

**Nélson Bruno Martins Marques da Costa**

**USO DE HALOBACTÉRIAS COMO ALTERNATIVA PARA  
ALIMENTAÇÃO DE *Artemia* sp. EM CULTURA**



**Departamento de Zoologia e Antropologia  
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto**

**2004**

**Nelson Bruno Martins Marques da Costa**

**USO DE HALOBACTÉRIAS COMO ALTERNATIVA PARA  
ALIMENTAÇÃO DE *Artemia sp.* EM CULTURA**

**Dissertação de Mestrado em Hidrobiologia apresentada à  
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto**

**Porto, 2004**

Aos meus Pais,

## AGRADECIMENTOS

Ao concluir este trabalho não poderemos deixar de agradecer aqueles que mais directamente contribuíram para a sua realização.

À Prof. Doutora Natividade Vieira, pela sua orientação, por toda a disponibilidade sempre demonstrada, pelas sugestões dadas, pelo incentivo e acompanhamento em todas as fases do trabalho. Por me ter recebido no seu laboratório e me ter proporcionado as condições essenciais à realização deste projecto.

À Prof. Doutora Leonor Fidalgo, pelo interesse e incentivo, bem como pela facilitação do uso de alguns dos seus recursos laboratoriais.

Ao Prof. Doutor Alexandre Valente, pelo incentivo, apoio e disponibilidade, bem como pelo acolhimento deste projecto no laboratório de Ecologia.

Ao Prof. Doutor Vítor Vasconcelos, pela disponibilidade e pela disponibilização dos seus recursos laboratoriais.

Ao Eng. José Monteiro de Castro, aluno de Doutoramento no Imperial College em Londres, pelo incentivo, pelo seu apoio na obtenção de bastantes artigos de interesse para este trabalho e pela revisão do resumo na língua Inglesa.

Ao Eng. Ricardo Mota Prego, aluno de Mestrado em Barcelona, pelo incentivo e pela revisão do resumo na língua Francesa.

Ao Dr. Nuno Monteiro, aluno de Doutoramento na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, pela disponibilidade em recolher amostras das salinas de Rio Maior e de Aveiro, e por auxiliar na procura de soluções para os problemas técnicos que foram surgindo. E pela análise construtiva de parte dos dados deste projecto.

À Dra. Carla Silva e ao Eng. Newton Veloso, alunos de Mestrado na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, pelo apoio que me deram na manutenção dos aquários.

À D. Maria Helena pela disponibilidade sempre demonstrada para mitigar lacunas nas provisões de alguns reagentes.

À Dra. Rosário Cruz, pela sua atenção e disponibilidade em resolver todos os assuntos burocráticos em que me vi envolvido.

Um agradecimento muito especial ao meus pais, António Costa e Maria da Conceição Costa, e à minha namorada, Rosário Freitas, pelo estímulo e apoio com que sempre me presentearam.

## RESUMO

Este trabalho teve como principal objectivo avaliar a viabilidade da utilização de Halobactérias como dieta alimentar para *Artemia sp.* em cultura, alternativamente às dietas com micro algas ou com alimentos inertes.

De modo a alcançar esse objectivo começamos por avaliar diferentes meios de cultura para Halobactérias vermelhas. Nomeadamente: um meio simples (MS250), constituído apenas por fermento de padeiro industrial e 250g de NaCl por litro; um meio complexo (MC156), baseado num meio de cultivo para diferentes membros da Família *Halobacteriaceae* (OREN, A., 1994 & OREN, A., & RODRÍGUEZ – VALERA, F., 2001); um meio complexo (MC250), tendo por base um meio designado para o crescimento de *Halobacterium halobium* e *H. salinarum* (OREN, A., 1994 & OREN, A., & RODRÍGUEZ – VALERA, F., 2001); e um meio de crescimento enriquecido (ME250), constituído por 80% de água retirada de cristalizadores de salinas ultra filtrada e 20% do meio de crescimento complexo MC250.

O meio simples MS250, revelou-se ineficaz para promover o crescimento restritivo de Halobactérias vermelhas e pouco eficiente para o desenvolvimento de outro tipo de Halobactérias, registando-se uma absorvância máxima a 520nm de  $0,264 \pm 0,023$  ao fim de 18 dias.

O meio complexo MC156, apresentou bastante eficiência no aumento do crescimento de Halobactérias, mas pouca eficácia na restrição do crescimento de Halobactérias não vermelhas. Apresentou ao fim de 21 dias uma absorvância máxima a 520nm de  $1,613 \pm 0,187$ .

O meio complexo MC250, registou maior crescimento de Halobactérias vermelhas e eficiente restrição do crescimento de Halobactérias não vermelhas, apresentando ao fim de 50 dias uma absorvância máxima a 520nm de  $0,741 \pm 0,097$ .

Com o meio de crescimento enriquecido ME250, o crescimento foi ligeiramente superior ao meio complexo MC250 e manteve a capacidade de restrição do crescimento de Halobactérias não vermelhas, atingindo-se ao fim de 47 dias uma absorvância máxima a 520nm de  $0,881 \pm 0,053$ .

A análise estatística comparada destes dois últimos meios, MC250 e ME250, revelou que estes apresentam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

Após obtermos estes resultados, foram utilizadas várias dietas alimentares para náuplios de *Artemia sp.*, constituídas por: 5mL diários de meio de crescimento enriquecido ME250 (DIETA A); 5mL diários de água destilada a 35‰ (DIETA B); um inóculo inicial de

20mL de *Tetraselmis suecica* (DIETA C); 5mL diários de cultura de Halobactérias vermelhas que se tinham desenvolvido no meio de crescimento enriquecido ME250 (DIETA D), e finalmente, 5mL diários de *T. suecica* (DIETA E).

Voltamos a repetir o ensaio utilizando uma sexta dieta alimentar constituída por 2,5mL de cultura de Halobactérias vermelhas que se tinham desenvolvido no meio de crescimento enriquecido ME250, e 2,5mL de *T. suecica* (DIETA F). Contudo, durante este ensaio a temperatura ambiente foi mais baixa do que no ensaio anterior devido às condições laboratoriais.

As dietas que apresentaram melhores resultados foram as DIETAS A e E, tanto no primeiro ensaio como no segundo. Os organismos sobreviveram durante 21 dias no primeiro ensaio e 14 dias no segundo, apresentando um comprimento total de  $4,05 \pm 0,15$ mm e  $6,00 \pm 0,23$ mm, no primeiro ensaio,  $1,321 \pm 0,106$ mm e  $1,766 \pm 0,073$ mm, no segundo ensaio, respectivamente para as DIETAS A e E. Com a DIETA B, os organismos sobreviveram apenas 4 dias no primeiro ensaio, 3 dias no segundo ensaio, apresentando um comprimento total de  $1,02 \pm 0,09$ mm e  $0,820 \pm 0,134$ mm, no primeiro e segundo ensaio respectivamente. Com DIETA C, os organismos sobreviveram 21 dias no primeiro ensaio e 14 dias no segundo ensaio, apresentando um comprimento total de  $3,05 \pm 0,15$ mm e  $1,511 \pm 0,089$ mm, no primeiro e segundo ensaio, respectivamente. Com a DIETA D, os organismos sobreviveram 18 dias no primeiro ensaio e 10 dias no segundo ensaio, apresentando um comprimento total de  $3,37 \pm 0,29$ mm e  $0,729 \pm 0,018$ mm, no primeiro e segundo ensaio, respectivamente. Por fim, com a DIETA F, os organismos sobreviveram 10 dias e apresentaram um comprimento total de  $0,806 \pm 0,039$ mm.

Face a estes resultados, a utilização de Halobactérias vermelhas como alternativa alimentar para *Artemia sp.* não parece ser a mais vantajosa. Contudo, tal não acontece no meio natural, provavelmente, devido a outro material biológico ou inerte que é utilizado pela *Artemia* como complemento alimentar (OREN, A., 1994, DYALL-SMITH, M., 2000 e PEDRÓS-ALIÓ, et al., 2000).

Para complementar este trabalho, e para verificar o valor nutricional da *Artemia* cultivada em laboratório, face à natural, deveriam ser efectuadas análises nutricionais, principalmente de ácidos gordos e aminoácidos. Assim poderíamos verificar a relação inter específica que existe entre *Artemia* e Halobactérias nos meios hipersalinos e determinar o valor nutricional indispensável para as espécies cultivadas em Aquacultura.

## ABSTRACT

The aim of the present dissertation is to assess the suitability of utilizing Halobacteria as the main diet for *Artemia sp.* in culture, in alternative to the diets based on micro algae or with inert victuals.

In order to achieve this objective, different culture media for red Halobacteria were studied, namely: a simple medium (MS250) composed by industrial yeast and 250g of NaCl per liter; a complex medium (MC156) based on a medium of cultivation for different members of the Family *Halobacteriaceae* (OREN, A., 1994 & OREN, A., & RODRÍGUEZ – VALERA, F., 2001); another complex medium (MC250) based on a medium prepared for growing *Halobacterium halobium e H. salinarum* (OREN, A., 1994 & OREN, A., & RODRÍGUEZ – VALERA, F., 2001); an enriched medium composed by 80% of water obtained from brine and by 20% of the complex medium MC250.

The simple medium MS250 revealed to be inefficient to promote the restrictive growth of red Halobacteria and low efficient for the development of other Halobacteria types, being measured a maximum absorption at 520 nm of  $0,264 \pm 0,023$  after 18 days.

The complex medium MC156, has shown a good efficiency on the growth of Halobacteria. Conversely, its efficiency to restrain the growth of non-red Halobacteria was rather low. After 21 days the maximum absorption observed at 520nm was  $1,613 \pm 0,187$ .

The complex medium MC250 presented a higher growth for of red Halobacteria and good efficiency on restraining non-red Halobacteria. After 50 days it has shown a maximum absorption at 520nm of  $0,741 \pm 0,097$ .

The enriched medium ME250 revealed a slightly higher growth comparing to the complex medium MC250 and has maintained its restraining capacity to the growth of non-red Halobacteria. After 47 days the maximum absorption at 520nm was  $0,881 \pm 0,053$ .

The statistical analysis of the media MC250 and ME250 revealed that significant differences were present ( $P < 0,05$ ).

The second part of the research focused on the assessment of the various diets alimentary for nauplii of *Artemia sp.*, namely diets composed by: 5ml/day of the enriched medium ME250 (DIET A); 5ml/day of distilled water at 35‰ (DIET B); with a initial inoculation of 20ml of *Tetraselmis suecica* (DIET C); 5ml/day of red Halobacteria which were grown in the enriched medium ME250 (DIET D); finally, 5ml/day of *Tetraselmis suecica* (DIET E).

A second variant of this experiment was performed in which an additional diet (DIET F) consisting of 2,5ml/day of red Halobacteria grown in the enriched medium ME250 and 2,5ml/day of *Tetraselmis suecica*. However, during this experiment, the ambient temperature was lower than during the previous one.

