho *L. vannamei* e determinar o desempenho zootécnico dos camarões cultivados nessas condições. Os camarões foram cultivados por 28 dias e foram avaliados os parâmetros químicos e físicos da água, a densidade celular da *N. oceanica* ao longo do estudo e o desempenho zootécnico dos animais. Os tratamentos experimentais foram um total de cinco sendo realizados em tanques experimentais: controle sem fertilização e inoculação de algas (CTL), tratamento com meio f/2, meio mais complexo e completo no aporte de compostos para o cultivo de microalgas (T1), meio alternativo Fertilizante 3 sem inclusão de fonte de carbono orgânico (T2), meio alternativo e inclusão de açúcar refinado (T3) e meio alternativo e inclusão de melaço de cana-de-açúcar (T4). O tratamento T2 obteve a maior produtividade por volume de cultivo e a maior média de densidade celular de *N. oceanica* ao longo do experimento com uma menor concentração de amônia na água no final do período experimental. As concentrações de nitrito e nitrato aumentaram ao longo do cultivo, evidenciando que a densidade celular de fitoplâncton não foi suficiente para a redução da presença desses compostos. O cultivo integrado da microalga *N. oceanica* e do *L. vannamei* utilizando um meio alternativo composto por fertilizantes agrícolas apresentou baixo crescimento das células nas condições testadas e, conseqüentemente, baixo papel regulador da microalga no controle dos compostos nitrogenados, não sendo positivo para o melhoramento do desempenho zootécnico do camarão.

Palavras-chave: Fertilizantes agrícolas; Biofiltro; berçário; pós-larvas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Produção pesqueira e aquícola mundial (milhões de ton.) de 1950 a 2014	13
Figura 2 – Produção anual (em milhões de ton.) dos doze maiores produtores mundiais de camarão marinho.....	14
Figura 3 – Camarão marinho <i>Litopenaues vannamei</i>	15
Figura 4 – Produção de camarões no Brasil (1973 – 2019)	16
Figura 5 – Microalga <i>Nannochloropsis oceanica</i> vista em microscópio óptico com aumento de 400 x.....	20
Figura 6 – Fotobiorreatores da microalga <i>N. oceanica</i> em crescimento no laboratório de microalgas do Centro de Estudos Ambientais Costeiros (CEAC, LABOMAR/UFC)	22
Figura 7 – Câmara de Neubauer. Números indicam sequência de contagem de células para a estimativa da densidade celular.....	27

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Peso individual médio dos camarões ao longo do experimento. Valores apresentados como média \pm desvio padrão. Letras em comum em cada coluna indicam diferença estatística não significativa no peso corporal semanal segundo o teste de Tuckey HSD ao nível de significância de 0,05	30
Gráfico 2 – Densidade celular da <i>N. Oceanica</i> ao longo do experimento	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Tratamentos experimentais do presente estudo	25
Tabela 2	– Parâmetros físicos e químicos de qualidade de água medidos ao longo do experimento. Letras em comum em cada linha indicam diferença estatística não significativa no parâmetro de qualidade de água segundo o teste de Tuckey HSD ao nível de significância de 0,05.	29
Tabela 3	– Desempenho zootécnico dos camarões cultivados. Valores apresentados como média \pm desvio padrão. Letras em comum em cada linha indicam diferença estatística significativa no desempenho zootécnico dos camarões segundo o teste de Tukey HSD ao nível de significância de 0,05	31
Tabela 4	– Compostos nitrogenados da água de cultivo, no 3º dia após a inoculação da <i>N. oceanica</i> e antes da despesca dos camarões. Valores são apresentados como média \pm desvio padrão. Letras em comum em cada linha indicam diferença estatística não significativa na concentração de compostos nitrogenados segundo o teste de Tukey HSD ao nível de significância de 0,05	32
Tabela 5	– Densidade celular média da <i>N. oceanica</i> ao longo dos experimentos	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>BFT</i>	<i>Biofloc Technology</i>
CEAC	Centro de Estudos Ambientais Costeiros
CTL	Controle
<i>IMTA</i>	<i>Integrated Multitrophic Aquaculture</i>
<i>IMNV</i>	<i>Infectious micronecrosis virus</i>
LABOMAR	Instituto de Ciências do Mar
NPK	Nitrogênio (N), Fósforo (P) e Potássio (K)
PL	Pós-larva
<i>RAS</i>	<i>Recirculating Aquaculture System</i>
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i>
SPT	<i>Specific Pathogen Tolerant</i>
T1	Tratamento 1
T2	Tratamento 2
T3	Tratamento 3
T4	Tratamento 4
UFC	Universidade Federal do Ceará
<i>WSSV</i>	<i>White Spot Syndrome Virus</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Aquicultura	13
2.2	Carcinicultura	14
2.2.1	<i>Sistemas monofásicos e multifásicos</i>	16
2.3	Microalgas	17
2.3.1	<i>Cultivo de microalgas</i>	17
2.3.2	<i>Microalgas como biofiltros</i>	18
2.3.3	<i>Nannochloropsis oceanica</i>	19
2.4	Custos associados à produção de camarões marinhos e microalgas	21
3	OBJETIVOS	21
3.1	Objetivo geral	21
3.2	Objetivos específicos	21
3.3	Hipóteses	22
4	MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1	Microalgas	22
4.2	Meios de cultivo	23
4.3	Preparação e fertilização dos tanques	23
4.4	Inoculação das microalgas	24
4.5	Desenho experimental	24
4.6	Povoamento dos berçários	25
4.7	Alimentação	25
4.8	Desempenho zootécnico do camarão	26
4.9	Desenvolvimento da microalga nos tanques	26
4.10	Análise de compostos nitrogenados.....	27
4.11	Parâmetros químicos e físicos	28
4.12	Análise estatística	28
5	RESULTADOS	29

5.1	Parâmetros de qualidade de água	29
5.2	Parâmetros zootécnicos	29
5.2.1	<i>Peso corporal médio</i>	29
5.2.2	<i>Desempenho zootécnico</i>	30
5.3	Compostos nitrogenados dissolvidos	31
5.4	Crescimento da <i>N. oceanica</i>	33
6	DISCUSSÃO	34
7	CONCLUSÕES	39
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
	ANEXO A – MEIO DE CULTIVO F/2 (GUILLARD, 1975) MODIFICADO	48
	ANEXO B – MEIO DE CULTIVO FERTILIZANTE3	49

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura é a atividade de produção de organismos aquáticos, sendo considerada essencial na oferta de alimentos para a crescente população humana, tendo em vista que os estoques pesqueiros se encontram em estado de sobre exploração (SUMAILA *et al.*, 2016). Os organismos aquáticos marinhos representam, também, fontes de compostos essenciais, como ácidos graxos altamente insaturados da série ω -3 e ω -6, os quais podem proporcionar efeitos benéficos sobre a saúde humana (TAPIERO *et al.*, 2002).

Um ramo da aquicultura que vem alcançando excelentes resultados de produção é a carcinicultura, que consiste no cultivo de camarões marinhos. Esse mercado movimentava 40,6 bilhões de dólares por ano, com uma produção de mais 6,5 milhões de ton. O Brasil é o 12º maior produtor de camarões do mundo, tendo produzido em 2019, 54.335,72 ton., movimentando 300 milhões de dólares (FAO, 2019).

A carcinicultura teve início no Brasil na década de 70 e ao longo dos anos a atividade apresentou um crescimento constante, alcançando em 2003 uma produção de 90.000 ton. (NATORI *et al.*, 2011). Entretanto, em 2004, foi identificada a presença do vírus responsável pela doença conhecida como Vírus da Mionecrose Infecciosa (*IMNV*, *Infectious Myonecrosis Virus*) pela primeira vez em viveiros de camarões no Brasil (NEGREIROS; SANTOS, 2015). Isto ocasionou uma alta mortalidade de camarões em empreendimentos de cultivo, impactando seriamente a produção e até culminando com o fechamento de fazendas (FILHO; RONÇANI, 2018).

Atualmente o setor ainda passa por um processo de recuperação, e busca alternativas produtivas para o enfrentamento da constante presença de patógenos causadores de doenças virais e bacterianas em camarões (XU *et al.*, 2007; HOWLADER *et al.*, 2020). Diversas alternativas têm sido testadas com maior ou menor êxito tanto do ponto de vista econômico como ambiental, dentre elas a utilização de pós-larvas (PLs) tolerantes à patógenos (*SPT*, *Specific Pathogen Tolerant*) ou completamente livres deles (*SPF*, *Specific Pathogen Free*) (ALDAY-SANZ, 2018), a utilização de sistemas de recirculação de água, com o uso de filtros biológicos, químicos e mecânicos (*RAS*, *Recirculating Aquaculture Systems*), sistema de bioflocos (*BFT*, *Biofloc Technology*) (RAY *et al.*, 2017) e o cultivo integrado multitrófico (*IMTA*, *Integrated Multitrophic Aquaculture*) (SAMOCHA *et al.*, 2015) ou a divisão do ciclo de produção dos camarões em duas a três fases, permitindo um maior controle de parâmetros de crescimento e sanidade (AZEVEDO, 2005).

As microalgas são organismos planctônicos que podem ser auto, mixo ou heterotróficos.

Esses microrganismos são muito importantes para o desenvolvimento da vida na terra, produzindo grandes quantidades de oxigênio através da fotossíntese, assimilando CO₂ e formando a base da cadeia alimentar (LOURENÇO, 2006). As microalgas também podem ser produzidas em ambientes controlados, para a utilização de compostos, como proteínas, lipídios, vitaminas e minerais na nutrição animal. Além disso, esses organismos fitoplanctônicos podem ser utilizados no tratamento de efluentes, pois necessitam de macro e micronutrientes para seu desenvolvimento. Como muitos desses nutrientes causam eutrofização e contaminação de ambientes, as microalgas podem ser usadas para a remoção de compostos em águas de rejeito (CHEW *et al.*, 2018; LEITE *et al.*, 2019; RUIZ *et al.*, 2016).

Essas características de remediação de efluentes, capacidade de produção e acúmulo de diversos compostos também fazem com que as microalgas sejam aplicadas na aquicultura, como fonte de alimentos vivos para larvas de peixes, camarões e moluscos ou no controle de acúmulo de nutrientes provenientes do metabolismo de organismos cultivados, restos de alimentos, urina e fezes (HAN *et al.*, 2019). Essa técnica é conhecida como água verde e pode ser usada na fase de larvicultura ou em etapas mais avançadas de desenvolvimento dos organismos aquáticos (SHAH *et al.*, 2017).

O custo de produção das microalgas pode ser bastante elevado, devido à necessidade da desinfecção e/ou esterilização da água de cultivo e, em grande parte, devido ao aporte de macro e micronutrientes necessários para o seu desenvolvimento (ACIÉN *et al.*, 2012). Entretanto, algumas opções têm sido estudadas para diminuir os custos operacionais dessas etapas, como co-culturas, reciclagem do meio de cultivo e o uso de meios de cultivo alternativos de baixo custo (NGUYEN *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2018; SCHNEIDER *et al.*, 2018).

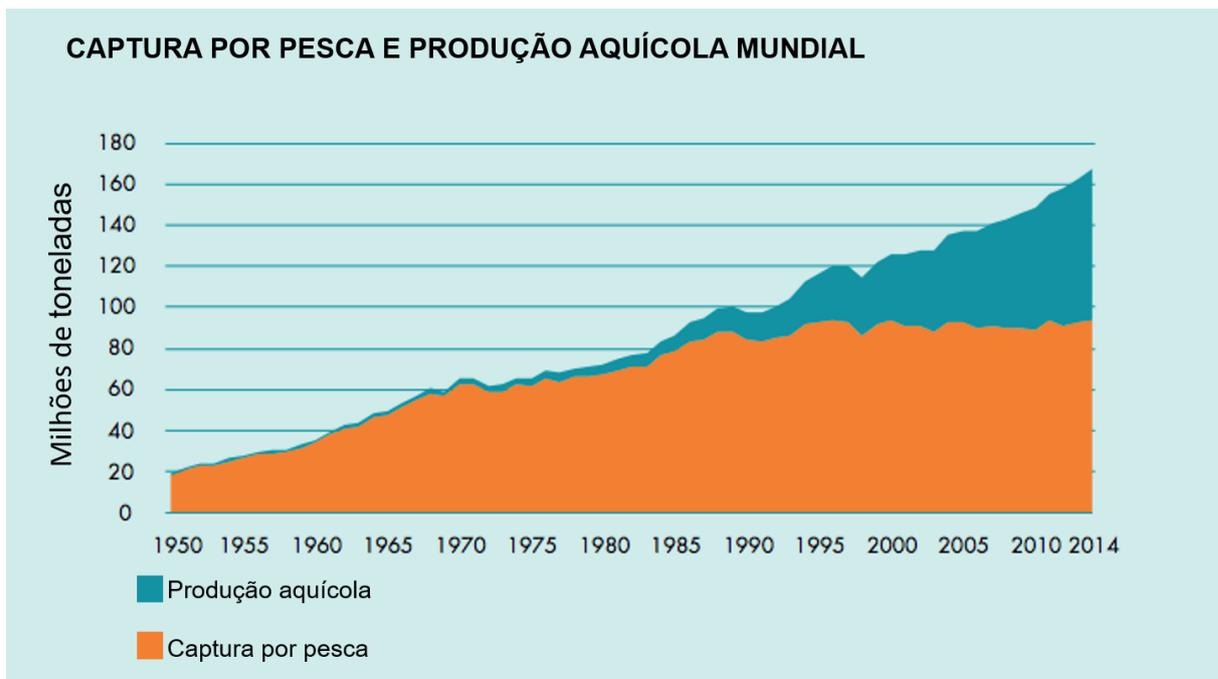
O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento da microalga *Nannochloropsis oceânica* cultivada em meio alternativo de baixo custo econômico para o desempenho zootécnico de camarões marinhos *L. vannamei* em tanques-berçários.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aquicultura

A aquicultura é uma atividade essencial, pois, juntamente com a pesca de captura, garante o fornecimento de alimentos de origem aquática para consumo animal e humano. A biomassa de pescado capturado tem se mantido constante desde 1989 (Figura 1). A demanda por produtos aquáticos tem crescido continuamente ao longo dos anos, acompanhando o aumento da população humana mundial (FAO, 2020). Essa estagnação da pesca é explicada pela situação atual dos estoques pesqueiros, visto que na sua maioria estão sobre explorados ou colapsados, não suportando um aumento das capturas através da pesca (HILBORN, 2011).