Diets A and F presented better results in both the first and second experiments. The organisms survived for 21 days in the first experiment and 14 days in the second experiment, showing a total length of  $4,05 \pm 0,15$ mm and  $6,00 \pm 0,23$ mm in the first experiment and  $1,321 \pm 0,106$ mm and  $1,766 \pm 0,073$ mm in the second experiment, respectively. Under DIET B, the organisms only survived for 4 days in the first experiment and 3 days in the second experiment, presenting a total length of  $1,02 \pm 0,09$ mm and  $0,820 \pm 0,134$ mm, in the first and second experiments respectively. With DIET C, the organisms survived for 21 days in the first experiment and 14 days, presenting a total length of  $3,05 \pm 0,15$ mm and  $1,511 \pm 0,089$ mm, in the first and second experiments. With DIET D, the organism survival lasted for 18 days, in the first experiment and 10 days in the second experiment, presenting total length of  $3,37 \pm 0,29$ mm and  $0,729 \pm 0,018$ mm, respectively. Finally, with DIET F, the organisms survived for 10 days and the total length observed was  $0,806 \pm 0,039$ mm.

Face to these results, the use of red Halobacteria as alternative feed for *Artemia sp.* doesn't seem to be the most advantageous. However, such doesn't happen in the natural way, probably, due to other biological material or inert that is used by *Artemia* as a complement alimentary (OREN, A., 1994, DYALL-SMITH, M., 2000 and PEDRÓS-ALIÓ, et al., 2000).

To complement this work, and to verify the nutritional value of *Artemia* cultivated at laboratory, face to the natural, they should be effectuated nutritional analyses, mainly of fat acids and amino acids. To verify the specific inter relationship that exists between *Artemia* and Halobacteria in the hyper saline means and to determine the nutritional value indispensable for the species cultivated in Aquaculture.

## RÉSUMÉ

Cette thèse a comme objectif évaluer la possibilité d'utiliser Halobactéries comme nourriture pour *Artemia sp.* em culture, par rapport aux nourritures usuelles avec micro algue ou aliments inertes.

Pour atteindre cet objectif on commence par analyser différents environnement pour développer les Halobactéries rouges. Notamment, on teste: Un environnement simple (MS250), composé simplement par « ferment de boulanger » industriel et 250g de NaCl/l ; Un environnement plus complexe (MC156), spécifique pour *Halobacteriaceae* (OREN, A., 1994 & OREN, A., & RODRÍGUEZ – VALERA, F., 2001); Un autre environnement complexe (MC250), avec une base optimisée pour *Halobacterium halobium* e *H. salinarum* (OREN, A., 1994 & OREN, A., & RODRÍGUEZ – VALERA, F., 2001) ; Finalement, un environnement de croissance enrichit (ME250), composé par 80% d'eau de marais salant ultra filtrée et 20% de MC250.

L'environnement MS250 c'est montré inefficace pour la croissance spécifique des Halobactéries rouges et peu efficace pour le développement des autres types d'Halobactéries, avec une absorption maximale à 520nm de  $0,264 \pm 0,023$  après 18 jours.

L'environnement MC156 c'est montré très efficace pour la croissance des Halobactéries, mais peu efficace dans le procès d'élimination des Halobactéries non rouges. Après 21 jours, il avait une absorption maximale à 520nm de  $1,613 \pm 0,187$ .

L'environnement MC250, a réussi a augmenter la croissance des Halobactéries rouges et a éliminer les Halobactéries non rouges. Après 50 jours, il avait une absorption maximale à 520nm de  $0,741 \pm 0,097$ .

L'environnement enrichit ME250, c'est montré légèrement supérieur à MC250 et a réussi éliminer la croissance des Halobactéries non rouges. Après 47 jours, il avait une absorption maximale à 520nm de  $0,881 \pm 0,053$ .

L'analyse statistique de ces deux derniers environnements, MC250 et ME250, a montré qu'ils avaient des différences significatives ( $P < 0,05$ ).

Après ces résultats, on a démarré la deuxième partie de la thèse: l'évaluation des différentes types de nourriture pour nauplii de *Artemia sp.*, composées par: 5mL/jour de l'environnement enrichit ME250 (DIETA A); 5mL/jour d'eau distillé à 35‰ (DIETA B); un inocule initial de 20mL de *Tetraselmis suecica* (DIETA C); 5mL/jour d'Halobactéries rouges développés dans ME250 (DIETA D), et finalement, 5mL/jour de *T. suecica* (DIETA E).

On a aussi effectué ce même essai une deuxième fois, en rajoutant une sixième nourriture composée par 2.5mL/jour d' Halobactéries rouges développées dans ME250 et 2,5mL/jour de *T. suecica* (DIETA F). Par contre, il faut noter que la température était plus faible que sur les autres essais.

Les nourritures qui ont obtenu les meilleurs résultats ont été DIETA A et E, dans les deux essais. Les organismes ont survécu pendant 21 jours premier essais et 14 jours dans le deuxième, avec une longueur totale de  $4,05 \pm 0,15$ mm et  $6,00 \pm 0,23$ mm, dans le premier essai,  $1,321 \pm 0,106$ mm et  $1,766 \pm 0,073$ mm, dans le deuxième essai, respectivement avec DIETA A et E. Avec DIETA B, les organismes n'ont survécu que 4 jours dans le premier essai, 3 jours dans le deuxième essai, avec une longueur totale de  $1,02 \pm 0,09$ mm et  $0,820 \pm 0,134$ mm, dans le premier et deuxième essai, respectivement. Avec DIETA C, ils résistent 21 jours dans le premier essai et 14 jours dans le deuxième essai, et ont une longueur totale de  $3,05 \pm 0,15$ mm et  $1,511 \pm 0,089$ mm, dans le premier et deuxième essai, respectivement. Avec DIETA D, les organismes tiennent 18 jours dans le premier essai et 10 jours dans le deuxième essai, et ont une longueur totale de  $3,37 \pm 0,29$ mm et  $0,729 \pm 0,018$ mm, dans le premier et deuxième essai, respectivement. Finalement, avec DIETA F, les organismes résistent 10 jours et présentent une longueur totale de  $0,806 \pm 0,039$ mm.

Faites face à ces résultats, l'usage de Halobactéries rouge comme alternative nourrir pour *Artemia sp.* ne paraît pas être le plus avantageux. Cependant, tel ne se passe pas dans le milieu naturel, probablement, dû à autre matière biologique ou inerte cela est utilisé par *Artemia* comme un complément alimentaire (OREN, A., 1994, DYALL - SMITH, M., 2000 et PEDRÓS-ALIÓ, al de l'et., 2000).

Pour compléter ce travail, et vérifier la valeur alimentaire d'*Artemia* cultivé à laboratoire, faites face au naturel, ils devraient être effectués des analyses alimentaires, principalement de gros acides et acides aminés. Vérifier le spécifique enterrez rapport qui existe entre *Artemia* et Halobactéries dans les moyens salins hyperactifs et déterminer la valeur alimentaire indispensable pour l'espèce ont cultivé dans Aquaculture.

## ÍNDICE GERAL

1. Introdução	11
1.1. Halobactérias	12
1.1.1. Morfologia	12
1.1.2. Fisiologia	13
1.1.3. Taxionomia	14
1.1.4. Cultura	15
1.2. <i>Artemia</i>	16
1.2.1. Morfologia	17
1.2.2. Fisiologia	20
1.2.3. Taxionomia	21
1.2.4. Cultura	21
1.2.5. Culturas enriquecidas	24
1.3. Objectivos	25
2. Material e Métodos	27
2.1. Meios de Cultura	27
2.2. Dietas	32
3. Resultados e Discussão	36
3.1. Meios de Cultura	36
3.2. Dietas	50
4. Conclusão	74
5. Bibliografia	75
6. Anexos	81

## 1. INTRODUÇÃO

As salinas proporcionam uma gama de ambientes com diferentes salinidades, desde a da água do mar até à saturação do Cloreto de Sódio. À medida que a água do mar evapora e a salinidade aumenta, a água é bombeada ou conduzida por gravidade para o tanque seguinte, de tal modo que a salinidade de cada tanque é mantida dentro de limites bastante apertados. Cada tanque pode então ser considerado em equilíbrio e a sua comunidade biótica bem adaptada a essa salinidade. Os dois extremos de salinidade proporcionam um dos habitats mais comuns (água do mar) e um dos habitats mais extremos (salmoura de Cloretos de Cálcio e Magnésio). Em nenhum outro sistema existe um gradiente de ambientes de salinidades diferentes a distâncias tão próximas (PEDRÓS-ALIÓ, et al., 2000).

PEDRÓS-ALIÓ, et al., 2000, propõem um quadro resumo dos habitats presentes nas salinas, bem como da contribuição relativa de cada grupo para a dinâmica de todo o ecossistema (figura 1).

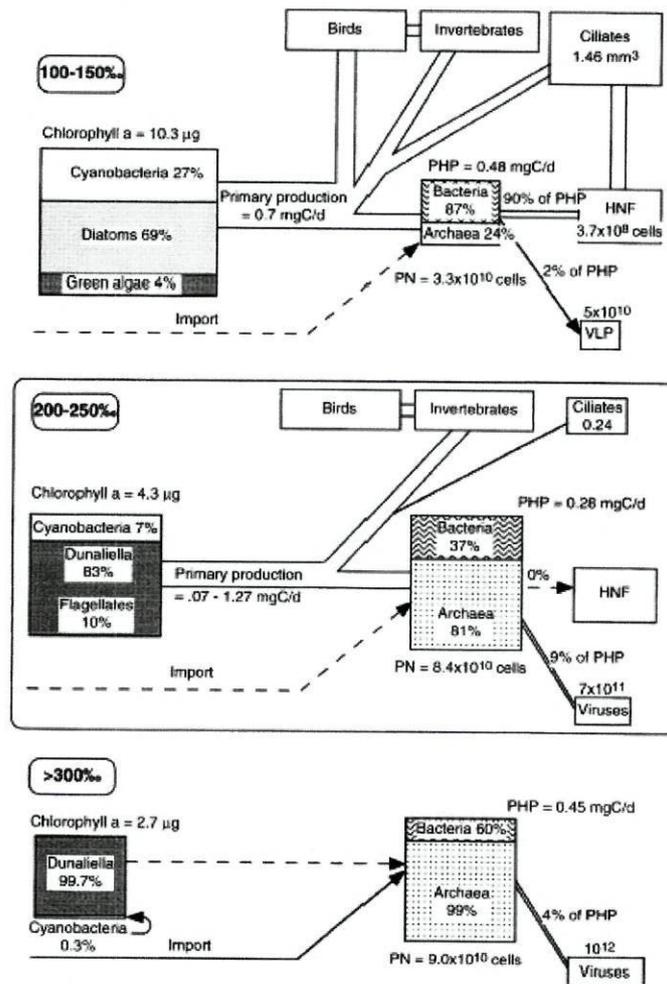


Figura 1. Esquema simplificado da teia alimentar em três gradientes de salinidade distintos.

Neste quadro, entre 100 – 150‰ de salinidade, o grupo dos produtores aparece repartido entre Cianobactérias (27%), Diatomáceas (69%) e Algas Verdes (4%). Podemos verificar ainda que, neste ambiente, o grupo dos consumidores é constituído por Aves, Invertebrados, Ciliados, Bactérias e Arque bactérias.

Passando para o gradiente seguinte, 200 – 250‰, o grupo dos produtores apresenta menos diversidade, com a Alga Vermelha *Dunaliella* a ser responsável por 83% da produção, cabendo 10% a Flagelados e 7% a Cianobactérias. Em termos de consumidores, a diversidade mantém-se, apenas com um decréscimo nos Ciliados e com um aumento relativo da percentagem de Arque bactérias. Podemos notar ainda que as Aves passam a alimentar-se exclusivamente de invertebrados, aumentando deste modo um nível trófico em relação à posição que ocupavam no gradiente anterior.

Quando a salinidade ultrapassa as 300‰, a produção biológica fica quase exclusivamente entregue à *Dunaliella* e os consumidores vêm-se reduzidos a Bactérias e Arque bactérias que passam a dominar a comunidade dos consumidores.

## 1.1 HALOBACTÉRIAS

### 1.1.1 Morfologia

As Halobactérias, são Arque bactérias halofílicas que utilizam uma proteína membrana, a bacteriorrodopsina, para sintetizar ATP sobre condições anaeróbias e na presença de luz (LEE, S. Y., et al., 1998).

As Halobactérias são procarióticas, excluindo *Halococcus*, e não apresentam uma parede celular rígida, apresentando apenas uma única camada de glicoproteínas; chamada camada superficial ou camada *s*. As subunidades são mantidas unidas por catiões divalentes (provavelmente  $Mg^{2+}$ ), e essa camada pode ser totalmente removida tratando as células com EDTA (DYALL-SMITH, M., 2000).

As formas celulares variam bastante, muitas apresentam formas arredondadas. *Haloarcula sp.* apresentam frequentemente formas geométricas triangulares ou quadradas. As formas celulares podem variar consoante o meio de crescimento. A coloração de Gram deve ser realizada após fixação das células (em 2% de ácido acético, por exemplo), de outro modo apresentam formas irregulares de balões: as sem paredes celulares apresentam-se

fracamente Gram negativas, e as *Halococci* apresentarão uma coloração Gram positiva (DYALL-SMITH, M., 2000).

### 1.1.2 Fisiologia

As águas hipersalinas, com concentrações de sal que excedam 200 – 250 g por litro, até saturação, são frequentemente caracterizadas por densas comunidades de Arque bactérias (Família *Halobacteriaceae*). Estas bactérias conferem uma coloração vermelha às massas de água, como no caso do Mar Morto ou nos cristalizadores de salinas (OREN, A., 1994).

DYALL-SMITH, M., 2000, afirma que a cor vermelha das salinas e dos lagos salgados naturais é principalmente causada por um pigmento vermelho (bacteriorrodopsina) produzido pelas Halobactérias. Algas vermelhas, como a *Dunaliella* apenas contribuem com uma pequena percentagem dessa cor (figura 2).



Figura 2. Salinas de Alcochete (onde a brancura do sal cristalizado contrasta com a cor vermelha da água dos cristalizadores).

Posteriormente, OREN, A., & RODRÍGUEZ – VALERA, F., 2001, reforçam a sua afirmação anterior e indicam que dois tipos de organismos ricos em carotenos são geralmente responsáveis por esta coloração, as Arque bactérias halofílicas da Família das *Halobacteriaceae* e a alga unicelular *Dunaliella salina*. Os principais pigmentos das *Halobacteriaceae* são carotenos C-50, enquanto que a *Dunaliella* acumula quantidade maciças

de  $\beta$  – caroteno em condições ambientais favoráveis. Recentemente foi reconhecido que uma porção significativa dos procarióticos presentes nos cristalizadores pertence ao domínio das Bactérias.

Todas as Halobactérias são ou estritamente aeróbias ou aeróbias facultativas, e possuem tempos de geração longos (3-4 horas para *Haloferax volcanii*; 8-12 horas para *Halobacterium sp.*). São químio – organotróficas e crescem em meios complexos (peptona ou extracto de fermento). Algumas (como por exemplo *Haloferax sp.*) podem crescer em meios com apenas um açúcar simples como fonte de carbono/energia (DYALL-SMITH, M., 2000).

### 1.1.3 Taxionomia

OREN, A., 1994, ao identificar as Halobactérias, considerou um número reduzido de Géneros. Segundo este autor, as Arque bactérias halofílicas não alcalifílicas foram agrupadas e identificadas em quatro Géneros: *Halobacterium*, *Haloferax*, *Haloarcula* e *Halococcus*. Mais recentemente, OREN, A., 2002, alarga esta classificação para 15 Géneros e 40 Espécies, devido ao facto de terem sido identificadas novas espécies.

OREN, A., & LITCHFIELD, C. D., 1999, salienta o facto de que entre os Géneros pertencentes à Família *Halobacteriaceae* o Género *Halobacterium* é o mais conhecido. *Halobacterium salinarum* foi a primeira Arqueobactéria halofílica descrita, e o Género *Halobacterium* tornou-se o género tipo da Família sendo o mais estudado, especialmente após a descoberta das propriedades únicas de uma bomba de protões activada por luz localizada na membrana púrpura. No passado foram descritas três espécies: *Halobacterium salinarum*, *Halobacterium halobium*, e *Halobacterium cutirubrum*. Isoladas de ambientes tão diferentes como o couro salgado de vaca e bacalhau curado. Análises comparativas de um grande número de isolados de Halobactérias demonstraram que todas são semelhantes nas propriedades, uma conclusão mais apoiada em por análises filogenéticas. Pensa-se que apenas uma espécie de *Halobacterium* é reconhecida: *Halobacterium salinarum*.

Halobactérias é um nome comum aplicado a Archaea (Arque bactérias) extremamente halofílicas, as *Halobacteriaceae*, que incluem cerca de 13 Géneros. A maioria é encontrada em lagos salgados e salinas (DYALL-SMITH, M., 2000).

#### 1.1.4 Cultura

VIEIRA, N., 1989, relembra que as bactérias halofílicas são organismos com características muito peculiares, vivendo em ecossistemas que se encontram temporariamente em esgotamento, os chamados ecossistemas forçados. A proliferação de bactérias é possível nestes meios, porque a evaporação, além de conduzir a um aumento espectacular do cloreto de sódio, conduz também a uma maior concentração de nutrientes orgânicos e inorgânicos, proporcionando aos organismos halófilos em meio bastante rico.

Segundo LEE, S. Y., et al., 1998, *Halobacterium halobium* (o mesmo que *Halobacterium salinarum*) é apenas cultivado em modo “batch”, e a densidade celular tipicamente obtida a 660nm era de 1-2 (correspondendo a uma concentração celular de 0,9-1,8g de peso seco celular por litro) em 3 a 5 dias.

Estes investigadores começaram por testar várias dietas de carbono/azoto e aminoácidos em cultura “batch” para avaliar a melhor. Concluíram que o extracto de levedura possui a relação carbono/azoto que proporciona um melhor crescimento celular e produção de bacteriorrodopsina. Após esse estudo, estes investigadores tentaram cultivar *H. halobium* em grandes densidades com elevada produção de bacteriorrodopsina em modo “batch” e num sistema de recirculação do meio (LEE, S. Y., et al., 1998).

DYALL – SMITH, M., 2000, descreve as condições de crescimento ideais das Halobactérias em laboratório:

- Sal – a concentração óptima de sal para o crescimento varia entres os diferentes Géneros de Halobactérias (entre 15% a 25%), mas a maioria crescerá em meio de 23% de sal total (peso por volume);
- Temperatura – apesar de viverem em águas naturais por todo o mundo, a maioria das estirpes crescem melhor entre 30 e 40°C, e algumas são ligeiramente termofílicas (50°C para *H. saccharovorum*);
- Arejamento – o oxigénio é um problema em meios com elevada concentração de sal (a solubilidade do oxigénio diminui com o aumento da salinidade), especialmente a temperaturas elevadas. Para crescimento em culturas líquidas, sugere-se o uso de um agitador rotativo a 200rpm e uma proporção de volume líquido/contentor de cerca de 1/3;
- pH - um pH neutro a ligeiramente alcalino parece ser o mais indicado para o crescimento das halobactérias não alcalifílicas;

- Crescimento anaeróbio – algumas estirpes apresentam crescimento fermentativo (supostamente *H. vallismortis*), e outras usam nitratos como aceitador de electrões alternativo. Fermentação de arginina já foi estudada em *H. salinarum*;
- Substrato – muitos membros do Género *Halobacterium* requerem meios complexos de crescimento, ou meios definidos com muitos aminoácidos. *Haloarcula* e *Haloferax sp.* podem crescer em meios definidos com açúcares simples (lactato, piruvato, glucose, glicerol).

## 1.2 ARTEMIA

A *Artemia* é um organismo cosmopolita, habitante das lagoas costeiras bem como de lagos interiores salgados. A sua distribuição não é contínua, estando as populações de facto isoladas em biótopos em climas tanto temperados como tropicais. Sabe-se também que as características ecológicas dos habitats de *Artemia* diferem grandemente (VANHAECKE, P. & SORGELOOS, P., 1980).

Os locais onde se encontra *Artemia*, estão distribuídos pelas zonas tropicais, subtropical e zonas temperadas. Ao longo das linhas de costa, bem como no interior do território, por vezes, a centenas de quilómetros do mar (PERSOONE, G. & SORGELOOS, P., 1980).

O isolamento geográfico das populações de *Artemia* resultou em várias estirpes geográficas. O número de populações diferentes de *Artemia* descritos até 1980 já excedia as 150. E estudos genéticos em 27 estirpes revelaram pelo menos 6 não inter – reprodutoras (VANHAECKE, P. & SORGELOOS, P., 1980).

De um ponto de vista bio geográfico, a Península Ibérica difere do resto da zona Paleártica devido à não ocorrência de formas bissexuais (AMAT, F., et al., 1995).

De particular nota, segundo AMAT F., et al., 1995, é a presença registada de populações de *A. franciscana* na Península Ibérica. Especialmente no sudoeste de Espanha (Huelva), oeste de Portugal (Lisboa, Aveiro) e sul de Portugal (Algarve), devido a inoculações indiscriminadas provavelmente pelas estações de Aquacultura. Nestas regiões, *A. franciscana* superou competitivamente outras estirpes de *Artemia*.

### 1.2.1 Morfologia

BROWNE, R. A., et al., 1991, apresentam uma síntese bastante rigorosa das principais características morfológicas da *Artemia*:

- Morfologia externa – o microscópio electrónico de varrimento revelou que o corpo da *Artemia* está revestido de numerosos pequenos espinhos não celulares e menos numerosas sedas projectadas a partir de elevações basais. Estas sedas estão ligadas a terminais nervosos;
- Tugmento – todo o corpo da *Artemia* é coberto por um exoesqueleto muito fino. Entre 0,3 e 1  $\mu\text{m}$  nos estados larvares e 1 a 7  $\mu\text{m}$  no estado adulto;
- Tecido conectivo – constituído por células que além de apresentarem importantes reservas lipídicas, também desempenham um papel na fagocitose;
- Sistema muscular – ligado por tendões ao endoesqueleto;
- Sistema circulatório – constituído por um sistema lacunar aberto com um coração dorsal (tubular) composto por uma única camada de células. As células sanguíneas são do tipo ameboide, formadas em pequenos nódulos existentes na base de cada membro do tronco;
- Sistema digestivo – não possui glândulas digestivas multicelulares e pode ser dividido em três regiões: um esófago curto logo a seguir à boca, que termina num intestino médio, este expande-se em duas bolsas, os cecos gástricos;
- Sistema nervoso – consiste num cérebro dorsal, ligações “circumesofágicas” e uma dupla fila ventral de pares de gânglios unidos longitudinalmente e lateralmente;
- Sistema sensorial – a *Artemia* possui dois olhos compostos bastante separados, encimando espinhos flexíveis. Possui ainda um olho meridional que constitui o único órgão óptico funcional nos náuplios, persistindo até no estado adulto, situando-se no centro anterior da cabeça;
- Sistema endócrino – composto por um sistema neuro secretor sem órgão de armazenamento;
- Sistema excretor – a excreção é realizada por dois pares de glândulas, as glândulas maxilares, que se mantêm funcionais nos adultos e por glândulas nas antenas, que apenas são funcionais nos primeiros estados do desenvolvimento;
- Sistema reprodutor masculino – o sistema reprodutor masculino estende-se desde o primeiro segmento genital até ao segundo ou terceiro segmento abdominal. É

constituído por um par de testículos, canais deferentes, glândulas acessórias e pênis;

- Sistema reprodutor feminino – o sistema reprodutor feminino consiste num par de ovários e oviductos conduzindo a um útero, onde abrem várias glândulas da casca;
- Células secretoras de sal – as células secretoras de sal estão localizadas nas guelras e parecem ser responsáveis pela excreção de sal em meios hipertônicos e a captação de sal em meios hipotônicos.