Figura 1: Produção pesqueira e aquícola mundial (milhões de ton.) de 1950 a 2014.



Fonte: FAO, 2018.

A aquicultura pode ser realizada em águas marinhas, dulcícolas ou estuarinas, permitindo o cultivo de crustáceos, peixes, moluscos, algas e equinodermos. Devido ao grande número de animais e plantas que podem ser cultivados, a aquicultura pode ser desenvolvida em diversas regiões do mundo onde se tenha acesso a água de diferentes características (GENTRY *et al.*, 2017).

A segurança alimentar relacionada ao consumo de pescado também está associada à necessidade de inclusão na alimentação humana de certos componentes sintetizados pelos

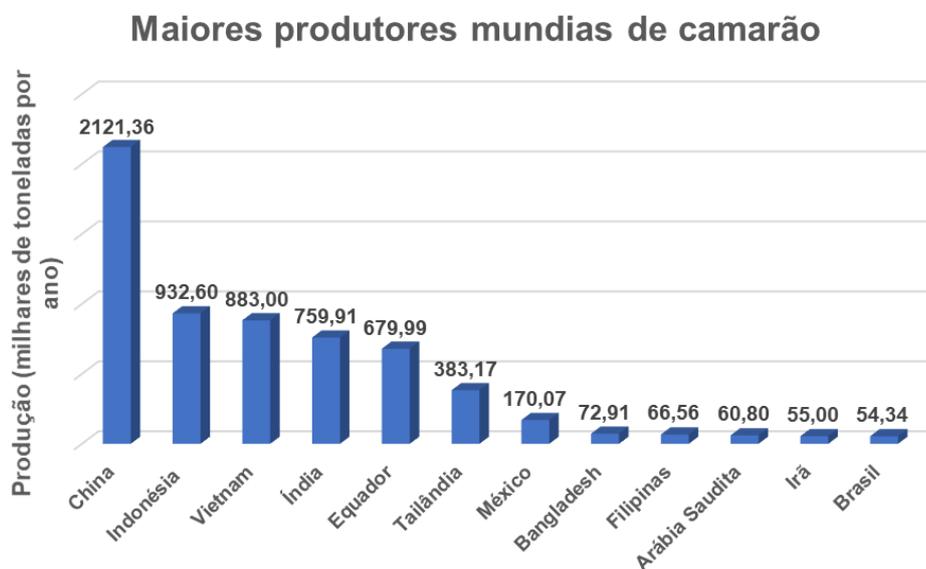
organismos marinhos, como é o caso dos ácidos graxos altamente insaturados de cadeia longa da série ω -3 e ω -6. Esses componentes não são sintetizados pelo metabolismo humano na quantidade requerida pelo organismo, sendo necessário a suplementação alimentar com alimentos ricos desses compostos carbonados (SIMOPOULOS, 2000). Os ácidos graxos altamente insaturados de cadeia longa desempenham papéis importantes na prevenção de doenças cardiovasculares e na redução de colesterol (ABDELHAMID *et al.*, 2018), doenças inflamatórias (MOLFINO *et al.*, 2017) e prevenção ao câncer (ZANOAGA *et al.*, 2017).

O cultivo de organismos marinhos surge então como uma solução para garantir a segurança alimentar da crescente população mundial humana no que diz respeito a sua suplementação alimentar. Isso também permite a redução do esforço de pesca sobre estoques à beira do colapso, levando assim a uma recuperação das populações naturais enquanto ainda for possível (FAO, 2020).

2.2 Carcinicultura

A carcinicultura é uma atividade bastante antiga, com espécies como o *Marsupenaeus japonicus* tendo seu ciclo de vida completo em cativeiro no ano de 1934 no Japão (ALDAY-SANZ, 2010). Atualmente, a carcinicultura é uma atividade industrial que movimenta mais de 38 bilhões de dólares/ano com uma produção anual de 6,5 milhões de ton. Os maiores produtores mundiais são a China, Indonésia, Vietnã, Índia e Equador. O Brasil ocupa a 12^a posição, tendo produzido 63.169,90 ton. de camarões em 2020 (FAO, 2021)

Figura 2: Produção anual (em milhões de ton.) dos doze maiores produtores mundiais de camarão marinho.



Fonte: FAO, 2021.

O cultivo de camarões marinhos no Brasil se iniciou nos anos 70, com o cultivo do *M. japonicus* (MOLES; BUNGIE, 2002). O camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Figura 3) foi introduzido na carcinicultura brasileira em 1988, através de indivíduos vindos dos Estados Unidos e do sul da Ásia. (ABCC, 2011). A produção foi crescente ao longo dos anos, atingindo um valor máximo de 90.000 ton. em 2003 (Figura 4; FAO, 2021). No ano de 2004, foi identificado a presença do *infectious mycronicrosis virus (IMNV)* em camarões produzidos no estado do Piauí. A enfermidade rapidamente se espalhou para o restante do País, levando à uma grande redução nos volumes produzidos (NEGREIROS; SANTOS, 2015). A utilização de Pós-larvas (PLs) *Specific Pathogen Free (SPF)* e *Specific Pathogen Tolerant (SPT)*, a implementação de melhores práticas de cultivo, bem como o uso de sistemas de berçários auxiliaram na recuperação da produção (ABCC, 2016).

Figura 3: Camarão marinho *Litopenaeus vannamei*.

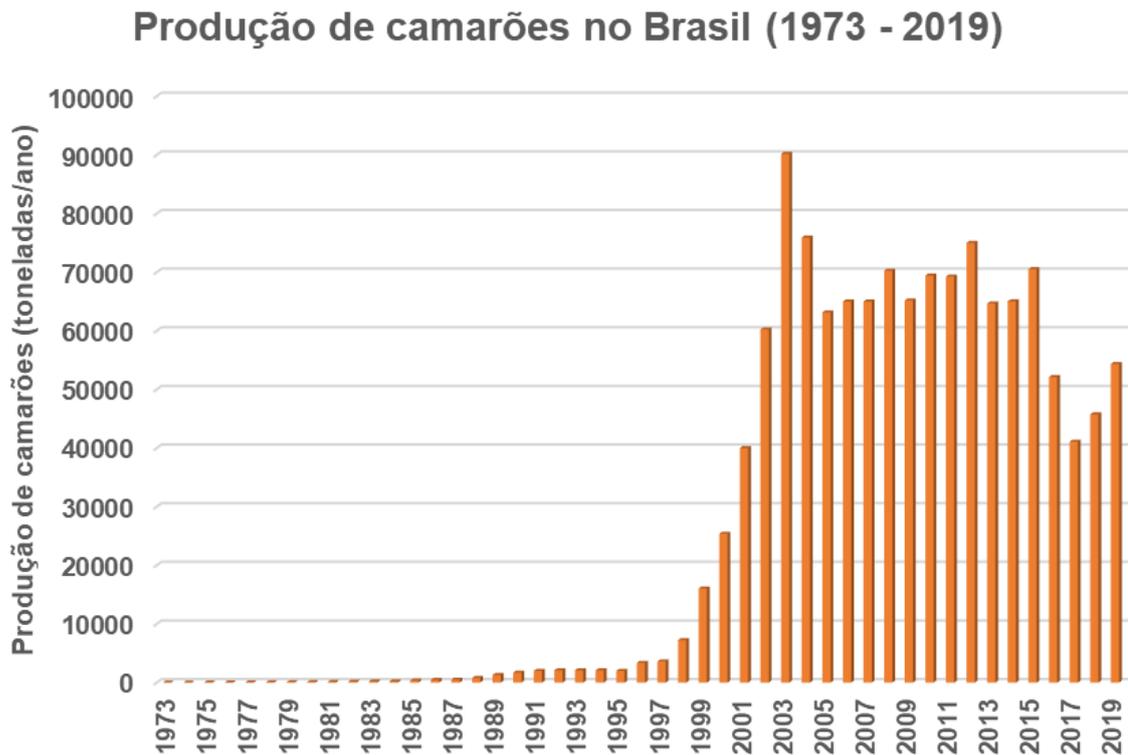


Fonte: ABCC, 2022.

O camarão *L. vannamei* é a única espécie de camarão marinho cultivada comercialmente no Brasil. Esta espécie é conhecida popularmente como camarão branco do Pacífico. Sua

grande produção a nível global se deve ao fato de ser bastante resistente ao manejo, apresentar um rápido crescimento, boa composição nutricional, além de tolerar uma ampla faixa de salinidade (BRIGGS *et al.*, 2004).

Figura 4: Produção de camarões no Brasil (1973 – 2019).



Fonte: FAO, 2011.

2.2.1 Sistemas monofásicos e multifásicos

A carcinicultura pode ser conduzida adotando diferentes etapas de cultivo, visando a maximização da sobrevivência e o crescimento dos camarões. De acordo com Azevedo (2005), os sistemas podem ser monofásicos, bifásicos ou trifásicos.

- 1) Os cultivos monofásicos são aqueles onde as PLs são estocadas diretamente nos viveiros de engorda, onde serão cultivadas até o momento da despesca (ABCC, 2017).
- 2) Os cultivos bifásicos são aqueles onde, previamente ao povoamento dos viveiros de engorda, as PLs são estocadas sob 10 a 30 PLs/L em um sistema de pré-berçários intensivos. Essas crescem em um ambiente de maior controle de parâmetros de qualidade de água e, ao alcançarem maior peso corporal, são transferidas para viveiros de engorda (ROCHA, 2013).

- 3) Os cultivos trifásicos são aqueles onde ocorre uma etapa de berçário secundário posterior à etapa de pré-berçário intensivo. Esta etapa adicional de cultivo permite obter PLs maiores e mais resistentes para transferência para viveiros de engorda. A densidade de estocagem nesses berçários secundários pode ser de 1.000 a 3.000 PLs/m³, reduzindo o tempo de engorda de 30 a 40 dias (ROCHA, 2013).

A utilização de sistemas multifásicos tem como objetivo reduzir as perdas de PLs que ocorrem nos sistemas monofásicos. PLs cultivadas em berçários apresentam maior resistência à ação de enfermidades, por serem menos afetadas por mudanças em parâmetros de água, como salinidade e temperatura, o que tende a reduzir a imunidade, permitindo a ação de patógenos. Além disso, no caso da utilização de viveiros em ambiente aberto para a engorda, o povoamento realizado com camarões maiores reduz as perdas por predação (SAMOCHA, 2010).

2.3 Microalgas

As microalgas são organismos fitoplanctônicos que podem ser autotróficos, mixotróficos ou heterotróficos. Esses organismos habitam ambientes dulcícolas, estuarinos e marinhos. Atualmente são conhecidas de 200.000 a 800.000 espécies de microalgas (LOURENÇO, 2006). As microalgas são importantes na produção de oxigênio global através da fotossíntese e na produção primária global, tendo um papel fundamental na base da cadeia alimentar (LEE, 2008).

Em sistemas aquícolas, as microalgas podem ser utilizadas como biofiltros, na remoção de compostos tóxicos ao cultivo (KIM *et al.*, 2019), na alimentação de organismos filtradores (CHENG *et al.*, 2020), no enriquecimento de organismos zooplanctônicos (CHEBAN *et al.*, 2020) e no processo chamado de “água verde”, onde desempenham, além das funções supracitadas, o papel de criar contraste visual na água, facilitando a captura de presas pelas larvas (NEORI, 2011).

2.3.1 Cultivo de microalgas

As microalgas produzem diversos compostos que podem ser utilizados nas mais diversas aplicações. Muitos organismos fitoplanctônicos apresentam um alto teor de proteínas na sua composição bioquímica (BECKER, 2007). Além disso muitos desses organismos apresentam grandes quantidades de aminoácidos essenciais tanto na alimentação humana quanto animal (TIBBETTS *et al.*, 2015). Diversas espécies de microalgas também possuem elevados teores de lipídios em sua composição. Muitas espécies marinhas apresentam uma alta concentração de ácidos graxos altamente insaturados de cadeia longa em sua biomassa,

especialmente os da série ω -3 e ω -6, que são extremamente necessários no cultivo de organismos aquáticos marinhos, bem como têm efeitos benéficos comprovados na saúde humana (CHAI SUTYAKORN *et al.*, 2018). Além disso, muitas espécies de microalgas podem produzir compostos bioquímicos com ampla utilização em diversas indústrias, como pigmentos, antioxidantes, carboidratos e vitaminas (VENKATESAN *et al.*, 2015).

As microalgas precisam de nutrientes para seu crescimento. No cultivo desses organismos são aportados macronutrientes, que são necessários em maiores quantidades, e micronutrientes, que possuem um baixo requerimento para o bom metabolismo dos organismos fitoplanctônicos. Os principais nutrientes adicionados ao meio aquoso para uma boa produção de microalgas, no caso do cultivo de diatomáceas, são o nitrogênio, fósforo, ferro e sílica (LOURENÇO, 2006).

2.3.2 Microalgas como biofiltros

Em sistemas aquícolas, o metabolismo dos organismos cultivados e a lixiviação de restos de ração utilizada para alimentação levam a um aumento na concentração de nutrientes no meio aquoso, principalmente as formas nitrogenadas orgânicas e inorgânicas, como a ureia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$), nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) e amônia (NH_4^+), assim como de outros nutrientes, como o fosfato (PO_4^{3-}), presente em rações balanceadas (BOUWMAN, 2011). A carga de nutrientes que são aportados para o meio durante um ciclo de cultivo depende do tipo do sistema de produção, do organismo cultivado, da frequência de alimentação, do tipo de alimentação entre outros fatores.

Os compostos nitrogenados inorgânicos são bastante tóxicos para os animais marinhos quando presentes em concentrações acima da suportada pelos indivíduos cultivados (CASTANEDA *et al.*, 2019). A amônia pode estar presente na forma ionizada (NH_4^+) ou não-ionizada (NH_3), sendo a proporção desses dois tipos determinada pelo pH da água; quanto maior for o pH mais tóxica é a forma não-ionizada (BOYD, 2017). O nitrito, um produto intermediário da nitrificação, também é bastante tóxico para organismos aquáticos, mesmo em pequenas concentrações (ROCHÍN *et al.*, 2017). Já o nitrato apenas é tóxico em concentrações bastante elevadas (NETO *et al.*, 2019).

Em sistemas onde a biomassa estocada de indivíduos é alta e a frequência e volume de alimentação elevados, uma grande carga de nutrientes é aportada para o meio, que pode rapidamente causar um colapso e uma alta mortalidade nos organismos cultivados (CHAIKAEW *et al.*, 2019). Para contornar esse problema pode ser realizada uma renovação de água periodicamente, aportando ou removendo água com uma carga reduzida de nutrientes.

Entretanto, trocas de água constantes apresentam um risco à biossegurança do cultivo, pois diversos patógenos e organismos deletérios às culturas podem ser introduzidos no ambiente de cultivo. Esta prática também pode alterar ambientes adjacentes ao cultivo quando a água com elevada concentração de nutrientes é lançada diretamente ao ambiente natural (HASAN *et al.*, 2020). O tratamento desses efluentes para sua liberação no ambiente apresenta altos custos de operação e perda de áreas úteis dentro do empreendimento (ANH *et al.*, 2010).

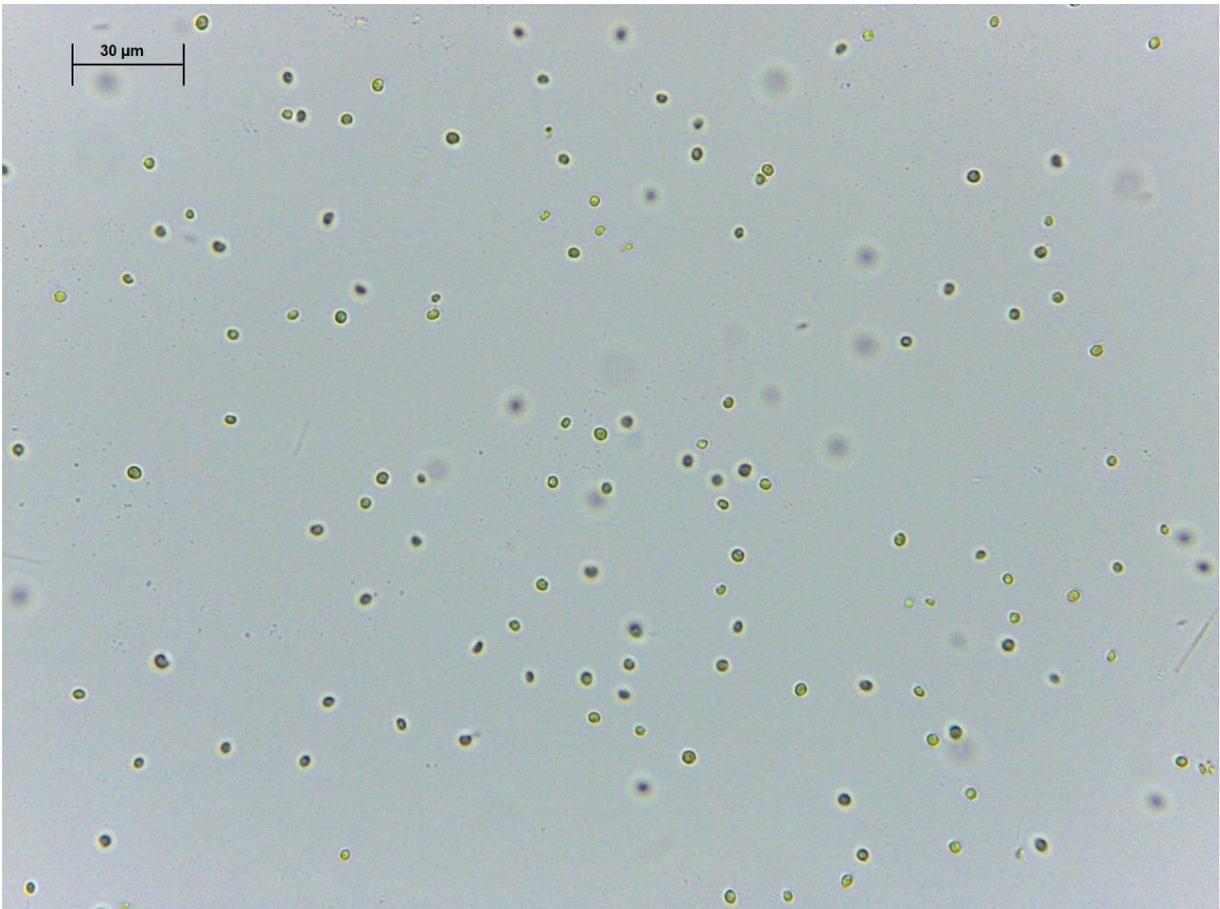
Por conta dos problemas decorrentes da alta densidade de estocagem, cultivos intensivos e semi-intensivos têm-se utilizado sistemas de recirculação (*RAS, Recirculating Aquaculture Systems*) para minimizar as necessidades de troca de água. Nesses sistemas, a água de cultivo passa por diversas etapas de filtração, como a mecânica, responsável pela retirada de sólidos suspensos, e a biológica, onde organismos que utilizam nutrientes acumulados no meio para o seu crescimento reduzem as cargas desses compostos a níveis abaixo dos deletérios para os organismos cultivados (SCHUUR, 2003).

Vários organismos podem exercer a função de filtro biológico, como bactérias nitrificantes e desnitrificantes, macroalgas e microalgas. As primeiras são responsáveis pelo ciclo do nitrogênio, onde a amônia é convertida em nitrito e posteriormente em nitrato, uma forma muito menos tóxica que as anteriores. As macroalgas e microalgas podem atuar como biofiltros ao utilizar as formas inorgânicas de nitrogênio como nutrientes e transformá-las em biomassa, apresentando assim a possibilidade da utilização e beneficiamento dessa biomassa após a filtração (KIM *et al.*, 2019; CUNHA; OTERO, 2017; KUMAR *et al.*, 2016).

2.3.3 *Nannochloropsis oceanica*

A microalga *Nannochloropsis oceanica* é uma Eustigmatophyceae, com formato esférico e tamanho entre 2 e 4 μm (HIBBERT, 1980), tendo a clorofila *a* como principal pigmento fotossintetizante (Figura 5; LUBIÁN *et al.*, 2000). As microalgas do gênero *Nannochloropsis* são conhecidas como oleaginosas, devido à grande porcentagem de lipídeos na sua composição bioquímica (LIU *et al.*, 2017). Essa característica torna as espécies desse gênero bastante utilizadas na alimentação de organismos marinhos (LI *et al.*, 2020), sendo constantemente alvo de pesquisas relacionadas à produção de biodiesel proveniente de microalgas (ASHOUR *et al.*, 2019). Dentro do gênero *Nannochloropsis*, devido às características citadas, a espécie *N. oceanica* se mostrou com maior potencial para uso na indústria do biodiesel (MA *et al.*, 2014).

Figura 5: Microalga *Nannochloropsis oceanica* vista em microscópio óptico com aumento de 400x.



Fonte: Aline Gabrielly, 2022.

A microalga *N. oceanica* apresenta bom crescimento em meios de cultivo alternativos de baixo custo, como fertilizantes agrícolas (ASHOUR; WAHAB, 2017) e efluentes (MITRA *et al.*, 2016), além de apresentar potencial para ser usada no tratamento de águas residuais de diversas atividades industriais e urbanas (MITRA; MISHRA, 2019; LI *et al.*, 2019).

A *N. oceanica* também apresenta crescimento mixotrófico em condições que favoreçam esse tipo de metabolismo (LI *et al.*, 2019; MITRA *et al.*, 2018). Glucose, acetato e melaço de cana-de-açúcar foram utilizados como suplementação de carbono orgânico ao meio de cultivo dessa microalga com sucesso (MISTRA; MISHRA, 2018; OLIVEIRA, 2019; LI *et al.*, 2020).

As microalgas do gênero *Nannochloropsis* podem assimilar diversas formas de nitrogênio, tendo preferência pela amônia em relação ao nitrato, podendo assim serem utilizadas no tratamento de compostos nitrogenados, tóxicos para organismos aquáticos, presentes na água utilizada na aquicultura (HI *et al.*, 2011). As características descritas tornaram a espécie *N. oceanica* a microalga própria podendo ser utilizada como biofiltro.

2.4 Custos associados à produção de camarões marinhos e microalgas

Os custos associados à produção de camarões marinhos são elevados, fazendo com que se maximizem os usos de área, ração e água para que a atividade seja economicamente lucrativa (PAIVA, 2018). Por conta disso, os produtores buscam manter o máximo de organismos por área que o sistema comporta. Entretanto, uma maior densidade de estocagem de indivíduos demanda um maior controle dos parâmetros de qualidade de água e manejo dos animais, para garantir a biossegurança do cultivo e um bom desempenho zootécnico. Assim, cultivos realizados em sistemas semi-intensivos e intensivos têm sido cada vez mais utilizados.

Com relação às microalgas, a adição de nutrientes ao meio de cultivo representa um grande custo na produção, variando entre 6,2% e 14,8% dos custos totais do material utilizado. Por conta disso, vários experimentos têm sido realizados com a utilização de compostos de menor custo, como fertilizantes agrícolas, para o aporte dos nutrientes necessários para o crescimento desses organismos fitoplanctônicos marinhos (ACIÉN *et al.*, 2012; MEDEIROS *et al.*, 2020). Fertilizantes como o ácido nítrico, NPK, sulfato de amônia, uréia e superfosfato de cálcio também foram testados (SCHNEIDER *et al.*, 2018; ELNABRIS, 2012; ASHOUR; WAHAB, 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o desenvolvimento da microalga *N. oceanica*, cultivada em meio alternativo de baixo custo econômico, em tanques-berçários experimentais do camarão marinho *L. vannamei*, e determinar o desempenho zootécnico dos camarões cultivados nessas condições.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar o desempenho zootécnico do camarão *L. vannamei* cultivado em associação com a microalga *N. oceanica* durante a fase de berçário.
- Estimar o papel da microalga *N. oceanica* no controle dos compostos nitrogenados no cultivo do *L. vannamei* em fase de berçário.
- Estimar o crescimento da microalga *N. oceanica* em tanques-berçário experimentais do *L. vannamei*, sob diferentes meios de cultivo.
- Determinar o melhor meio de cultivo para o crescimento da *N. oceanica* em associação ao camarão *L. vannamei*.

3.3 HIPÓTESES

- A microalga *N. oceanica* pode atuar como biofiltro no cultivo do camarão marinho *L. vannamei*, retirando compostos tóxicos que podem se acumular na água, como elementos nitrogenados e fosfatados.
- O camarão marinho *L. vannamei* pode apresentar um melhor crescimento e sobrevivência em tanques com a presença da microalga *N. oceanica*, devido ao controle de parâmetros químicos, físicos e biológicos proporcionado pelo metabolismo da Eustigmatophyceae ao longo da fase de berçário do crustáceo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microalgas

A microalga *N. oceanica* utilizada no presente estudo foi obtida da coleção de microalgas do Laboratório de Plâncton do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará (UFC). As células foram inicialmente cultivadas por três ciclos, prévios à utilização no experimento, visando a aclimação dos indivíduos às condições de cultivo utilizadas. Após a aclimação, os cultivos foram submetidos a um escalonamento de volume utilizando as mesmas condições físicas e químicas da água até o cultivo no reatores de 20 L.

O cultivo de maior volume foi realizado em garrações de 20 L por 10 dias (Figura 6). Após esse período, a densidade celular das microalgas nos reatores foi estimada e os volumes ajustados para a inoculação nos tanques berçário.

Figura 6: Fotobioreatores da microalga *N. oceanica* em crescimento no laboratório de nutrição de organismos aquáticos do Centro de Estudos Ambientais Costeiros (CEAC, LABOMAR/UFC).



Fonte: Paulo Sávio Maciel, 2021.

4.2 Meios de cultivo

Os meios de cultivo utilizados foram previamente preparados em laboratório. As soluções-estoque de nutrientes foram preparadas usando água destilada como base e autoclavados a 121°C por 15 minutos.