BROWNE, R. A., et al., 1991, apresentam ainda no seu trabalho, uma descrição apurada do desenvolvimento externo dos estádios larvares da *Artemia*. Assim, estes autores começam por evidenciar que esse desenvolvimento pode ser sumariado no sucessivo aparecimento dos apêndices do segmento maxilar, torácico, genital e abdominal. Apesar de não existir um consenso generalizado sobre o número de metamorfoses ou estádios de desenvolvimento, estes autores concordam com a divisão proposta por Schrehardt 1987, que para além de basear os seus estádios em observações realizadas ao microscópio electrónico de varrimento, procurou também apoiar estas divisões no esquema geral aceite para os *Euastracans*. Ou seja, um náuplio, quatro meta náuplios, sete pós meta náuplios e cinco estádios pós larvares (figuras 3 a 6).

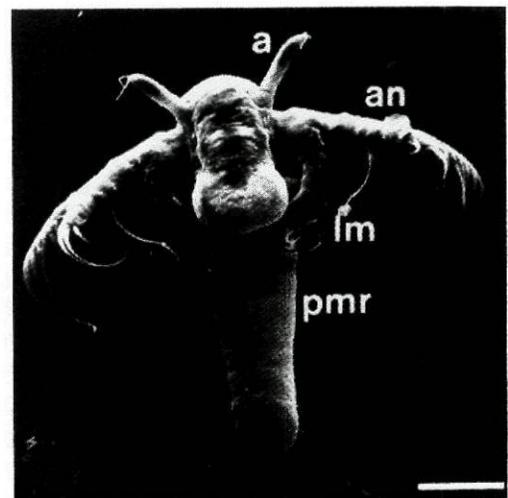
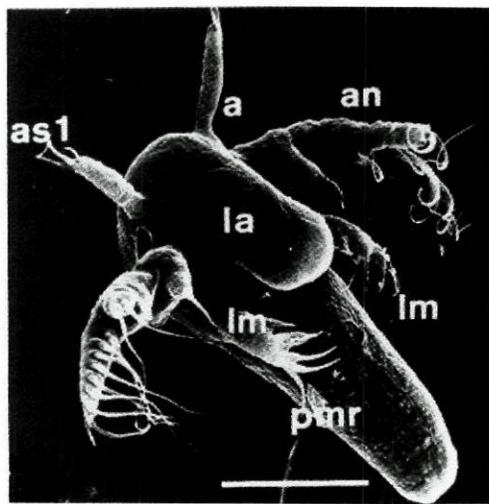


Figura 3 e 4. À esquerda, vista ventral de um náuplio, imediatamente antes da muda. À direita, vista ventral de um meta náuplio – I. (a) antenuela; (an) antena; (as1) antenuela tipo seta; (la) labrum; (lm) mandíbula larvar; (pmr) região pós mandibular; barra = 100 $\mu$ m (BROWNE, R. A., et al., 1991).

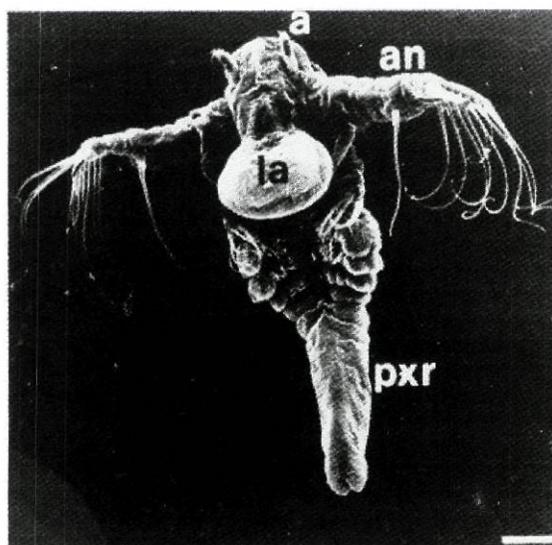


Figura 5. Vista ventral de um pós meta náuplio – I. (a) antenula; (an) antena; (la) labrum; (th) toracópodes; (pxr) região pós maxilar; barra = 100 $\mu$ m (BROWNE, R. A., et al., 1991).

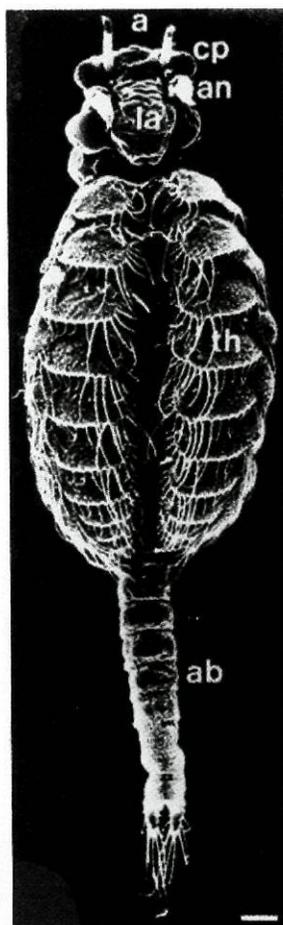


Figura 6. Vista ventral de um estágio pós larvar – I. (a) antenula; (ab) abdómen; (an) antena; (cp) olho composto; (fu) furca; (la) labrum; (th) toracópodes; barra = 100 $\mu$ m (BROWNE, R. A., et al., 1991).

FOX, R., 2001, apresenta uma ilustração bastante elucidativa sobre a morfologia externa da *Artemia* (figura 7).

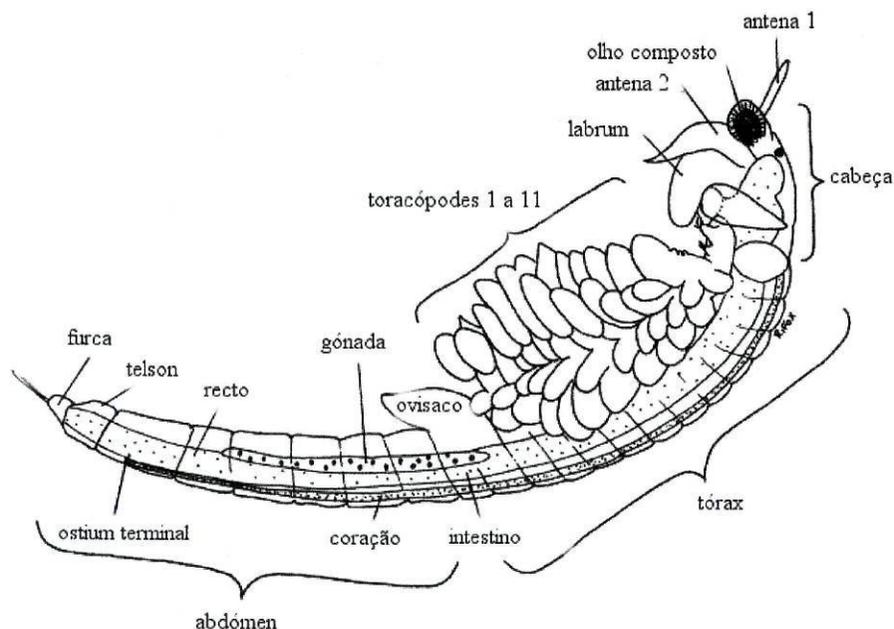


Figura 7. Fêmea adulta de *Artemia sp.* (FOX, R., 2001, modificada).

### 1.2.2 Fisiologia

A *Artemia* apresenta mecanismos de adaptação biológica muito variados. Além de um mecanismo de osmorregulação, possui pigmentos respiratórios (hemoglobinas) muito eficientes. Um terceiro mecanismo de adaptação ecológica é a sua capacidade de produzir quistos, assegurando assim a perpetuação da espécie (PERSOONE, G. & SORGELOOS, P., 1980).

A *Artemia* é um típico filtrador, ingerindo material particulado que pode variar entre alguns micrómetros até 50 micrómetros. O batimento dos toracópodes é contínuo, serve para o animal respirar e para se alimentar, por isso a *Artemia* alimenta-se continuamente (PERSOONE, G. & SORGELOOS, P., 1980).

DOBBELIER, J., et al., 1980, reforça esta ideia e afirma no seu trabalho que, quando comparada com os outros Crustáceos, *Artemia* apresenta um mecanismo de alimentação bastante primitivo, sendo de facto um filtrador contínuo, não selectivo e fagotrófico obrigatório.

Contudo, SAVAGE, A., & KNOTT B., 1998, afirma que *Artemia* é capaz de mudar os seus comportamentos alimentares. Tendo já sido observados comportamentos de raspagem dos fundos das salinas, dos nódulos de cianobactérias. Manton (1977) considera que a alimentação a partir da raspagem do substrato, uma condição primitiva nos crustáceos. Tendo depois esta estratégia sido desenvolvida ao mesmo tempo que ocorreu a evolução e adaptação. Consequentemente, a capacidade de se alimentar a partir do substrato, pode se ter mantido em organismos que funcionam predominantemente como filtradores. O inverso parece não ser energeticamente viável.

### 1.2.3 Taxionomia

TRIANANTAPHYLLIDIS, G. V., et al., 1997, efectuaram um estudo morfológico das populações de *Artemia* pertencentes a espécies bem conhecidas e compararam-nas com indivíduos de populações taxionomicamente por caracterizar. Recorrendo a análises de variáveis múltiplas procuraram construir uma matriz que ajudasse a classificar futuras amostras de origens desconhecidas ou taxionomicamente problemáticas. Com esse trabalho, estes investigadores conseguiram estabelecer quatro grupos distintos: o grupo *Artemia sp.*, o grupo *A. tunisiana*, o grupo *A. urmiana*, e um grupo maior que inclui populações do leste europeu.

### 1.2.4 Cultura

Na literatura aparecem citados inúmeros casos bem sucedidos de alimentação de náuplios até adultos com alimentos vivos e inertes. Contudo a maior parte destes ensaios são levados a cabo em pequena escala, pois em larga escala, culturas de algas vivas dificilmente poderiam ser utilizadas para alimentação (DOBBELIER, J. et al., 1980).

A sobrevivência e o valor nutricional da *Artemia* são importantes pois esta espécie é usada extensivamente em aquacultura como dieta para peixes e invertebrados (JOHNSON, D. A., 1980). Na década de 80, devido ao desenvolvimento da aquacultura, a procura de mercado atingia 35 a 40 toneladas por ano (DWIVEDI, S. N., et al., 1980).

O tamanho das partículas que os náuplios de *Artemia* podem ingerir ronda os 25 a 30  $\mu\text{m}$  e os adultos entre 40 a 50  $\mu\text{m}$  (DOBBELIER, J. et al., 1980).