Foram testados quatro meios de cultivo para o crescimento da microalga *N. oceanica* nos tanques-berçário do *L. vannamei*. O meio de cultivo F/2 (Guillard, 1975) foi modificado e tem sua composição apresentada no Anexo A. O meio de cultivo Fertilizante 3 (Anexo B) foi formulado obedecendo as proporções de Redfield, com o fornecimento de 16 mols de nitrogênio para cada mol de fósforo (GEIDER; LA ROCHE, 2002; TESSARI *et al.*, 2022) para suprir os macronutrientes necessários para o crescimento do fitoplâncton marinho através do uso de fertilizantes agrícolas, componentes de mais fácil aquisição e menor valor monetário. O meio de cultivo Fertilizante 3 foi subdividido em dois, (I) um com a adição de açúcar refinado e o outro com (II) melação de cana-de-açúcar líquido (30% de carbono) como fonte de carbono orgânico, para estimular o crescimento mixo e heterotrófico das microalgas.

4.3 Preparação e fertilização dos tanques

Os tanques-berçário utilizados apresentavam um volume máximo de 60 L. Previamente à inoculação da microalga, os tanques foram preenchidos com 50 L de água salgada na salinidade 22 g/L. A água utilizada foi bombeada do estuário do rio Pacoti, sendo filtrada previamente à adição em filtro de areia de 350 µm e, posteriormente, em filtro de fibra de acrílico de 5 µm.

Cada tratamento e controle foi realizado em seis tanques-berçário, totalizando um total de 30 tanques-berçário utilizados no experimento.

Após o enchimento dos tanques, foi realizada a desinfecção da água com a adição de 8 mL/L de hipoclorito de sódio. Após 24 h da adição do hipoclorito, foi adicionado aos tanques 200 mg/L de tiosulfato de sódio em cada tanque-berçário, sendo estes aerados vigorosamente por pedra porosa para a neutralização do cloro residual presente na água. Em seguida, foi feita a adição dos nutrientes e então as microalgas foram inoculadas nos tanques. Semanalmente foi feita uma aplicação da fonte de carbono orgânico nos tratamentos onde a inclusão desse componente foi avaliada.

Os tanques foram dispostos em um galpão, com lâmpadas fluorescentes de 6500K fornecendo iluminação artificial para a realização dos experimentos. As lâmpadas estavam

dispostas ao longo do teto do galpão onde os tanques-berçário estavam abrigados. O fotoperíodo foi de 24 horas de luz. O telhado do galpão permitia a entrada de luz natural de forma difusa.

4.4 Inoculação das microalgas

Os cultivos de microalgas nos reatores de 20 L tiveram a sua densidade celular estimada através de contagem em câmara de Neubauer, com auxílio de um microscópio óptico. Todas as contagens e observação do estado das células utilizadas nos cultivos foram feitas utilizando-se um aumento de 400x no microscópio. Após a contagem das células na câmara, a densidade algal (número de células/mL) em cada reator foi estimada. Logo em seguida, foi determinada a inclusão de microalgas de cada cultivo nos tanques-berçário a fim de alcançar uma densidade celular final de 5×10^5 células/mL de *N. oceanica* em cada tanque. Esse valor de inoculação foi determinado após a estimativa do número de células disponíveis para a inoculação nos tanques-berçários.

Os tanques-berçário somente foram povoados com os camarões após um dia da inoculação das microalgas. Isto visou permitir que estas se adaptassem ao meio e pudessem atuar como biofiltro após a introdução das PLs nos tanques.

Na metade do cultivo das PLs (15 dias) foi realizada uma nova inoculação de microalgas nos tanques-berçário atendendo uma densidade algal de 6×10^5 células/mL no momento da reinoculação. Essa densidade também foi determinada após a estimativa do número de células disponíveis para a inoculação nos tanques-berçários.

4.5 Desenho experimental

Foram avaliados um tratamento controle e quatro tratamentos experimentais no presente estudo (Tabela 1). Os cultivos foram classificados em: um grupo controle (CTL) que consistiu no cultivo de PLs realizado em água clara, sem a adição de nutrientes e microalgas ao tanque-berçário; cultivo de PLs com microalga no tanque-berçário utilizando o meio de cultivo F/2 modificado (T1); cultivo de PLs com microalgas utilizando o meio de cultivo Fertilizante 3 (T2); cultivo de PLs com microalgas utilizando o meio de cultivo Fertilizante 3 e açúcar refinado como fonte de carbono (T3), e; cultivo de PLs com microalgas utilizando o meio de cultivo Fertilizante 3 e melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono (T4). Cada tratamento e grupo controle foi conduzido em seis tanques-berçários, totalizando 30 tanques-berçário utilizados ao longo do experimento.

Tabela 1: Tratamentos experimentais do presente estudo.

Tratamentos Experimentais	Meio de Cultivo	Fonte de Carbono Orgânico
Controle (CTL)	-	-
T1	F/2 (modificado)	-
T2	Fertilizante 3	-
T3	Fertilizante 3	Açúcar refinado
T4	Fertilizante 3	Melaço de cana-de-açúcar

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6 Povoamento dos berçários

Após a inoculação e aclimação das microalgas, os tanques-berçário foram povoados com camarões com peso corporal inicial de $0,638 \text{ g} \pm 0,12 \text{ g}$ (PL 14) sob a densidade de 1 pL/L, sendo oriundos de um larvicultura comercial (Aquacrusta Marinha, Acaraú, Ceará) na fase de PL14 e cultivados até 0,6 g de peso corporal inicial. Durante o povoamento, os camarões foram pesados em balança de precisão (0,02 g a 500 g; Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda., São Paulo, Brasil) em grupos de cinco animais, tendo seu peso registrado para posteriores análises.

4.7 Alimentação

A alimentação dos camarões foi feita através da ração comercial para camarões marinhos (API Camarão Antiestresse, Neovia Nutrição e Saúde Animal Ltda., São Lourenço da Mata, Pernambuco). O fornecimento da ração foi realizado três vezes ao dia, às 07:30, 11:00 e 15:00 h. A quantidade de ração ofertada em cada tanque-berçário foi calculada através de uma tabela de alimentação. Na primeira semana a quantidade de ração diária por tanque foi determinada de acordo com o peso corporal médio dos camarões povoados em cada berçário. A quantidade diária de ração foi reajustada semanalmente, de acordo com os valores de peso corporal médio dos camarões determinados nas biometrias semanais.

A ração foi fornecida em bandejas, com as sobras de ração coletadas entre uma alimentação e outra. Essas sobras foram armazenadas e congeladas para posterior análise. Ao final do experimento os restos de ração não consumidos foram colocados em estufa à 130°C por 24 horas para a secagem. Após o processo de secagem, o conteúdo residual foi pesado em balança de precisão (0,02 g a 500g, Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda., São Paulo, São Paulo) e seu peso seco registrado para posterior remoção dos dados referentes a alimentação.

4.8 Desempenho zootécnico do camarão

As biometrias foram realizadas semanalmente para determinar o desempenho zootécnico dos camarões cultivados nos tanques-berçário sob as distintas condições. No total foram realizadas três biometrias. Na despesca, os camarões foram pesados individualmente em balança de precisão de 0,02 g a 500 g para determinar os parâmetros zootécnicos:

- Peso corporal final (g): Σ peso final dos animais vivos (g) / número total de animais.
- Ganho de biomassa (g): Σ do peso corporal final de todos os animais vivos (g) - Σ do peso corporal inicial de todos os animais povoados
- Fator de conversão alimentar (FCA): quantidade de ração ofertada (g) / (biomassa final de camarões (g) – biomassa inicial de camarões (g)).
- Sobrevivência (%): (número final de animais / número inicial de animais) x 100
- Produtividade (g/L): (biomassa final (g) – biomassa inicial (g)) / volume útil do tanque (L)
- Crescimento diário (g/dia): (peso corporal final (g) - peso corporal inicial (g)) / número de dias de cultivo

4.9 Desenvolvimento da microalga nos tanques

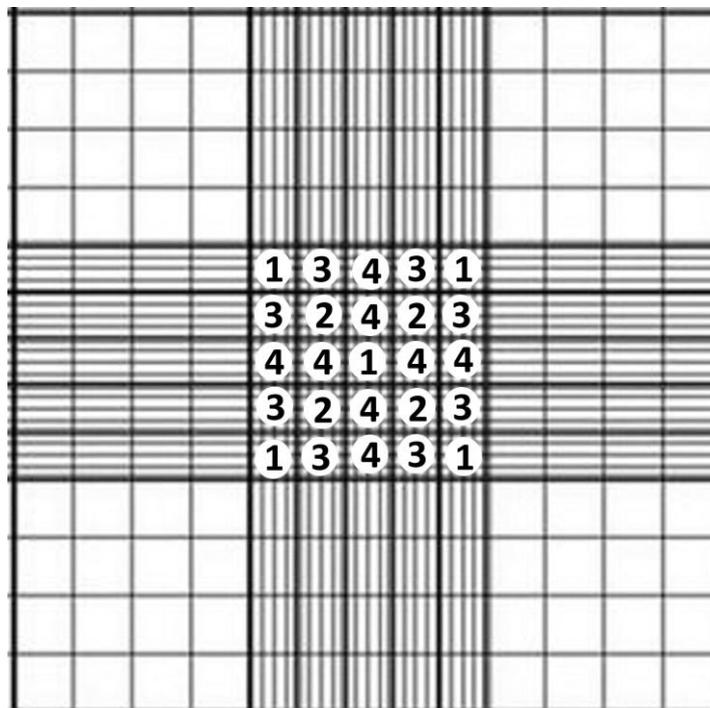
Foram realizadas amostragens nos tanques-berçário a cada dois dias de cultivo para a avaliação do desenvolvimento da *N. oceanica*. As contagens (células/mL) foram realizadas em câmara de Neubauer utilizando um microscópio óptico eletrônico.

Todas as contagens foram realizadas utilizando-se um aumento de 400x do microscópio óptico. Após a amostra ser colocada no hemocitômetro foi dado um intervalo de 10 minutos para a sedimentação das células na câmara. Com as células sedimentadas foram realizadas contagens nos quadrantes centrais da câmara de Neubauer. O padrão de contagem seguiu uma ordem (Figura 7). Inicialmente foram contabilizadas as células nos quadrantes 1 (Figura 7). Para a redução do erro relativo à contagem de células em hemocitômetros (NIELSEN *et al.*, 1991) foram contadas pelo menos 100 células de cada amostra, seguindo o padrão de contagens de quadrantes de acordo com a sequência numérica (Figura 7). Cada quadrado do quadrante interno contado teve o número de células contabilizadas no centro da área delimitada pela

câmara e sobre as marcações delimitantes superiores e direita. As células sobre as marcações esquerda e inferiores não foram contabilizadas.

Após a contagem foi determinada a média, onde dividiu-se o número de células contabilizadas pela quantidade de quadrados do quadrante determinado contados. Essa média foi multiplicada por 50.000 para se alcançar o valor de células/mL da microalga *N. oceanica* nos tanques-berçário.

Figura 7: Câmara de Neubauer. Números indicam sequência de contagem de células para a estimativa da densidade celular.



Fonte: O autor, 2021.

4.10 Análise de compostos nitrogenados

A análise dos compostos nitrogenados dissolvidos presentes na água de cultivo foi realizada no terceiro dia pós-inoculação das microalgas e no último dia de cultivo das PLs. Os seguintes parâmetros foram determinados: amônia, nitrito e nitrato. As análises foram feitas em triplicata. Foram utilizados *kits* de reagentes colorimétricos para a análise da água do sistema de cultivo, com leituras realizadas em espectrofotômetro (DR 2800 Spectrophotometer, Hach Company, Loveland, EUA).

Para a análise de amônia foram amostrados 2 mL de água de um tanque-berçário e adicionado cianureto de amônia em pó. O frasco foi então agitado e após 20 minutos os valores

foram medidos. Um tubo com água destilada foi preparado para a medição do branco. As medições foram realizadas em espectrofotômetro.

Para a análise de nitrito foram amostrados 10 mL de água de um tanque-berçário e adicionado um teste de tubo NitriVer 3 Nitrite. O frasco foi agitado e as leituras foram feitas após 10 minutos de reação. Um frasco com água destilada foi preparado para a medição do branco.

Para a análise de nitrato foi amostrado 1 mL da água de um tanque-berçário e adicionado o reagente NitraVer. Os frascos foram agitados e as medições realizadas 5 minutos após a preparação. Um frasco com água destilada foi preparado para a medição do branco.

4.11 Parâmetros químicos e físicos

Diariamente, no período da manhã, foram feitas medições de luminosidade incidente sobre os tanques, além do pH, temperatura e salinidade da água do cultivo. A luminosidade foi medida com a utilização de um luxímetro digital portátil (Instrumentos de Medição Ltda, São Paulo, São Paulo). As medições foram feitas pela manhã, com o luxímetro posicionado alguns centímetros da coluna d'água, direcionado para o centro de cada tanque.

A salinidade foi medida com um refratômetro portátil (RTS-101ATC, Instrutherm Instrumentos de Medição Ltda, São Paulo, São Paulo). Foi permitido que a salinidade atingisse o valor de 25 g/L, sendo essa concentração mantida pela adição de água doce previamente tratada com 6 mL/L de hipoclorito de sódio, neutralizado com 150 mg/L de tiosulfato de sódio após 24 h de desinfecção. O pH e a temperatura foram medidos em um pHmetro portátil (H98107 pHEP, Hanna Instruments Brasil, Barueri, São Paulo).

4.12 Análise estatística

Os dados obtidos no experimento realizado nesse trabalho tiveram sua normalidade testada. Os resultados foram analisados através de estatística Univariada (ANOVA) e quando detectada diferença estatística, as médias foram comparadas através do teste Tukey HSD com nível de significância de $P \leq 0,05$. As análises foram realizadas no software PAST (HAMMER et al., 2001).

5 RESULTADOS

5.1 Parâmetros de qualidade de água

Os parâmetros de qualidade de água foram obtidos através das medições realizadas ao longo do experimento (Tabela 2). O maior valor de luz incidente sobre os tanques-berçário foi medido no CTL, sendo este acompanhado, por ordem decrescente, dos tratamentos T1, T4, T2 e T3, respectivamente. Todos os valores apresentaram diferença estatística significativa entre si ($P < 0,05$). Isso aconteceu devido à disposição dos tanques no galpão onde foram realizados os experimentos. A luminosidade artificial fornecida aos tanques variou de acordo com a distância da fonte luminosa para a superfície da água, que, por conta do formato do teto do galpão, estava mais próxima ou mais afastada da água em diferentes pontos do ambiente. Além disso, a variação entre os dias se deu por conta da oscilação de luminosidade natural que conseguia adentrar de forma difusa no recinto onde os experimentos foram realizados.

A salinidade se manteve em torno de 25, com os valores medidos não apresentando diferenças estatísticas significativas ($P > 0,05$). Os valores de pH e temperatura também não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos experimentais.

Tabela 2: Parâmetros físicos e químicos de qualidade de água medidos ao longo do experimento. Letras em comum em cada linha indicam diferença estatística não significativa entre os tratamentos segundo o teste de Tukey HSD ao nível de significância de 0,05.

Tratamento	Parâmetro de qualidade de água			
	Luminosidade (lux)	Salinidade (g/L)	pH	Temperatura (°C)
CTL	174,81 ± 4,06 a	25,66 ± 0,48 a	6,85 ± 0,26 a	23,04 ± 0,16 a
T1	166,98 ± 3,57 b	25,23 ± 0,5 a	6,97 ± 0,23 a	23,05 ± 0,16 a
T2	141,03 ± 3,32 c	25,26 ± 0,52 a	6,93 ± 0,2 a	23,05 ± 0,16 a
T3	109,78 ± 4,24 d	25,15 ± 0,48 a	6,97 ± 0,21 a	23,1 ± 0,17 a
T4	159,6 ± 2,98 e	25,2 ± 0,46 a	6,77 ± 0,25 a	23,06 ± 0,16 a

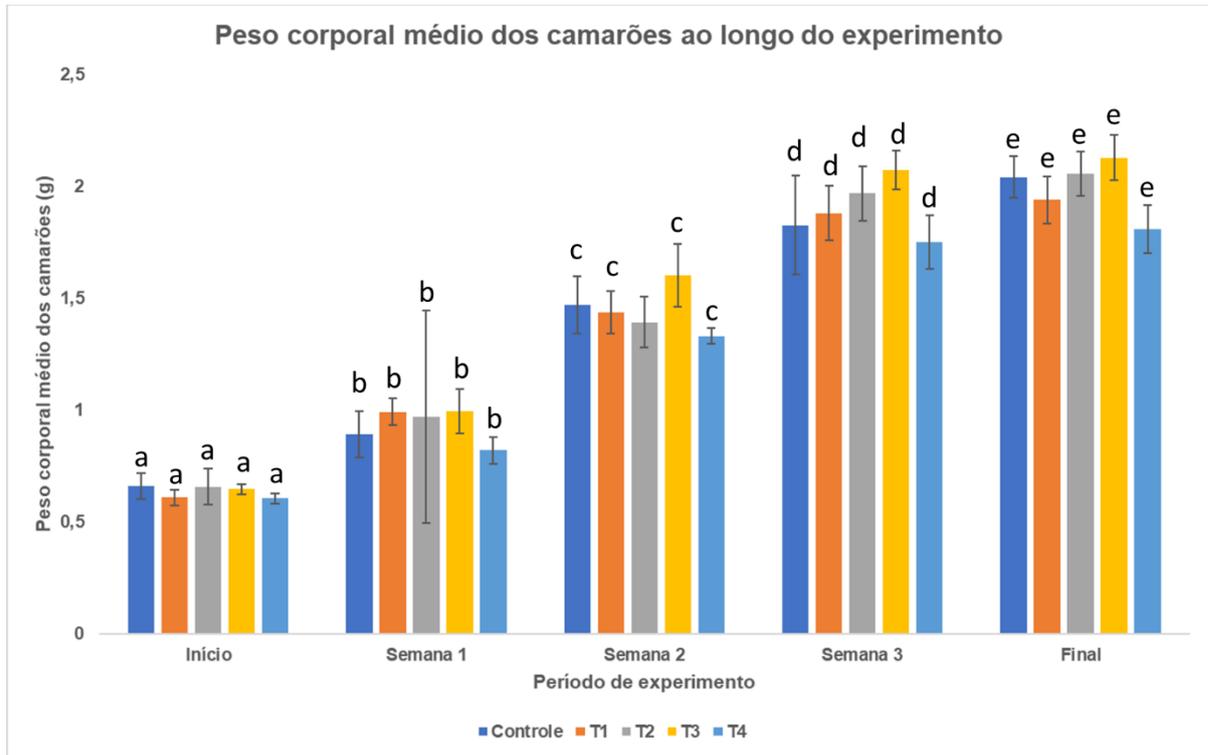
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Parâmetros zootécnicos

5.2.1 Peso corporal médio

Ao longo das biometrias e pesagem final o maior peso corporal médio dos camarões cultivados foi observado no tratamento T3 (Gráfico 1). Entretanto, não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos experimentais nas biometrias realizadas no início, ao longo e no fim do cultivo dos camarões.

Gráfico 1: Peso individual médio dos camarões (g) ao longo do experimento. Valores apresentados como média \pm erro padrão. Letras em comum em cada coluna indicam diferença estatística não significativa no peso corporal semanal segundo o teste de Tukey HSD ao nível de significância de 0,05.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.2 Desempenho zootécnico

O peso corporal final dos camarões variou entre $1,80 \pm 0,10$ (T4) e $2,12 \pm 0,10$ g (T3, Tabela 3). Contudo, não foi possível verificar uma influência significativa do meio de cultivo sobre esse parâmetro zootécnico ($P > 0,05$).

A produtividade teve seu maior valor calculado nos tratamentos T2 e T3. Entretanto, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre esses tratamentos e T1 e CTL. O tratamento T4 obteve a menor produtividade ($0,53 \pm 0,05$ g/L) entre todos os tratamentos experimentais testados.

A sobrevivência final variou entre $70,33 \pm 6,77\%$ (T4) e $86,33 \pm 2,67\%$ (T1). Porém, não foi detectada diferença significativa entre os tratamentos avaliados ($P > 0,05$). Da mesma forma, não houve diferença estatística significativa no crescimento diário dos camarões em função do tratamento ($P > 0,05$). O fator de conversão alimentar (FCA) variou entre $2,27 \pm 0,31$

(T1) e $3,24 \pm 0,4$ (T4). Apesar dos diferentes valores registrados não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos avaliados ($P > 0,05$).

Tabela 3: Desempenho zootécnico dos camarões cultivados. Valores apresentados como média \pm desvio padrão. Letras em comum indicam diferença estatística não significativa no desempenho zootécnico dos camarões segundo o teste de Tukey HSD ($P > 0,05$).

Desempenho	Peso corporal final (g)	Produtividade (g/L)	Sobrevivência final (%)	FCA	Crescimento (g/dia)
CTL	$2,04 \pm 0,09$ a	$0,69 \pm 0,06$ ab	$74,33 \pm 4,94$ a	$3,09 \pm 0,8$ a	$0,0460 \pm 0,002$ a
T1	$1,94 \pm 0,10$ a	$0,88 \pm 0,07$ a	$86,33 \pm 2,67$ a	$2,27 \pm 0,31$ a	$0,0443 \pm 0,003$ a
T2	$2,05 \pm 0,10$ a	$0,92 \pm 0,08$ a	$86,33 \pm 4,25$ a	$2,41 \pm 0,54$ a	$0,0466 \pm 0,003$ a
T3	$2,12 \pm 0,10$ a	$0,92 \pm 0,13$ a	$82,66 \pm 5,73$ a	$2,58 \pm 1,28$ a	$0,0493 \pm 0,003$ a
T4	$1,80 \pm 0,10$ a	$0,53 \pm 0,05$ b	$70,33 \pm 6,71$ a	$3,24 \pm 0,4$ a	$0,0401 \pm 0,003$ a

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Compostos nitrogenados dissolvidos

A concentração de amônia total medida no 3º dia pós-inoculação da *N. oceanica* foi significativamente maior no tratamento T3 comparado aos demais ($P < 0,05$, Tabela 4). Os outros tratamentos não apresentaram diferença significativa entre si ($P > 0,05$). Ao final do cultivo dos camarões, os tratamentos CTL e T4 apresentaram concentrações de amônia total acima do limite máximo detectável pelo método espectrofotométrico utilizado, que media concentrações de 0,02 a 2,5 mg/L. A menor concentração desse composto foi detectada no tratamento T3, porém este não se diferenciou do tratamento T2.

Os valores de nitrito não apresentaram diferença estatística significativa no 3º dia pós-inoculação das algas, com os valores próximos à 1 mg/L. Ao final do experimento, a menor concentração de nitrito, em termos absolutos, foi medida no T2. Esse tratamento não apresentou diferença estatística em relação aos tratamentos CTL, T3 e T4 ($P > 0,05$). O maior valor absoluto de nitrito foi medido no T1. O maior valor absoluto de nitrato inicial foi encontrado em T2, mas os tratamentos não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$). O mesmo ocorreu para o final do experimento, com o maior valor de nitrato também medido em T2, mas não houve diferença estatística significativa entre eles.

Tabela 4: Compostos nitrogenados da água de cultivo, no 3º dia após a inoculação da *N. oceanica* e antes da despesca dos camarões. Valores são apresentados como média \pm desvio padrão. Letras em comum em cada linha indicam diferença estatística não significativa na concentração de composto nitrogenado segundo o teste de Tukey HSD ao nível de significância de 0,05.

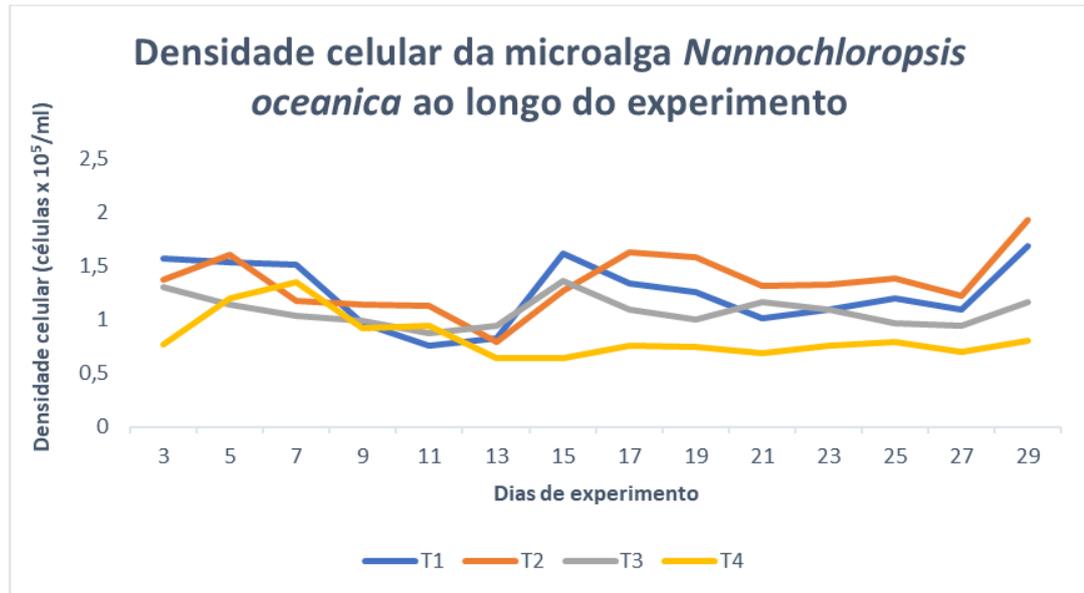
Tratamento	Amônia Total (mg/L)		Nitrito (mg/L)		Nitrato (mg/L)	
	Início	Final	Início	Final	Início	Final
CTL	0,846 \pm 0,043 a	ALM ¹	1,33 \pm 0,235 a	19,5 \pm 0,25 ab	1,03 \pm 0,483 a	3,05 \pm 1,025 a
T1	0,876 \pm 0,051 a	4,245 \pm 0,277 a	1 \pm 0,707 a	25 \pm 2,5 b	1,533 \pm 0,469 a	1,8 \pm 0,7 a
T2	0,813 \pm 0,037 a	0,825 \pm 0,387 b	1 \pm 0,408 a	10 \pm 0,5 a	4 \pm 1,245 a	4,2 \pm 0,6 a
T3	1,323 \pm 0,049 b	2,52 \pm 0,07 ab	1,33 \pm 0,235 a	15 \pm 0,5 ab	0,866 \pm 0,102 a	2,7 \pm 0,6 a
T4	0,943 \pm 0,017 a	ALM	1 \pm 0,408 a	18 \pm 1 ab	1,866 \pm 0,694 a	1,1 a

¹Acima do limite de medição.