JOHNSON, D. A., 1980 salienta ainda que, não só o tipo de alimento como a concentração do mesmo é importante para otimizar o crescimento. REEVE (1963) obteve um máximo de eficiência de crescimento para concentrações de algas de 25 – 35 células/ml, pois em concentrações elevadas (aproximadamente 5000 células/ml) o alimento passa tão rapidamente pelo intestino que pode conduzir a estados de subnutrição por excesso de comida.

VIEIRA, N., 1989, explica muito detalhadamente os dois tipos de cultura, extensiva e intensiva, de *Artemia*.

A cultura intensiva é feita em laboratório, em tanques especiais, “race ways”, com ou sem renovação de água, e a extensiva em tanques de água salgada, geralmente em antigas salinas.

Enquanto que na cultura extensiva não há um controlo das condições de desenvolvimento, e conseqüentemente a produção é variável e geralmente baixa, na cultura intensiva, as condições são controladas e, conseqüentemente, a produção é superior.

A cultura intensiva pode fazer-se em circuito aberto ou fechado. No primeiro caso, podem desenvolver-se sistemas em que há aproveitamento da produtividade induzida no próprio sistema, mediante regularização dos níveis de nutrientes.

No segundo caso, o alimento, sob a forma de suspensão de microalgas, resíduos agrícolas ou industriais, é fornecido continuamente.

Ainda que os sistemas de cultura intensiva possam apresentar progresso sob o ponto de vista tecnológico, com o objectivo de uma maior produtividade, parece que a sua eficácia não é a mesma para as diferentes estirpes.

O problema mais delicado é o da alimentação. *Artemia* é um organismo filtrador não selectivo e com tal, pode alimentar-se de produtos muito variados, como por exemplo organismos vivos (microalgas, leveduras, protozoários e bactérias). A única condicionante relativamente a qualquer alimento, é a dimensão das partículas, que devem ter um tamanho adequado, de modo a que os toracópodes as possam captar.

BARATA, C., et al., 1996, são bastante objectivos quando afirmam que *Artemia* é usada extensivamente em aquacultura, como alimento vivo de peixes.

BROWN, M. R., et al., 1997, salienta que micro algas cultivadas em grande escala são a principal fonte de alimento para larvas e juvenis de bivalves, e para larvas de alguns crustáceos e espécies marinhas de peixes. São ainda a principal dieta do zooplâncton usado como alimento para juvenis de alguns crustáceos e peixes marinhos. As micro algas usadas como alimento para larvas possuem normalmente um tamanho entre 2 a 20µm.

BROWN, M. R., et al., 1997, determinaram a composição bioquímica de mais de 40 espécies de micro algas da coleção CSIRO, úteis ou potencialmente úteis para uso em aquacultura. Representantes dos principais grupos foram examinados: diatomáceas, primnesiófitas, prasinófitas, clorófitas, eustigmatófitas, criptomonas e rodófitas.

As larvas de quase todas as espécies de peixes marinhas e de muitas espécies de peixes dulciaquícolas necessitam de organismos plânctônicos vivos como primeiro alimento. Os quistos descapsulados de *Artemia* apresentam algumas vantagens sobre as dietas artificiais porque combinam as propriedades físicas de um alimento artificial seco e o valor nutricional dos náuplios vivos de *Artemia*. Contudo, esta hipótese pode ser questionada uma vez que a qualidade da descapsulação dos quistos poder afectar o valor nutricional dos mesmos (GARCÍA - ORTEGA, A., et al., 1998).

Desde que Seale (1933) descobriu que os náuplios recém eclodidos de *Artemia sp.* eram um alimento vivo adequado para os peixes, ocorreu um aumento do interesse neste crustáceo para aquacultura. Os náuplios de *Artemia* são um dos alimentos vivos mais utilizados na alimentação de larvas de peixes marinhos e crustáceos. Aumentando por isso a procura por parte das aquaculturas de biomassa de *Artemia* (NAEGEL, L. C. A., 1999).

A produção artificial de biomassa de *Artemia* requer grandes quantidades de alimento de boa qualidade. *Artemia* alimentada com micro algas vivas como por exemplo, *Dunaliella*, *Isochrysis* e *Chaetoceros* são usadas frequentemente. Também micro algas secas como por exemplo, *Spirulina* e *Scenedesmus* foram usadas com sucesso. Contudo, a produção de algas unicelulares é laboriosa e constitui o principal constrangimento para a aquacultura. Como substitutos para as micro algas tem sido usados; bactérias, fermento de padeiro, farinha de soja, arroz e trigo. Infelizmente estes substitutos não estão facilmente disponíveis e nem sempre apresentam um valor nutricional consistente (NAEGEL, L. C. A., 1999).

Para, ZMORA, O., et al., 2002, a produção de biomassa de *Artemia* adquiriu renovado interesse por duas razões: os aquariofilistas de peixes ornamentais perceberam que o alimento vivo pode melhorar o desempenho em termos de crescimento e aumento da longevidade; e os problemas de fornecimento de náuplios recém eclodidos pode ser resolvido com recurso a outros estados de desenvolvimento de *Artemia*.

### 1.2.5 Culturas enriquecidas

*Artemia* é um micro crustáceo usado frequentemente em aquacultura. Este micro crustáceo pode crescer alimentando-se de uma mistura de espécies de micro algas, bem como de uma única micro alga, como por exemplo *Tetraselmis suecica*. A composição bioquímica da micro alga pode ser modificada com base nos nutrientes utilizados no meio de cultura (FÁBREGAS, J., et al., 1996).

O óleo orbital de atum (TOO) provou ser um eficiente óleo de enriquecimento dos náuplios de *Artemia*, devido aos níveis elevados de ácido docosahexanóico (DHA) e de ácido eicosapentanóico (DHA:EPA) (MCEVOY, A., et al., 1997).

ESTÉVEZ, A., et al., 1998, aponta para o facto de a produção de larvas ser o principal estrangulador na cultura de espécies de peixes marinhos. Os peixes marinhos produzem números muito elevados de muito pequenas e vulneráveis larvas que são muito susceptíveis ao stress ambiental e subnutrição, experimentando elevadas mortalidades no meio natural. Os aquacultores marinhos dependem há muitos anos da produção de alimento vivo para alimentar as suas larvas. Apesar da sua muito conhecida deficiência em ácidos gordos polinsaturados (PUFA), os náuplios de *Artemia* e os rotíferos têm sido amplamente usados como alimento vivo pois são facilmente cultiváveis e prontos a usar. Por isso é prática corrente o enriquecimento de rotíferos e náuplios de *Artemia* com n-3 PUFA recorrendo a soluções comerciais de óleos, micro algas seleccionadas, produtos micro encapsulados e produtos derivados de algas.

KOLKOVKI, S., et al., 2000, relembra que os náuplios de *Artemia* podem ser oferecidos simples ou enriquecidos com nutrientes essenciais. Os enriquecimentos providenciam elevados níveis de fosfolípidos contendo ácidos gordos muito insaturados (HUFA), especialmente o ácido eicosapentanoico (EPA, 20:5 n-3) e ácido docosahexanoico (DHA, 22:6 n-3). Náuplios de *Artemia* com este tipo de enriquecimentos são usados frequentemente na alimentação de larvas de peixes marinhos, pois aumentam o seu crescimento e sobrevivência.

No entanto, OLSEN, A., I., et al., 2000, afirma que a composição bioquímica de *Artemia sp.* não é estável após o enriquecimento. Perdas de nutrientes podem ocorrer se o alimento vivo não for fornecido às larvas imediatamente depois do enriquecimento, ou se a presa permanece muito tempo no tanque das larvas. O ácido docosahexanóico (DHA, 22:6 n-

3) é particularmente instável em *Artemia sp.*, tendo sido já verificadas perdas de 72% em náuplios que permaneceram 24h após o enriquecimento a 12°C.

Apesar da investigação desenvolvida sobre a composição em ácidos gordos dos quistos e náuplios de diferentes populações de *Artemia*, a questão sobre os factores que condicionam a presença de um determinado perfil de ácidos gordos permanece por esclarecer. De um modo geral, a composição do alimento disponível no meio, desempenha um papel chave na presença de um determinado perfil de ácidos gordos nos quistos, NAVARRO, J. C., et al., 2002.

### 1.3 Objectivos

Ao longo da revisão bibliográfica efectuada, surgiram várias questões. A primeira deve-se ao facto de se ter constatado que as necessidades industriais de *Artemia*, quer sob a forma de náuplios, quer sob a forma de adultos, ter aumentado. A segunda à preocupação em enriquecer sob o ponto de vista nutricional este organismo. Conseguir-se-á assim um alimento em quantidades suficientes e com qualidade nutricional elevada, para estações de aquacultura.

Tomando em consideração este facto, propusemos avaliar uma dieta alimentar para *Artemia sp.*, que contemplasse em primeiro lugar a obtenção de uma elevada taxa de sobrevivência e em segundo lugar, indivíduos adultos de dimensões adequadas e presumível valor nutricional elevado.

Os principais estudos sobre dietas alimentares para *Artemia*, concentram-se em dietas à base de alimentos inertes, ou, em ensaios de pequena escala, alimento vivo, especialmente micro algas. Contudo, recentemente, o esforço de investigação parece estar voltado para Arque bactérias Halofílicas (Halobactérias), por em meio natural, ser um dos principais alimentos da *Artemia*. Estes estudos parecem indicar que estas Halobactérias são uma fonte bastante rica de nutrientes (OREN, A., & RODRÍGUEZ – VALERA, F., 2001).

Tendo estes factos em consideração, os objectivos deste trabalho foram:

- Avaliar diferentes meios de cultura de Halobactérias;
- Testar a hipótese de obter um meio de cultura enriquecido para Halobactérias;
- Avaliar diferentes dietas alimentares para o desenvolvimento de *Artemia sp.*, utilizando Halobactérias e micro algas.

Por isso, este trabalho encontra-se dividido em duas partes. Uma primeira parte dedicada à análise dos diferentes meios de cultura para Halobactérias. E uma segunda parte dedicada ao estudo comparado de diferentes dietas alimentares para *Artemia sp.*. Na segunda parte foram realizados dois ensaios, no primeiro foram avaliadas cinco dietas alimentares, o segundo ensaio consistiu na introdução de uma nova dieta alimentar.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MEIOS DE CULTURA

DYALL-SMITH, M., 2000, refere os aspectos mais importantes a ter em conta para proporcionar as melhores condições de crescimento às Halobactérias. Assim, seguindo as suas recomendações o primeiro meio de crescimento por nós utilizado continha 250‰ de NaCl por litro. A temperatura foi mantida a 37°C durante todo o ensaio, recorrendo para isso a uma estufa (HERAEUS T-5042). O oxigénio é um problema em meios com elevada concentração de sal, por isso, para o crescimento em culturas líquidas, recorreremos a uma proporção de volume líquido/contentor de cerca de 1/3. O pH do meio de cultura (lido com recurso a WTW MULTILINE F/SET-3) foi corrigido para 7,0 com recurso a solução tampão de NaOH.

Para avaliar o desenvolvimento das culturas, recorreremos a um espectrofotómetro (HITACHI 150-20). As leituras realizaram-se a 520nm, comprimento de onda próximo da absorção da bacteriorrodopsina (pigmento de cor vermelha) produzida pelas Halobactérias durante o seu desenvolvimento. Este comprimento de onda ainda possui a vantagem de ser próximo do comprimento de onda para o qual as células apresentam maior absorvância (400 – 500nm). Os registos foram efectuados de 3 em 3 ou de 4 em 4 dias, estando as culturas fora da estufa apenas o tempo necessário para proceder às leituras.

Para o crescimento de Halobactérias os meios utilizados foram:

- Meio simples MS250‰;
- Meio complexo MC156‰;
- Meio complexo MC250‰;
- Meio enriquecido ME250‰.

Para o caso concreto do meio de crescimento simples (MS250‰), começamos por pesar 62,5g de cloreto de sódio, NaCl (MERCK 06404). Depois adicionamos este NaCl a 250mL de água destilada à temperatura ambiente (aproximadamente 21°C). Recorrendo a uma vareta de vidro dissolvemos o sal totalmente. Em seguida pesamos 0,25g de fermento de padeiro industrial (obtido numa pastelaria local) e adicionamos aos 250mL de água destilada, onde previamente tinham sido dissolvidas as 62,5g de NaCl. Deste modo, obtivemos um meio de crescimento para Halobactérias, que continha, por litro, uma concentração de sal de 250g e

1g de fermento de padeiro industrial. Este meio passou a ser designado por meio de crescimento simples (MS250‰), uma vez que possuía apenas fermento de padeiro industrial como fonte de carbono e energia para as Halobactérias.

Após a preparação do meio de crescimento simples (MS250‰), foram distribuídos 50mL de meio por vários matrasses. Em metade foi inoculada 1mL de cultura stock de *Halobacterium salinarum* (gentilmente cedida pelo Instituto Torre del Sal, Castellon) e na outra metade não foi realizado qualquer tipo de inóculo. Todos os matrasses, contendo MS250‰ com e sem inóculo, foram colocados numa estufa a 38°C e periodicamente (de 3 em 3 ou 4 em 4 dias) eram retirados apenas o tempo necessário para se proceder a leitura e registo das absorvâncias a 520nm.

Este ensaio durou 25 dias, tendo sido atingido o valor máximo de absorvância ao fim de 18 dias.

Posteriormente, 1mL retirado da cultura em meio de crescimento simples (MS250‰), foi inoculado em placas de marine agar. Essas placas foram mantidas (numa estufa) na obscuridade a 38°C, durante 3 a 4 dias. Após esse período de incubação foram registadas colónias brancas de contornos regulares. Uma amostra dessas colónias, observada ao microscópio óptico composto (NIKON SE, oculares NIKON CFWE 10X/18 e objectivas, NIKON E4/0,10, E10/0,25, E40/0,65 e E100/1,25 oil), revelou que estas eram constituídas por numerosas células esféricas (cocos), sem mobilidade e tamanho entre 0,4 e 0,6µm (medido com recurso a uma ocular micrométrica NIKON). Foi depois realizada uma coloração de Gram, para determinar a natureza da parede celular.

As placas de marine agar foram preparadas conforme as recomendações do fabricante (BACTO™ MARINE AGAR 2216, DIFCO 212185). Ou seja, 55,1g de marine agar foram totalmente dissolvidas em 1L de água destilada, recorrendo a uma vareta de vidro e aquecimento em placa térmica (HEIDOLPH MR-82). Posteriormente, este preparado é levado ao autoclave (AJC 280L, 4500W) durante 30 minutos e 120°C e pressão de 2Atm. Após o arrefecimento parcial do volume, este foi distribuído por placas de petri. Esta operação decorreu no interior de uma câmara de fluxo laminar (EHRET Reinraumtechnik, ET 130V/UV).

A coloração de Gram foi realizada de acordo com as indicações de coloração de halobactérias para exame ao microscópio óptico (DYALL-SMITH, M., 2000).

Os organismos foram primeiramente re – suspensos num meio estéril de 20% de sal, mexendo vigorosamente para homogeneizar a cultura, que geralmente é bastante viscosa. Depois espalhou-se um bocado desta suspensão numa lâmina limpa. Deixou-se secar ao ar,

sendo de seguida fixado e dessalinizado por imersão em 2% de ácido acético durante 5 minutos. Depois foi removido e seco sem lavar. A seguir o precipitado foi coberto com 0,25% de solução aquosa de violeta cristal, durante 3 minutos. Depois de lavada e seca a lâmina estava pronta para ser observada.

Obtiveram-se duas amostras de águas das salinas de Rio Maior. Foram realizados três inóculos (de 0,1mL) de cada amostra em placas de marine agar. Estas placas foram mantidas (numa estufa) na obscuridade a 38°C, durante 3 a 4 dias. Após esse período de incubação foram registadas colónias circulares brancas de contornos mais ou menos regulares e colónias circulares vermelhas de contornos perfeitamente regulares. As colónias brancas e vermelhas apresentavam dimensões que variavam entre os 0,5 e os 3,0mm.

As colónias vermelhas foram isoladas por repicagem em novas placas de marine agar, incubadas e mantidas em estufa a 38°C.

Segundo OREN, A., 1994 e OREN, A., & RODRÍGUEZ – VALERA, F., 2001, preparou-se o meio de cultura para diferentes membros da Família *Halobacteriaceae* (MC156‰).

Iniciamos a preparação do meio por pesar 156g de NaCl (MERCK 06404), 20g de MgSO<sub>4</sub> (MERCK 05885), 13g MgCl<sub>2</sub> (MERCK 05833), 4g de KCl (MERCK 04936), 1g de CaCl<sub>2</sub> (MERCK 02083), 2g de NH<sub>4</sub>Cl (MERCK 01145), 0,2g de NaHCO<sub>3</sub> (MERCK 06329), 0,5g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (MERCK 04873), 10g de Glucose (MERCK 08337), 10g de extracto de fermento Bacto (BACTO™ YEAST EXTRACT, DIFCO, 212750) e 0,005g de FeCl<sub>3</sub> (MERCK 03945). Os valores indicados dizem respeito à preparação de 1000mL de meio. Depois medimos 250mL de água destilada, à qual foram adicionados as quantidades respectivas de sais. Com recurso a uma vareta de vidro e a um ligeiro aquecimento por placa térmica, os sais foram totalmente dissolvidos. O pH do meio de cultura foi corrigido para 7,0 com recurso a solução tampão de NaOH. Este meio de crescimento passou a ser designado por meio de cultura para diferentes membros da Família *Halobacteriaceae* (MC156‰).

Após a preparação do meio de crescimento complexo (MC156‰), foram distribuídos 50mL de meio por vários matrasses. Em metade foi inoculada uma colónia de Halobactérias vermelhas (obtida por isolamento das amostras das salinas de Rio Maior, conforme descrito anteriormente) e na outra metade não foi realizado qualquer tipo de inóculo. Todos os matrasses, contendo MC156‰ com e sem inóculo, foram colocados numa estufa a 38°C e periodicamente (de 3 em 3 ou 4 em 4 dias) eram retirados apenas o tempo necessário para se proceder a leitura e registo das absorvâncias a 520nm.

Este ensaio durou 28 dias, tendo sido atingido o valor máximo de absorvância ao fim de 21 dias.

Posteriormente, 1mL retirado da cultura em meio de crescimento complexo (MC156‰), foi inoculado em placas de marine agar. Essas placas foram mantidas (numa estufa) na obscuridade a 38°C, durante 3 a 4 dias. Após esse período de incubação foram registadas numerosas colónias brancas e vermelhas de contornos regulares. Uma amostra das colónias brancas, observada ao microscópio óptico composto, revelou que estas eram constituídas por numerosas células esféricas (cocos), sem mobilidade e com tamanho entre 0,4 e 0,6µm (medido com recurso a uma ocular micrométrica NIKON). Foi depois realizada uma coloração de Gram, para determinar a natureza da parede celular. Uma amostra das colónias vermelhas, observada ao microscópio óptico, revelou que estas colónias eram constituídas por numerosas células em forma de bastonete, com relativa mobilidade e tamanho entre 1 a 4µm (medido com recurso a uma ocular micrométrica NIKON).

Mais ou menos paralelamente a este ensaio decorreu um outro ensaio em que utilizamos um meio designado para o crescimento de *Halobacterium halobium* e *H. salinarum* (MC250‰), tivemos em consideração as indicações propostas por OREN, A., 1994 e por OREN, A., & RODRÍGUEZ – VALERA, F., 2001.

Iniciamos a preparação do meio por pesar 250g de NaCl (MERCK 06404), 5g de KCl (MERCK 04936), 5g MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (MERCK 05833), 5g de NH<sub>4</sub>Cl (MERCK 01145), 5g de extracto de fermento Bacto (BACTO™ YEAST EXTRACT, DIFCO 212750). Depois medimos 1000mL de água destilada, à qual foram adicionados as quantidades de sais atrás descritas. Com recurso a uma vareta de vidro e a um ligeiro aquecimento por placa térmica, os sais foram totalmente dissolvidos. O pH do meio de cultura foi corrigido para 7,0 com recurso a solução tampão de NaOH. Este meio de crescimento passou a ser designado por meio de crescimento complexo designado para o crescimento de *Halobacterium halobium* e *H. salinarum* (MC250‰).

Após a preparação do meio de crescimento complexo (MC250‰), foram distribuídos 50mL de meio por vários matrasses. Em metade foi inoculada uma colónia de Halobactérias vermelhas (obtida por isolamento das amostras das salinas de Rio Maior, conforme descrito anteriormente) e na outra metade não foi realizado qualquer tipo de inóculo. Todos os matrasses, contendo MC250‰ com e sem inóculo, foram colocados numa estufa a 38°C e

periodicamente (de 3 em 3 ou 4 em 4 dias) eram retirados apenas o tempo necessário para se proceder a leitura e registo das absorvâncias a 520nm.

Este ensaio durou 56 dias, tendo sido atingido o valor máximo de absorvância ao fim de 50 dias.

Posteriormente, 1mL retirado da cultura em meio de crescimento simples (MS250‰), foi inoculado em placas de marine agar. Essas placas foram mantidas (numa estufa) na obscuridade a 38°C, durante 3 a 4 dias. Após esse período de incubação foram registadas colónias vermelhas de contornos regulares. Uma amostra dessas colónias, observada ao microscópio óptico composto, revelou que estas eram constituídas por numerosas células de forma alongada (bastonetes), com mobilidade e tamanho entre 1 e 4µm (medido com recurso a uma ocular micrométrica NIKON). Foi depois realizada uma coloração de Gram, para determinar a natureza da parede celular.

Após verificação da viabilidade dos diferentes métodos, o meio designado para o crescimento de *Halobacterium halobium* e *H. salinarum* (MC250‰), revelou ser o mais eficaz para a obtenção de uma cultura de Halobactérias vermelhas em quantidade e com qualidade suficiente.

Obeve-se uma amostra de água dos cristalizadores das salinas de Aveiro, acondicionada num frasco de polietileno de 2L, préviamente esterilizado. Essa amostra apresentava uma coloração vermelha, indicadora da presença de Halobactérias. Foram realizadas medições de pH (7,66), temperatura (24°C), salinidade (252,5‰) e oxigénio dissolvido (36%, 3,00mg/L), com recurso a um WTW MULTILINE F/SET-3, no laboratório.

Como um dos nossos objectivos era obter um meio de crescimento bastante favorável e se possível algo selectivo, foram seguidas as indicações de OREN, A., & RODRÍGUEZ – VALERA, F., 2001, que referem as vantagens da utilização de meios enriquecidos na promoção de crescimento de Halobactérias. Também seguimos a sugestão de VIEIRA, N., 1989, que refere o facto da evaporação, além de conduzir a um aumento do cloreto de sódio, conduz também a uma maior concentração de nutrientes orgânicos e inorgânicos, proporcionando um meio bastante rico aos organismos halófilos.