5.4 Crescimento da *N. oceanica*

As maiores concentrações da *N. oceanica* nos tanques-berçário foram observadas por ordem decrescente nos tratamentos T2, T1, T3 e T4 (Gráfico 2).

Gráfico 2: Densidade celular da *N. oceanica* ao longo do experimento.



Fonte: elaborado pelo autor

A densidade celular média da *N. oceanica* ao longo do experimento nos tratamentos onde ela foi inoculada está apresentada na Tabela 5. O maior valor foi obtido no tratamento T2, mas a densidade celular média calculada nesse tratamento não apresentou diferença estatística significativa quando comparada à obtida no T1 ($P > 0,05$). A menor densidade celular foi observada no T4.

Tabela 5: Densidade celular média da *N. oceanica* ao longo do experimento.

Tratamento	Densidade Celular (x 10 ⁵ células/mL)
T1	1,248 ± 0,146 ^{ab}
T2	1,348 ± 0,132 ^a
T3	1,078 ± 0,067 ^b
T4	0,833 ± 0,099 ^c

Fonte: Elaborado pelo autor.

6. DISCUSSÃO

Nos experimentos conduzidos nesse trabalho a microalga *N. oceanica* não apresentou um crescimento adequado nos tanques-berçário de camarões, com a utilização de meio de cultivo f/2 e alternativo composto por fertilizantes agrícolas. Diferente dos resultados encontrados, a *N. oceanica* pode ser cultivada em diversos meios de cultivos. Ashour e Wahab (2017) mostraram que essa microalga apresenta bom crescimento com a utilização de meio de cultivo alternativo composto por fertilizantes agrícolas, como o ácido nítrico ou o sulfato de amônia. Os mesmos autores também compararam o custo de produção do meio f/2 com os meios alternativos, demonstrando as vantagens dessa substituição. Bae e Hur (2011) também obtiveram resultados positivos no cultivo da *N. oceanica* utilizando fertilizantes agrícolas como base do meio de cultura. Os autores reportaram um maior crescimento da microalga com a utilização de nitrato como fonte de nitrogênio, em comparação com a amônia, e obtiveram a composição de um meio de cultivo de baixo custo que apresentou resultados similares aos obtidos por culturas em meio f/2.

O meio Fertilizante 3 foi utilizado com sucesso no crescimento da *N. oceanica* nos reatores onde foram produzidas as culturas utilizadas como inóculos para o experimento em tanques-berçários, indicando que, possivelmente, a forma e os níveis de aporte dos macronutrientes necessários para o crescimento da espécie de microalga testada estão dentro dos requerimentos mínimos para o bom desenvolvimento de um cultivo. Entretanto, sob condições adversas, como a presente no crescimento em associação ao *L. vannamei* em tanque-berçário como avaliado no presente estudo, as células não apresentaram bom crescimento. Devido ao fato de não haver diferenças estatisticamente significativas entre o tratamento que utilizou o meio de cultivo f/2 e o que testou o meio Fertilizante 3 e devido aos resultados obtidos por outros autores com a utilização de fertilizantes agrícolas como meio de cultivo, é provável que a razão do baixo desenvolvimento da *N. oceanica* não esteja relacionado ao meio de cultivo utilizado.

A *N. oceanica* foi inoculada nos tanques-berçários fertilizados com o meio de cultivo a ser utilizado e os camarões apenas foram inoculados um dia após essa inoculação para que as células se aclimassem e, então, iniciassem o crescimento. Ammar *et al.* (2018) mostraram que a microalga *Nannochloropsis oculata* cultivada em meio BG-11 modificado apresentou apenas um dia de fase de aclimação, já iniciando o crescimento no segundo dia. Entretanto, os mesmos autores encontraram fases de aclimação de 2 a 7 dias ao adicionar efluente proveniente de campo petrolífero ao meio de cultivo. Ren e Ogden (2014) cultivaram a

microalga *Nannochloropsis gaditana* em meio de cultivo onde o nitrato, com diferentes níveis de inclusão, foi usado como fonte de nitrogênio. A microalga apresentou apenas um dia de fase de aclimação. Os autores também testaram a inclusão ou substituição do nitrato pela ureia, como fonte de nitrogênio, onde a *N. gaditana* apresentou uma fase de aclimação de três dias.

É possível que, dada as outras condições de cultivo que foram testadas nesse experimento terem divergido daquelas em que os inóculos foram cultivados, como a menor iluminação e a adição de camarões e, em alguns tratamentos, a adição de fontes de carbono orgânico, a microalga *N. oceanica* precisasse de um maior período de aclimação, com o povoamento dos tanques com o *L. vannamei* após um maior período de dias ou ao se observar o início do aumento da densidade celular no meio.

Oliveira (2019) testou o crescimento da *N. oceanica* em meio composto por fertilizantes agrícolas comparado ao meio f/2. O meio alternativo apresentou um baixo rendimento em comparação ao meio mais complexo. Entretanto, após a adição de 0,25 g/L de melão de cana-de-açúcar à cultura, o desempenho do meio de cultivo aumentou. *N. oceanica* pode crescer utilizando a mixotrofia e heterotrofia como rota metabólica alternativa à autotrofia. Li *et al.* (2020) demonstraram que a microalga pode crescer utilizando acetato de sódio orgânico e bicarbonato de sódio inorgânico como fontes de carbono, apresentando, inclusive, um aumento no crescimento com uma menor luminosidade incidente sobre os fotobiorreatores, devido ao estímulo das rotas metabólicas alternativas.

O baixo desenvolvimento da *N. oceanica* no presente estudo nos tratamentos com adição de melão de cana-de-açúcar e açúcar refinado como fontes de carbono orgânico pode ser explicado pelo possível maior favorecimento do crescimento de bactérias nos tanques-berçário, devido ao aumento na relação C/N. Esta condição pode ter levado à uma competição pelos nutrientes disponíveis no meio entre bactérias e microalgas. A determinação da densidade bacteriana, bem como a determinação dos grupos de bactérias presentes no meio de cultivo do tanque-berçário poderia ajudar a avaliar a interferência desses organismos no crescimento dos camarões e das microalgas. Além disso, a medição dos sólidos suspensos totais (SST) poderia ajudar a estimar o adensamento do número de flocos formados por bactérias em associação à outros detritos, como microalgas mortas, restos de ração e detritos dos camarões.

Experimentos inferindo sobre o crescimento mixo e heterotrófico de microalgas geralmente são conduzidos em condições axênicas ou de baixíssima contaminação por outros organismos. Portanto, o estímulo do crescimento bacteriano muitas vezes não é levado em consideração. Além disso, a presença de melão de cana-de-açúcar leva à maior formação de bioflocos, agregados de microalgas, bactérias e material orgânico, o que pode ser um fator

inibidor para o crescimento da microalga avaliada. A medição de SST ajudaria a discorrer sobre esse parâmetro de qualidade de água. A inclusão de uma fonte de carbono inorgânico ao meio de cultivo para a facilitação da assimilação da fonte orgânica poderia ter resultado em uma melhora no desempenho dos tratamentos T3 e T4.

Em tanques e viveiros de cultivo de camarões, a presença de bactérias e outros organismos, como fito e zooplâncton, é uma constante. Logo, esse trabalho visou simular um ambiente mais comumente encontrado em fazendas de carcinicultura.

O desempenho da *N. oceanica* também não foi adequado nos tratamentos onde ocorreu a inoculação do meio de cultivo sem a adição de fontes de carbono orgânico. Vários fatores podem ter impedido o bom desenvolvimento das células no ambiente. Zhang *et al.* (2016) avaliaram o crescimento da *N. oceanica* em meio de cultivo reciclado e encontraram menores valores de crescimento celular nos meios reutilizados. A presença de ácidos húmicos polissacarídeos e ácidos fúlvicos podem ter causado a inibição do crescimento da microalga. A água utilizada nesse experimento foi proveniente do estuário do Rio Pacoti (Eusébio, Ceará), onde componentes inibidores, como os supracitados, poderiam estar presentes.

Fullbright *et al.* (2016) demonstraram que a bactéria *Bacillus pumilus*, isolada de um sistema de crescimento de *Nannochloropsis salina* com baixa performance, limitou o crescimento da microalga *Nannochloropsis* sp., provavelmente pela liberação de moléculas na água. A presença de bactérias inibidoras de crescimento da *N. oceanica* poderia ser um fator limitante no maior desenvolvimento das células inoculadas nos berçários. Além disso, organismos zooplanctônicos, como ciliados e rotíferos, foram observados nos tanques-berçário. Isto pode ter sido um fator limitante de crescimento da microalga devido à predação.

Uma avaliação dos grupos de organismos presentes nos tanque-berçário ao longo do experimento poderia ajudar a inferir sobre uma teia de interações tróficas entre os organismos que naquele ambiente coexistiram durante os 28 dias de tratamento.

A iluminação incidente sobre os tanques-berçário variou entre os tanques devido à disposição dos tanques no galpão. Os valores médios de iluminação registrados ficaram muito abaixo dos valores indicados como ideais para o crescimento autotrófico das microalgas da espécie *Nannochloropsis*. Maynardo *et al.* (2015) encontraram o menor período de tempo até o início da fase de crescimento exponencial da microalga *N. oculata* na intensidade luminosa de 5.000 lux. Além disso, os mesmos autores registraram a maior densidade celular ao longo da fase estacionária de crescimento sob a mesma iluminação. Markrose *et al.* (2020) encontraram a maior densidade celular da microalga *Nannochloropsis gaditana* na intensidade de 2.000 lux. Essa microalga alcançou a menor concentração celular em culturas sob a intensidade de 1.000

lux.

O aumento na intensidade luminosa incidente sobre os tanques-berçário poderia ter estimulado o maior crescimento da *N. oceanica* no experimento conduzido, tendo em vista a incapacidade das células de utilizarem as fontes de carbono orgânico fornecido em alguns tratamentos para a realização das rotas metabólicas mixo e heterotróficas. O aumento dessa iluminação poderia ser proveniente de luz natural ou artificial, levando-se em consideração as mudanças sobre outros fatores importantes no crescimento das microalgas e dos camarões, como as maiores oscilações de temperatura e aumento nos custos operacionais e de instalação.

O tratamento T2 apresentou o menor valor de amônia total presente no meio ao final do experimento, que pode ser explicado pela maior densidade celular apresentada pelo mesmo tratamento no período.

Hii *et al.* (2011) mostraram que a microalga *Nannochloropsis* sp. assimila diversas formas de nitrogênio dissolvido na água. A espécie apresentou preferência pela assimilação da amônia em comparação com a assimilação de nitrato. Entretanto, na ausência de amônia, o nitrato foi utilizado pelas células. Isso pode explicar a similaridade das concentrações iniciais e finais de nitrato nos tratamentos avaliados, tendo em vista que mesmo em tratamentos com a maior remoção da amônia, esse composto ainda esteve presente. Esta condição pode ter levado as células a não realizar em nenhum momento a assimilação do nitrato.

Nos experimentos descritos nesse trabalho ocorreu acúmulo de nitrito ao longo do experimento, sendo detectado altas concentrações de nitrito dissolvido. Neto *et al.* (2018) sugeriram que o acúmulo de nitrito em culturas de *N. oculata* em meio de cultivo de baixo custo ocorreu devido à falta de ferro no meio de cultura, levando à uma baixa atividade da ferroxidina. Entretanto, ambos os meios de cultivo avaliados nesse experimento apresentavam ferro na sua composição. Faria *et al.* (2012) sugeriram que a presença de nitrito na água utilizada no cultivo das microalgas *Chlorella* sp. e *N. oculata*, mesmo que o meio de cultivo utilizado não possuísse nitrito em sua composição, se deve ao nitrito já presente na água. A transformação da amônia em nitrito por bactérias e possível excreção de nitrito pelas células se deve ao excesso de nitrogênio em formas mais assimiláveis, como a amônia. Esses motivos podem explicar a detecção dos níveis de nitrito nesse trabalho.

Não houve diferença significativa entre a maioria dos diversos parâmetros zootécnicos estimados ao final do experimento entre os tratamentos experimentais. Mesmo com maiores valores absolutos em alguns parâmetros, muitos deles não apresentaram diferenças estatísticas consideráveis quando comparados entre si. Isso pode ser explicado pela incapacidade da microalga de atingir grandes densidades no ambiente e nas condições testadas, não

apresentando toda sua capacidade de regulação nos parâmetros de qualidade de água e, conseqüentemente, resultando num menor desempenho zootécnico dos camarões nos tanques inoculados com *N. oceanica*.

As larvas de *L. vannamei* são alimentadas com microalgas do estágio de protozoa I até mysis 1 (PIÑA-VALDEZ, 2004). Os camarões utilizados no experimento foram inoculados em tamanho de PL14, onde já ingerem partículas maiores, sendo então alimentados em sistemas de aquacultura com rações comerciais. Devido à isso não é provável que o baixo crescimento da microalga *N. oceanica* nos tanques-berçário seja devido ao consumo das células pelos camarões. Além disso, em larviculturas do *L. vannamei* geralmente se utilizam microalgas de maior tamanho e com composições nutricionais diferentes das do gênero *Nannochloropsis*, como a *Chaetoceros muelleri* (PINÃ *et al.*, 2005) e a *Thalassiosira weissflogii* (TAM *et al.*, 2021). Portanto, é de se esperar que mesmo que os camarões cultivados nos tanques-berçários tenham se alimentado da *N. oceanica*, possivelmente aderida à bioflocos, essa ingestão não levou à uma melhora no desempenho zootécnico dos animais cultivados em tratamentos onde foi feita a inoculação dessa microalga.