Assim, começamos o trabalho utilizando água dos cristalizadores das salinas de Aveiro que foi esterilizada por ultra filtração com recurso a um filtro em fibra de vidro

WHATMAN GF/C, como meio de enriquecimento para culturas de bactérias das salinas de Rio Maior (colónias já anteriormente obtidas).

Preparámos, então, um meio enriquecido (ME250‰) contendo 40mL de água dos cristalizadores ultra filtrada e 10mL de meio de cultura complexo MC250‰. Estes matrises foram inoculados com um colónia de Halobactérias vermelhas (obtida por isolamento das amostras das salinas de Rio Maior, conforme descrito anteriormente). Como controlo utilizamos matrises contendo 50mL de água dos cristalizadores ultra filtrada, com inóculo de um colónia de Halobactérias vermelhas.

Ambas as culturas foram colocadas numa estufa a 38°C e periodicamente (de 3 em 3 ou de 4 em 4 dias) eram retirados apenas o tempo necessário para se proceder a leitura e registo das absorvâncias a 520nm. Deste modo, poderíamos avaliar se o eventual aumento de um tipo particular de Halobactérias vermelhas, estava relacionado ou não, com a utilização do meio MC250‰ enriquecido com água dos cristalizadores.

Este ensaio durou 25 dias para as culturas contendo apenas água ultra-filtrada dos cristalizadores. Pois, ao longo deste tempo as leituras não apresentaram grandes variações de absorvância a 520nm. Para as culturas contendo 40mL de água ultra-filtrada dos cristalizadores e 10mL de meio de cultura complexo MC250‰, o ensaio decorreu durante 57 dias, tendo sido atingido o valor máximo de absorvância ao fim de 47 dias.

Posteriormente, 1mL retirado da cultura em meio de crescimento complexo enriquecido, foi inoculado em placas de marine agar. Essas placas foram mantidas (numa estufa) na obscuridade a 38°C, durante 3 a 4 dias. Após esse período de incubação foram registadas numerosas colónias vermelhas de contornos regulares. Uma amostra das colónias vermelhas, observada ao microscópio óptico, revelou que estas colónias eram constituídas por numerosas células em forma de bastonete, com relativa mobilidade e tamanho entre 1 a 4µm (medido com recurso a uma ocular micrométrica NIKON).

## 2.2 DIETAS

Após a selecção do meio de cultura de Halobactérias, iniciámos a cultura de *Artemia sp.*, utilizando a micro alga *Tetraselmis suecica* para o controlo, por ser esta a mais utilizada (valor nutricional elevado) para a cultura de *Artemia sp.* Mais concretamente, o nosso objectivo era avaliar o crescimento e sobrevivência de náuplios de *Artemia sp.* alimentados

com uma dieta de *Tetraselmis suecica*, comparativamente com uma outra dieta, composta por Halobactérias vermelhas, cultivadas em meio de cultura enriquecido MC250‰.

Para o procedimento de incubação dos quistos de *Artemia sp.* (SUPREME 99 ARTEMIA FRANCISCANA CYSTS), recorreremos a um recipiente cônico invertido, com entrada de ar forçado por bomba (AQUAEL TYP APR-200). De seguida, colocámos 1g de quistos de *Artemia sp.*, em 1,5L de água destilada com 35‰ de salinidade. Este recipiente foi colocado num banho-maria a 25°C (GFL D-3006), para aumentar a taxa de eclosão dos náuplios, com luz contínua fornecida por lâmpada incandescente de 60W (710 lúmen), durante todo o período de incubação.

Após 48h, o arejamento foi desligado e o recipiente foi parcialmente coberto, de modo a que apenas a parte próxima da entrada de ar estivesse iluminada. Conseguindo-se que os náuplios recém eclodidos se deslocassem para o fundo do recipiente, permanecendo os quistos por eclodir à superfície da água, na zona escurecida do recipiente. Deste modo, os náuplios recém eclodidos foram retirados para um matrás de 1L.

Esse matrás foi envolvido parcialmente num pano preto e com recurso a uma pipeta, foram realizadas 10 amostragens com 2mL de volume. Os náuplios obtidos nessas amostragens foram contados para determinar o valor médio amostrado por mL e medidos com recurso a uma lupa binocular equipado com ocular micrométrica 30x (NIKON SMZ-1 0,7-3x, oculares NIKON 10X/21). Foram colocados em média 240 náuplios de *Artemia sp.* em cada frasco (figura 8).

Para cada dieta ensaiada foram preparados 3 frascos com 2L de água destilada com 35‰ de salinidade. Estes frascos foram colocados numa sala com temperatura entre 24° – 26°C e fotoperíodo variável entre 6 a 8h de luz.



Figura 8. Vista geral do esquema dos diferentes frascos de vidro utilizados durante este ensaio.

As dietas utilizadas foram:

Dieta A – 5mL diários de meio de cultura enriquecido ME250‰ (usada como controlo da DIETA D);

Dieta B – 5mL diários de água destilada usada para a preparação das diferentes dietas (usada como branco para este ensaio);

Dieta C – um inóculo inicial de 20mL de cultura de *Tetraselmis suecica* (usada com controlo para a DIETA E);

Dieta D – 5mL diários de solução stock de cultura de Halobactérias vermelhas em meio enriquecido ME250‰;

Dieta E – 5mL diários de solução stock de cultura de *T. suecica*;

Dieta F – 2,5mL diários de solução stock de cultura de Halobactérias vermelhas em meio enriquecido ME250‰ + 2,5mL diários de solução stock de cultura de *T. suecica*.

As soluções stock de cultura de Halobactérias vermelhas e *Tetraselmis suecica* eram preparadas a partir das culturas originais (com densidades ópticas de 1,000 a 660nm), diluídas em água destilada a 35‰ de salinidade. Esta diluição era realizada para diminuir a densidade celular por mL das dietas e para, no caso particular da cultura stock de Halobactérias vermelhas, reduzir a salinidade da respectiva dieta. O mesmo procedimento era utilizado no caso do meio de cultura enriquecido ME250‰.

Após terem sido colocados aproximadamente os 240 náuplios de *Artemia sp.* em cada um dos frascos, estes eram alimentados diariamente (com excepção de alguns Sábados e todos os Domingos) com as respectivas dietas alimentares.

De 3 em 3 ou de 4 em 4 dias, foram realizadas 10 amostragens de modo a determinar o número de indivíduos com recurso a uma pipeta de 20mL.

De 7 em 7 dias, os indivíduos amostrados eram medidos.

A experiência durou 21 dias e terminou quando o número de indivíduos em pelo menos uma das dietas alimentares era de tal modo reduzido que não permitia uma amostragem válida.

A dieta F foi baseada nas indicações de DOBBELIER, J., et al., 1980, JOHNSON, D. A., 1980 e NAEGEL, L. C. A., 1999, e foi unicamente utilizada no segundo ensaio por nos ter parecido que o uso isolado de bactérias não era um substrato alimentar suficiente, talvez porque no meio natural existem determinados requisitos nutricionais que não aparecem quando as bactérias estão isoladas.

Neste segundo ensaio foram colocados em média 200 náuplios de *Artemia sp.* em cada um dos frascos, e eram alimentados diariamente (com exceção de alguns Sábados e todos os Domingos) com as respectivas dietas alimentares.

De igual modo, de 3 em 3 ou de 4 em 4 dias, foram realizadas 10 amostragens de modo a determinar o número de indivíduos com recurso a uma pipeta de 20mL.

De 7 em 7 dias, os indivíduos amostrados eram medidos.

O ensaio durou 14 dias e terminou quando o número de indivíduos em pelo menos uma das dietas alimentares era de tal modo reduzido que não permitia uma amostragem válida.

Todos os dados respeitantes a este trabalho foram anotados no caderno de registos de laboratório. Posteriormente, estes dados transferidos para o MICROSOFT ECXEL 2000.

Os resultados foram tratados estatisticamente através de uma análise de variância (ANOVA), após se ter verificado que todos os pressupostos estavam respeitados.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura de Halobactérias são muito diversos, mas todos contém uma quantidade de sal elevada e uma fonte de carbono e energia. Sabendo da exigência das Halobactérias, em termos de complexidade do meio, ensaiámos um meio relativamente simples, composto apenas por água destilada, NaCl, de modo a aumentar a salinidade do meio e fermento de padeiro industrial, para servir como fonte de carbono e energia.

Decorridos 25 dias de monitorização das culturas mantidas ao abrigo da luz, em estufa a 38°C, obtivemos os resultados que se encontram na figura 9, onde estão representadas as absorvâncias médias lidas a 520nm das culturas ensaiadas. Sendo uma delas relativa às médias das amostras com meio de cultura simples (MS250‰), inoculado com cultura líquida de Halobactérias, gentilmente cedida pelo Instituto Torre del Sal, Castellon. E outra relativa a um controlo realizado com amostras de meio de cultura MS250‰ sem inóculo. Registam-se ainda os desvios padrão das amostras sob a forma de semi rectas verticais.

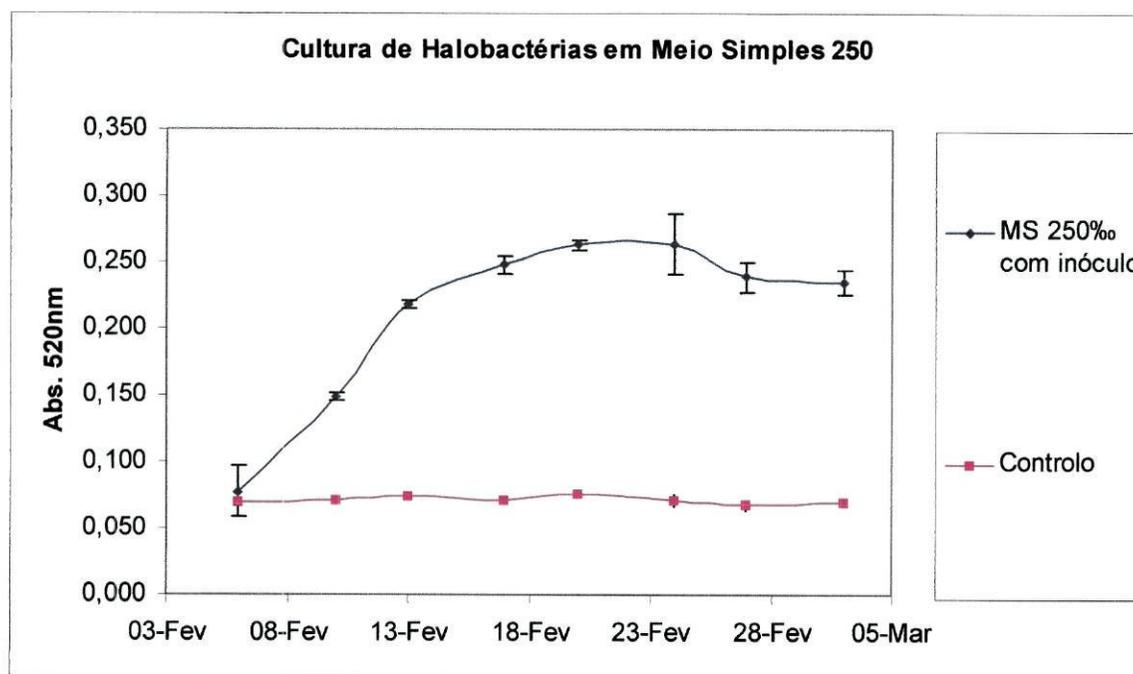


Figura 9. Evolução da absorvância média a 520nm das duas culturas.