Costa (2017) utilizou a microalga *N. oceanica* no melhoramento do cultivo do camarão marinho *L. vannamei* na forma de cultura fresca, concentrado úmido ou biomassa seca. As PL's com $0,7 \pm 0,3$ g de peso corporal inicial usadas naquele experimento foram cultivadas por 15 dias e, ao final, apresentaram um valor médio de peso corporal menor que os valores descritos no presente trabalho. Já os valores de sobrevivência calculados por Costa (2017) foram próximos aos valores desse experimento. A autora detectou que o tratamento feito com microalga em meio de cultura manteve os níveis de amônia, nitrito e nitrato abaixo dos valores tóxicos para o *L. vannamei*. Entretanto, para a manutenção das concentrações de nutrientes em níveis baixos foi feita a inoculação de melaço de cana e troca de água quando necessário. Esse manejo em períodos de maior acúmulo de amônia e nitrito poderia ter sido utilizado nos experimentos apresentados nesse trabalho, resultando em um melhor desempenho zootécnico dos camarões cultivados.

7. CONCLUSÕES

O cultivo integrado da microalga *N. oceanica* com pós-larvas do camarão marinho *L. vannamei* não apresentou melhora significativa na maioria dos parâmetros zootécnicos dos animais cultivados. A microalga encontrou problemas para atingir maiores densidades celulares durante o período do experimento devido à baixa incidência luminosa sobre os tanques e a não assimilação das fontes de carbono orgânico testadas.

A concentração de amônia presente na água foi significativamente menor em tanques com a presença da *N. oceanica* quando comparado com o experimento controle em água clara, demonstrando a capacidade das células de assimilação e retirada desse nutriente da água. O nitrito e o nitrato acumularam no sistema devido à não total assimilação da amônia, composto nitrogenado primeiramente assimilado pela microalga.

A estimativa e controle de inibidores químicos, físicos e biológicos e a inclusão de fontes inorgânicas de carbono poderia estimular o crescimento da microalga *N. oceanica* nos tanques-berçário do camarão marinho *L. vannamei*. Além disso, uma maior densidade celular de inoculação nos tanques e reinoculações de nutrientes e células mais constantes poderiam refletir em uma melhor estabilidade das células fitoplanctônicas, levando a uma total redução de níveis de compostos tóxicos para os camarões e, conseqüentemente, melhoras significativas no desempenho zootécnico dos animais cultivados. A utilização de células de maior tamanho que, além de biofiltro, pudessem atuar mesmo que minimamente na nutrição dos camarões poderia resultar em uma melhoria no desempenho zootécnico dos animais.

A microalga *N. oceanica* pode ser cultivada em meio de cultivo alternativo de baixo custo econômico em condições controladas e apresentar estabilização na densidade celular em tanques fertilizados com meio alternativo de baixo custo e se manter ao longo do experimento mesmo com a maior turbidez aparente da água e o crescimento de espécies competidoras e predatórias, como bactérias e zooplâncton, mostrando ser promissora e justificando que sejam feitos mais estudos na utilização desse organismo na aquicultura.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELHAMID, A. S., MARTIN, N., BRIDGES, C., BRAINARD, J.S., WANG, X., BROWN, T.J., HANSON, S., JIMOH, O.F., AJABNORR, S.M., DEANE, K.H., SONG, F., HOOPER, L. Polyunsaturated fatty acids for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. Cochrane database of systematic reviews, 2018.
- ACIÉN, F. G., FERNANDÉZ, J. M., MAGÁN, J. J., MOLINA, E. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnology Advances*. P. 1344 – 1353. 2012.
- ALDAY-SANZ, V. Specific Pathogen Free (SPF), Specific Pathogen Resistant (SPR) and Specific Pathogen Tolerant (SPT) as Part of the Biosecurity Strategy for Whiteleg Shrimp (*Penaeus vannamei* Boone 1931). *Asian Fishery Science*. P. 112 – 120. 2018.
- ALDAY-SANZ, V., The shrimp book. Nottingham University Press. 2010.
- AMMAR, S. H., KHADIM, H. J., MOHAMED, A. I. Cultivation of *Nannochloropsis oculata* and *Isochrysis galbana* microalgae in produced water for bioremediation and biomass production. *Environmental Technology & innovation*. V. 10, p. 132 – 142. 2018.
- ANH, P. T., KROEZE, C., BUSH, S. R., MOL, A. P. J. Water pollution by intensive brackish shrimp farming in south-east Vietnam: Causes and options for control. *Agricultural Water Management*. P. 872 – 882. 2010.
- ASHOUR, M., ELSHOBARY, M. E., EL-SHENODY, R., KAMIL., A. B., ABOMOHRRA, A. E. F. Evaluation of a native oleaginous marine microalgae *Nannochloropsis oceanica* for dual use in biodiesel production and aquaculture feed. *Biomass and Bioenergy*. V. 120, p. 439 – 447. 2019.
- ASHOUR, M., WAHAB, A. E. Enhance growth and Biochemical composition of *Nannochloropsis oceanica*, cultured under Nutrient Limitation, Using Commercial Agricultural Fertilizers. *Journal of Marine Science: Research and Development*. V. 7, 2017.
- AZEVEDO, V. C. S., Carcinicultura: Parâmetros Integrativos como Instrumentos de Prevenção de Impactos. Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado da escola politécnica, da Universidade Federal da Bahia, 2005.
- BAE, J. H., HUR, S. B. Development of economical fertilizer-based media for mass culturing of *Nannochloropsis oceanica*. *Fisheries and aquatics sciences*. V.14, p. 317 – 322. 2011.
- BECKER, E. W., Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*. P. 207 – 210. 2007.

- BOUWMAN, A. F., PAWLOWSKI, M., LIU, C., BEUSEN, A. H. W., SHUMWAY, S.E., GLIBERT, P. M., OVERBEEK, C. C. Global hindcasts and future projections of coastal nitrogen and phosphorus loads due to shellfish and seaweed aquaculture. *Reviews in fisheries science*. 2011.
- BOYD, C. E. General Relationship Between Water Quality and Aquaculture Performance in Ponds. *Fish diseases*, Chapter 6. 2017
- BRIGGS, M.; FUNGE-SMITH, S.; SUBASINGHE, R.; PHILLIPS, M. CASTAÑEDA V. G., ESPERICUETA, M. G. F., PÉREZ, R. C. V., SÁNCHEZ, M. C. C., OSUNA, F. P. Toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to *Litopenaeus vannamei* juveniles in low-salinity water in single and ternary exposure experiments and their environmental implications. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2019.
- CHAIKAEW, P., RUGKARN, N., PONGPIPATWATTANA, V., KANOKKANTAPONG, V. Enhancing ecological-economic efficiency of intensive shrimp farm through in-out nutrient budget and feed conversion ratio. *Sustainable Environment Research*, 2019.
- CHAISUTYAKORN, P., PRAIBOON, J., KAEWSURALIKHIT, C. The effect of temperature on growth and lipid and fatty acid composition on marine microalgae used for biodiesel production. *Journal of applied phycology*. P. 37 – 45. 2018.
- CHEBAN, L., KHUDYI, O., PRUSINSKÁ, M., DUDA, A., KHUDA, L., WISZNIEWSKI, G., KUSHNIRYK, O., KAPUTSA, A. Survival, proximate composition, and proteolytic activity of *Artemia salina* bioencapsulated with different algal monocultures. *Fisheries & Aquatic life*. V. 28, p. 205 – 215.
- CHENG, P., ZHOU, C., CHU, R., CHANG, T., XU, J., RUAN, R., CHEN, P., YAN, X. Effect of microalgae diet and culture system on the rearing of bivalve mollusks: Nutritional properties and potential cost improvements. *Algal research*. V. 51. 2020
- CHEW, K. W., CHIA, S. R., PAU, L. S., YAP, Y. J., LING, T. C., CHANG, J. S. Effects of water culture medium, cultivation systems and growth modes for microalgae cultivation: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. V. 91, p. 332 – 344. 2018.
- COSTA, F. S. Efeito da suplementação das microalgas marinhas *Conticribra weissflogii* e *Nannochloropsis oceanica* no teor de lipídeos e ácidos graxos e no crescimento do camarão branco *Litopenaeus vannamei* em sistemas de bioflocos (BFT). *Dissertação de mestrado*, Universidade Federal do Rio Grande. 2017.
- CUNHA, H. M., OTERO, A. Valorization of aquaculture effluents with microalgae: The integrated Multi-Trophic Aquaculture concept. *Algal Research*. V. 24, p. 416 – 424. 2017.
- ELNABRIS, K. J. Development of a cheap and simple culture medium for the microalgae *Nannochloropsis* sp. Based on agricultural grade fertilizers available in the local market

- of Gaza Strip. Journal of Al Azhar University-Gaza. V. 14. 2012.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Fishery Statistical Collections. <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/en>. Acessado em 12/02/2021.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) The state of the world fisheries and aquaculture. 2020.
- FARIA, G. R., PAES, C. R. P. S., CASTRO, D. J. F. A., TINOCO, N. A. B., BARBARINO, E., LOURENÇO, S. O. Effects of availability of CO₂ on growth, nutrient uptake, and chemical composition of the marine microalgae *Chlorella* sp. And *Nannochloropsis oculata*, two potentially useful strains for biofuel production. International Research Journal of Biotechnology. V. 3, p. 65 – 75. 2012.
- FILHO, A. G., RONÇANI, L. D. Carcinicultura em Santa Catarina: da euforia desregulada à crise generalizada. Historia Ambiental, Latinoamericana y Caribeña. V. 8, P. 67 – 91. 2018.
- FULLBRIGHT, S. P., CHISHOLM, S., REARDON, K. F. Growth inhibition of *Nannochloropsis* species by *Bacillus pumilus*. Algal research. V. 20, p. 70 – 76. 2016.
- GEIDER, R. J., LA ROCHE, J. Redfield revisited: variability of C: N: P in marine microalgae and its biochemical basis. European Journal of Phycology. V. 37, p. 1 – 17. 2002
- GENTRY, R. R., FROEHLICH, H. E., GRIMM, D., KAREIVA, P., PARKE, M., RUST, M., GAINES, S. D., HALPERN, B. S. Mapping the global potential for marine aquaculture. Nature Ecology & Evolution. V. 1, p. 1317 – 1324. 2017.
- HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., RYAN P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Palaeontologia Electronica 4(1): 9pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm. 2001
- HAN, P., LU, Q., FAN, L., ZHOU, W. A review of the Use of Microalgae for sustainable Aquaculture. Applied sciences. 2019.
- HASAN, N. A., HAQUE, M. M., HINCHLIFFE, S. J., GUILDER, J. A sequential assessment of WSD risk factor of a shrimp farming in Bangladesh: Looking for a sustainable farming system. Aquaculture. 2020.
- HI, Y. S., SOO, C. L., CHUAH, T. S., MOHD-AZMI, A., ABOL-MUNAFI, A. B. Interactive effect of ammonia and nitrate on the nitrogen uptake by *Nannochloropsis* sp. Journal of Sustainability Science and Management. V. 6, p. 60 – 68. 2011.
- HIBBERT, D. J. Eustigmatophytes. Elsevier/North-Holland. P. 319 – 334. 1980.
- HII, Y. S., SOO, C. L., CHUAH, T. S., MOHD-AZMI, A., ABOL-MUNAFI, A. B. Interactive effect of ammonia and nitrate on the nitrogen uptake by *Nannochloropsis* sp. Journal of

- Sustainable Science and Management. V. 6, p. 60 – 68. 2011.
- HILBORN, R., Overfishing: What everyone needs to know. Oxford University Press, 2011.
- HOWLADER, P., GHOSH, A. K., ISLAM, S. S., BIR, J., BANU, G. R. Antiviral activity of *Cynodon dactylon* on white spot syndrome virus (WSSV)- infected shrimp: an attempt to mitigate risk in shrimp farming. *Aquaculture international*. V. 28, P. 1725 – 1738. 2020.
- KIM, K., JUNG, J. Y., HAN, H. S. Utilization of microalgae in aquaculture system: Biological wastewater treatment. 2019.
- KUMAR, S. D., SANTHANAM, P., PARK, M. S., KIM, M. K., Development and application of a novel immobilized marine microalgae biofilter system for the treatment of shrimp culture effluent. *Journal of water process*. V. 13, p. 137 – 142. 2016.
- LEE, R. E. Phycology. Fourth edition. Cambridge university press. 2008.
- LEITE, L. S., HOFFMANN, M. T., DANIEL, L. A. Microalgae cultivation for municipal and piggery wastewater treatment in Brazil. *Journal of Water Process Engineering*. V. 31. 2019.
- LI, T., CHEN, Z., WU, H., YANG, B., DAI, L., WU, H., XIANG, W. The potential productivity of the microalga, *Nannochloropsis oceanica* SCS-1981, in a solar powered outdoor open pond as an aquaculture feed. *Algal Research*. V. 46. 2020.
- LI, Y., HUANG, A., GU, W., WU, S., XIE, X., WANG, G. Effects of inorganic carbon source and light on acetate assimilation by *Nannochloropsis oceanica* (Eustigmatophyceae) in mixotrophic cultivation. *European Journal of Phycology*. V. 55, p. 64- 75. 2020
- LI, Y., HUANG, A., GU, W., WU, S., XIE, X., WANG, G. Effects of inorganic carbon and light on acetate assimilation by *Nannochloropsis oceanica* (Eustigmatophyceae) in mixotrophic cultivation. *European Journal of Phycology*. V. 55, p. 64 – 75. 2019.
- LIU, J., SONG, Y., QIU, W. Oleaginous microalgae *Nannochloropsis* as a new model for biofuel production: Review & analysis. *Renewable and Sustainable Energy reviews*. V. 72, p. 154 – 162. 2017.
- LOURENÇO. S. O. Cultivo de microalgas marinhas: Princípios e aplicações.ed. Rima. 2006
- LUBIÁN, L. M., MONTERO, O., MORENO-GARRIDO, L., HUERTAS I. E., SOBRINO, C., GONZÁLES-DEL VALLE, M., PARÉS, G. *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. *Journal of Applied Phycology*. V. 12, p. 249 – 255. 2000.
- MA, Y., WANG, Z., YU, C., YIN, Y., ZHOU, G. Evaluation of the potential of 9 *Nannochloropsis* strains for biodiesel production. *Bioresource Technology*. V. 167, p. 503 – 509. 2014.

- MARKROSE, S., CHELLAPPAN, A., THANGAMANI, P., GEORGE, S., THANGASWAMY, S., THAVASIMUTHU, C., MARIAVINCENT, M. Optimization of physical parameters for the growth and lipid production in *Nannochloropsis gaditana* (Lubian, 1982). Journal of applied biology & biotechnology. V. 8, p. 6 – 12. 2020.
- MAYNARDO, J. J., DOSHI, V., RAJANREN, J. R., RAJASEKARAN, R. The optimization of light intensity and drying temperature on lipid content of microalgae *Nannochloropsis oculata*. Journal of Engineering Science and Technology. Special Issue, p. 112 – 121. 2015.
- MEDEIROS, V. P. B., PIMENTEL, T. C., VARANDAS, R. C. R., SANTOS, S. A., PEDROSA, G. T. S., SASSI, C. F. C., CONCEIÇÃO, M. M. C., MAGNANI, M. Exploiting the use of agro-industrial residues from fruit and vegetables as alternative microalgae culture medium. Food Research Internacional. V. 137. 2020.
- MITRA, M., MISHRA, S. A Biorefinery from *Nannochloropsis* spp. Utilizing Wastewater Resources. Application of microalgae in wastewater treatment. P. 123 – 145. 2019.
- MITRA, M., MISHRA, S. Effects of glucose on growth and fatty acid composition of an euryhaline eustigmatophyte *Nannochloropsis oceanica* under mixotrophic condition. Bioresource Technology Reports. V. 3, p. 147 – 153. 2018.
- MITRA, M., SHAH, F., BHARADWAJ, S. V. V., PATIDAR, S. K., MISHRA, S. Cultivation of *Nannochloropsis oceanica* biomass rich in eicosapentanoic acid utilizing wastewater as a nutrient resource. Bioresource Technology. V. 218, p. 1178 – 1186. 2016.
- MOLES, P; BUNGE, J. Shrimp Farming in Brazil: An industry overview. Report prepared under the world bank, NACA, WWF and FAO Consortium program on Shrimp farming and the environment. 2002.
- MOLFINO, A., AMABILE, M.I., MONTI, M., MUSCARITOLI, M. Omega-3 polyunsaturated fatty acids in critical illness: Anti-inflammatory, proresolving, or both? Oxidative medicine and cellular longevity. Volume 2017. 2017.
- NATORI, M. M., SUSSEI F. R., SANTOS, E. C. B., PREVIERO, T. C., VIEGAS, E. M. M., GAMEIRO. A. H. Desenvolvimento da carcinicultura marinha no Brasil e no mundo: avanços tecnológicos e desafios. Informações econômicas, V. 41. P. 61 – 73, 2011.
- NEGREIROS, L.M.S.; SANTOS, D.B. Doenças microbianas na carcinicultura brasileira: uma revisão. Carpe Diem: Revista Cultural e Científica do UNIFACEX. vol. 13, n. 1, 2015.
- NEORI, A. “Green water” microalgae: the leading sector in world aquaculture. Journal of Applied Phycology. V. 23, p. 143 – 149. 2011.
- NETO, I. A., BRANDÃO, H., FURTADO, P. S., Jr, W. W. Acute toxicity of nitrate in

- Litopenaeus vannamei* at low salinity levels. *Ciência Rural*, 2019.
- NETO, W. A. F., MENDES, C. R. B., ABREU, P. C. Carotenoid production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* in different low-cost culture media. *Aquaculture research*. 2018.
- NGUYEN, T. T. D., NGUYEN, T. T., BINH, Q. A., BUI, X. T., NGO, H. H., VO, H. N. P., LIN, K. Y. A., VO, T. D. H., GUO, W., LIN, C., BREIDER, F. Co-culture of microalgae-activated sludge for wastewater treatment and biomass production: Exploring their role under different inoculation ratios. *Bioresource technology*. V.314. 2020.
- NIELSEN, L. K., SMYTH, G. K., GREENFIELD, P. F. Hemacytometer cell count distributions: Implications of Non-Poisson Behavior. *Biotechnol. Prog.* V. 7, p. 560 – 563. 1991.
- ODDSON, G. V., A definition of Aquaculture Intensity Based on Production Functions – The Aquaculture Production Intensity Scale (APIS). *Water*, 2020.
- OLIVEIRA, N. G. Cultivo da microalga de alto valor econômico *Nannochloropsis oceanica* em meio alternativo utilizando melão de cana como substrato orgânico. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal do Ceará, 2019.
- PAIVA, K. L. N. Análise dos custos e da viabilidade da carcinicultura dos micros produtores do município de Tibau do sul/RN. Dissertação pela UFRN, 2018.
- PIÑA, P., NIEVES, M., RAMOS-BRITO, L., CHAVIRA-ORTEGA, C. O., VOLTOLINA, D. Survival, growth and feeding efficiency of *Litopenaeus vannamei* protozoa larvae fed different rations of the diatom *Chaetoceros muelleri*. *Aquaculture*. V. 249, p. 431 – 437. 2005.
- PIÑA-VALDEZ, P. Balance energético de los estadios larvarios de camarón blanco (*Litopenaeus vannamei*, Boone) con la dieta tradicional y con otra no tradicional. Tese de doutorado, Universidade autónoma de Nayarit. 2004.
- RAY, A. J., DRURY, T. H., CECIL, A. Comparing clear-water RAS and biofloc systems: Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) production, water quality, and biofloc nutritional contributions estimated using stable isotopes. *Aquacultural Engineering*. V. 77, p. 9 -14. 2017.
- REN, M., OGDEN, K. Cultivation of *Nannochloropsis gaditana* on mixtures of nitrogen sources. *Environmental Progress & Sustainable Energy*. V. 33, p. 551 – 555. 2014.
- REVISTA ABCC, Berçários intensivos, Raceways e crescimento compensatório – Aumentando o número de ciclos de cultivo por ano. 2017.
- REVISTA ABCC. Associação Brasileira de Criadores de Camarão. Ano XVIII N°2, Novembro de 2016.

- ROCHA, I. P., A indústria do Camarão Cultivado. ABCC – Associação Brasileira de Criadores de Camarão. 2013.
- ROCHÍN, J. R., ESPERICUETA, M. G. F., SANUDO, J. F. F., SILVAS, S. G. A., LOPEZ, M. G. F., OSUNA, F. P. Acute toxicity of nitrite on white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles in low-salinity water. *Aquaculture research*, 2017.
- RUIZ, J., OLIVIERI, G., VREE, J., BOSMA, R., WILLEMS, P., REITH, J. H., EPPINK, M. H. M., KLEINEGRIS, D. M. M., WIJFFELS, R. H., BARBOSA, M. J. Towards industrial products from microalgae. *Energy & Environmental Science*. V. 9, p. 3036 – 3043. 2016.
- SAMOCHA, T. M., FRICKER, J., ALI, A. M., SHPIGEL, M., NEORI, A. Growth and nutrient uptake of macroalga *Gracilaria tikvahiae* cultured with the shrimp *Litopenaeus vannamei* in an integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA) system. *Aquaculture*. V. 446, p. 263 – 271. 2015.
- SAMOCHA, T. M., Use of Intensive and Super-Intensive Nursery Systems. Alday-Sanz, V. (Ed.), *The Shrimp Book*. Nottingham University Press, Nottingham, UK, pp. 247 – 280. 2010.
- SCHNEIDER, R. C. S., LIMA, M. M., HOELTZ, M., NEVES, F. F., JOHN, D. K., AZEVEDO, A. Life cycle assessment of microalgae production in a raceway pond with alternative culture medium. *Algal research*. V. 32, p. 280 – 292. 2018.
- SCHNEIDER, R. C. S., LIMA, M. M., HOELTZ, M., NEVES, F. F., JOHN, D. K., AZEVEDO, A. Life cycle assessment of microalgae production in a raceway pond with alternative culture medium. *Algal Research*. V. 32, p. 280 – 292. 2018.
- SCHUUR, A. M. Evaluation of biosecurity applications for intensive shrimp farming. *Aquicultural Engineering*. P. 3 – 20. 2003.
- SHAH, M. R., LUTZU, G. A., ALAM, A., SARKER, P., CHOWDHURY, M. A. K., PARSAEIMEHR, A., LIANG, Y., DAROCH, M. Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *Journal of applied phycology*. V. 30, p. 197 – 213. 2017.
- SIMOPOULOS, A. P., Humam requeriment for N-3 polyunsaturated fatty acids. *Symposium: Role of poultry products in enriching the human diet with n-3 PUFA*. 2000.
- SUMAILA, U. R., BELLMAN, C., TIPPING, A. Fishing for future: An overview of challenges and opportunities. *Marine policy*. P. 173 – 180. 2016.
- TAM, L. T., CONG, N. V., THOM, L. T., HA, N. C., HANG, N. T. M., MINH, C. V., VIEN, D. T. H., HONG, D. D. Cultivation and biomass production of the diatom *Thalassiosira weissflogii* as a live feed for white-leg shrimp in hatcheries and commercial farms in Vietnam. *Journal of applied phycology*. V. 33, p. 1559 – 1577. 2021

- TAPIERO, H., BA, G. N., COUVRER, P., TEW, K. D. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. V. 5. P. 215 – 222. 2002.
- TESSARI, L. F. A., SOCCOL, C. R., RODRIGUES, C., GONZÁLEZ, E. G., TANOBE, V. O. A., KIRNEV, P. C. S., CARVALHO, J. C. Development of a culture medium for microalgae production based on minimal processing of oil palm biomass ash. *Fermentation*. V. 8. 2022.
- TIBBETTS, S. M., MILLEY, J. E., LALL, S. P. Chemical composition and nutritional properties of freshwater and marine microalgal biomass cultured in photobioreactors. *Journal of Applied Phycology*. P. 1109 – 1119. 2015.
- VENKATESAN, j., MANIVASAGAN, P., KIM, S. K. Capítulo 1: Marine microalgae Biotechnology: Present Trends and Future Advances. *Handbook of Marine Microalgae*. P. 1 – 9. 2015.
- WANG, X., LIN, L., LU, H., LIU, Z., DUAN, N., DONG, T., XIAO, H., LI, B., XU, P. Microalgae cultivation and culture medium recycling by a two-stage cultivation system. *Frontiers of environmental science & engineering*. V. 12. 2018.
- XU, J., HAN, F., ZHANG, X. Silencing Shrimp white spot syndrome virus (WSSV) genes by siRNA. *Antiviral Research*. V. 73., P. 126 – 131. 2007
- ZANOAGA, O., JURJ, L. R., RADULY, L., COJOCNEANU-PETRIC, R., FUENTES-MATTEI, E., WU, O., BRAICU, C., GHERMAN, C. D., BERIDAN-NEAGOE, I. B. Implications of dietary ω -3 and ω -6 polyunsaturates fatty acids in breast cancer (review). *Experimental and therapeutic medicine*. 2017.
- ZHANG, X., LU, Z., WANG, Y., WENSEL, P., SOMMERFELD, M., HU, Q. Recycling *Nannochloropsis oceanica* culture media and growth inhibitors characterization. *Algal research*. V. 20, p. 282 – 290. 2016.

ANEXO A: MEIO DE CULTIVO F/2 (GUILLARD, 1975) MODIFICADO.

Componente	Solução estoque	Quantidade
NaNO ₃	75 g/L	1 mL
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	5 g/L	1 mL
NaSiO ₃ 9H ₂ O	30 g/L	1 mL
Solução estoque de metais- traço	-	1 mL
Solução estoque de vitaminas	-	1 mL
Solução estoque de metais traço		
Componente	Solução etoque	Quantidade
FeCl ₃ 6H ₂ O	-	3.15 g
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	-	4,36 g
CuSO ₄ 5H ₂ O	9,8 g/L	1 mL
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	6,3 g/L	1 mL
ZnSO ₄ 7H ₂ O	22,0 g/L	1 mL
CoCl ₂ 6H ₂ O	10,0 g/L	1 mL
MnCl ₂ 4H ₂ O	180 g/L	1 mL
Solução estoque de vitaminas		
Componente	Solução estoque	Quantidade
Tiamina HCl (Vitamina B1)	-	200 mg
Cianocobalamina (Vitamina B12)	1 g/L	1 mL

ANEXO B: MEIO DE CULTIVO FERTILIZANTE3

Componente	Solução estoque	Quantidade
------------	-----------------	------------

Salitre do Chile	150 g/L	1 mL
Superfosfato triplo	25 g/L	1 mL
Cloreto de ferro (III)	4,6 g/L	1 mL
Carbono orgânico		
Componente	Solução estoque	Quantidade
Açúcar refinado	-	30 g/L
Melaço de cana-de-açúcar	-	30 g/L