Podemos visualizar no gráfico da figura 9 que a partir do 4º dia de ensaio (10 de Fevereiro), as duas culturas apresentavam diferenças na absorvância. Para verificar que essa diferença era significativa ao longo de todo o ensaio, realizámos uma análise de variância (ANOVA tipo I) aos valores de absorvância das duas culturas. Deste modo poderíamos com apenas 5% de possibilidade de aceitar uma hipótese falsa ( $H_0$ ) como verdadeira (erro do tipo 2), concluir acerca da diferença entre as duas culturas (tabela 1).

Tabela 1. Valores obtidos durante a Análise de Variância do Tipo I, realizada às duas culturas ensaiadas.

**De 06 Fevereiro até 24 Fevereiro**  
**ANOVA: Factor único**

**SUMÁRIO**

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
MS 250‰	12	2,437	0,203083	0,005224
CNT	12	0,867	0,07225	8,2E-06

**ANOVA**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>Valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,1027042	1	0,102704	39,26194	2,63E-06	4,300944
Dentro de grupos	0,0575492	22	0,002616			
Total	0,1602533	23				

Como obtivemos um valor de F (39,26194) superior ao valor do F crítico (4,300944), podemos com 95% de certeza rejeitar a hipótese  $H_0$  (as amostras foram retiradas de populações normalmente distribuídas com médias e variâncias iguais) e aceitando  $H_1$  (assumindo que as populações possuem variâncias iguais e por isso as amostras são retiradas de populações com diferentes médias) afirmar que ao longo deste ensaio, a cultura MS250‰ com inóculo de Halobactérias é significativamente diferente da cultura MS250‰ sem inóculo de Halobactérias.

Posteriormente, 1mL retirado da cultura em meio simples (MS250‰), foi inoculado em placas de marine agar. Essas placas foram mantidas na obscuridade a 38°C, durante 3 a 4 dias. Após esse período de incubação foram registadas colónias brancas de contornos regulares (figura 10). Uma amostra dessas colónias, observada ao microscópio óptico composto, revelou que estas eram constituídas por numerosas células esféricas (cocos), sem mobilidade e tamanho entre 0,4 e 0,6µm. Foi depois realizada uma coloração de Gram, para

determinar a natureza da parede celular. Tendo colorado positivamente e face às características atrás mencionadas, julgamos estar na presença de *Halococcus sp.*.

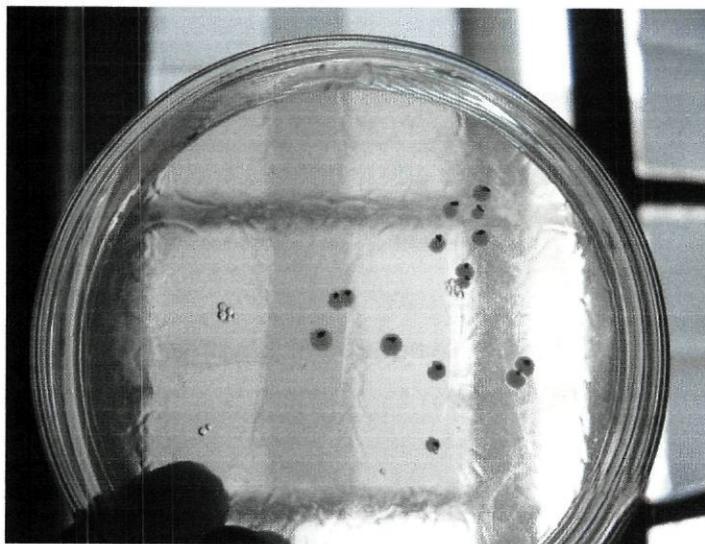


Figura 10. Pequenas colónias brancas de contornos regulares.

NAVARRO, J. C., et al. 2002, no seu trabalho não publicado são omissos e não revelam qual o crescimento obtido utilizando um meio de cultura em tudo semelhante a nosso, diferindo apenas na salinidade, 120‰ em vez de 250‰. Contudo, o facto de estes investigadores terem utilizado este meio, incentivou-nos a avaliar o desempenho de um meio semelhante.

O meio simples 250 (MS250‰), não foi muito eficaz no crescimento de Halobactérias. Ao fim de 18 dias este meio apresentava a absorvância máxima de  $0,264 \pm 0,023$  a 520nm. A partir desse dia o valor da absorvância iniciou uma descida, indicando deste modo que a cultura tinha alcançado o seu valor máximo entrando depois numa fase degenerativa. É interessante verificar no gráfico da figura 9, que o desenvolvimento da cultura de Halobactérias em MS250‰, reflectido nos valores de absorvância, apresenta-se relativamente diferente do controlo. Este facto, comprovado pela análise estatística resumida nos quadros da tabela 1, permite-nos afirmar que a cultura de Halobactérias é significativamente diferente do controlo ( $P < 0,001$ ), ou seja, o aumento de densidade óptica deve-se ao crescimento de Halobactérias e não a um outro factor, como por exemplo, as leveduras presentes no fermento industrial de padeiro utilizado na preparação deste meio. Inclusive, essa diferença parece já ser evidente a partir do 4º dia de ensaio. Após posterior incubação de um inóculo deste meio em placas de marine agar, observações ao

microscópio óptico composto e teste de Gram, viemos a verificar que o que se tinha presumivelmente desenvolvido neste meio foram *Halococcus sp.* e não Halobactérias vermelhas como o pretendido.

Tendo em conta que o nosso objectivo era obter um meio de cultura eficiente para o crescimento de *Halobacterium* e não *Halococcus*, voltamos a repetir o ensaio, mas desta vez com meio de cultura para diferentes membros da Família *Halobacteriaceae* (OREN, A., 1994; OREN, A., & RODRÍGUEZ – VALERA, F., 2001).

Decorridos 21 dias de monitorização das culturas mantidas ao abrigo da luz, em estufa a 38°C, obtivemos os resultados que abaixo se apresentam no gráfico da figura 11. Nesse gráfico estão representadas as absorvâncias médias lidas a 520nm das culturas ensaiadas. Sendo uma delas relativa às médias das amostras com meio de cultura complexo (MC156‰), inoculado com colónias vermelhas isoladas a partir de uma amostra das salinas de Rio Maior. E a outra relativa a um controlo realizado com amostras de meio de cultura MC156‰ sem inóculo. Registam-se ainda os desvios padrão das amostras sob a forma de semi rectas verticais.

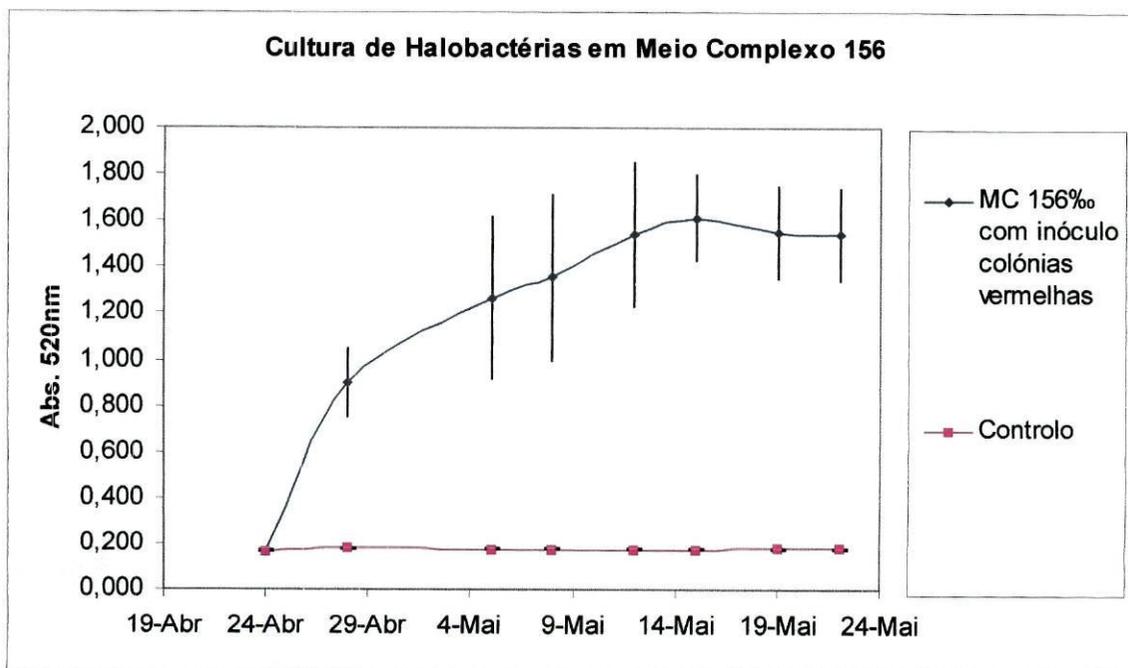


Figura 11. Evolução da absorvância média a 520nm de duas culturas.

Podemos verificar que a partir do 3º dia (28 de Abril), as duas culturas apresentavam valores de absorvância bastante diferentes. Mas, para podermos falar em diferenças

significativas tivemos que recorrer a uma ANOVA do tipo I. Em primeiro lugar efectuamos uma análise de variância à totalidade dos valores obtidos durante os 21 dias do ensaio e somente depois aos valores relativos ao 3º dia. Abaixo se apresenta um resumo dos valores obtidos para a totalidade dos valores do ensaio (Tabela 2).

Tabela 2. Valores obtidos durante a Análise de Variância do Tipo I, realizada às duas culturas ensaiadas.

**De 24 Abril até 15 de Maio**  
**ANOVA: Factor único**

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
MC 156‰	18	20,527	1,140389	0,305393
Controlo	12	2,095	0,174583	2,5E-05

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>Valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	6,716019	1	6,716019	36,21921	1,74E-06	4,195982
Dentro de grupos	5,191955	28	0,185427			
Total	11,90797	29				

Com base na verificação que o valor de F (36,21921) era superior ao valor do F crítico (4,195982), podemos afirmar que existem 95% de probabilidade de as duas culturas serem diferentes.

De seguida foi retirado 1mL da cultura em meio complexo (MC156‰) e foi inoculado em placas de marine agar. Essas placas foram mantidas na obscuridade a 38°C, durante 3 a 4 dias. Após esse período de incubação foram registadas numerosas colónias brancas e vermelhas de contornos regulares (figura 12). Uma amostra das colónias brancas, observada ao microscópio óptico, revelou que estas eram constituídas por numerosas células esféricas (cocos), sem mobilidade e com tamanho entre 0,4 e 0,6µm. Foi depois realizada uma coloração de Gram, para determinar a natureza da parede celular. Tendo colorado positivamente e face às características atrás mencionadas, julgamos estar novamente na presença de *Halococcus sp.*. Contudo, uma amostra das colónias vermelhas, observada ao microscópio óptico composto, revelou que estas colónias eram constituídas por numerosas células em forma de bastonete, com relativa mobilidade e tamanho entre 1 a 4µm. Após um

resultado negativo na coloração de Gram e tendo em conta as características atrás mencionadas, julgamos estar na presença de *Halobacterium sp.*.

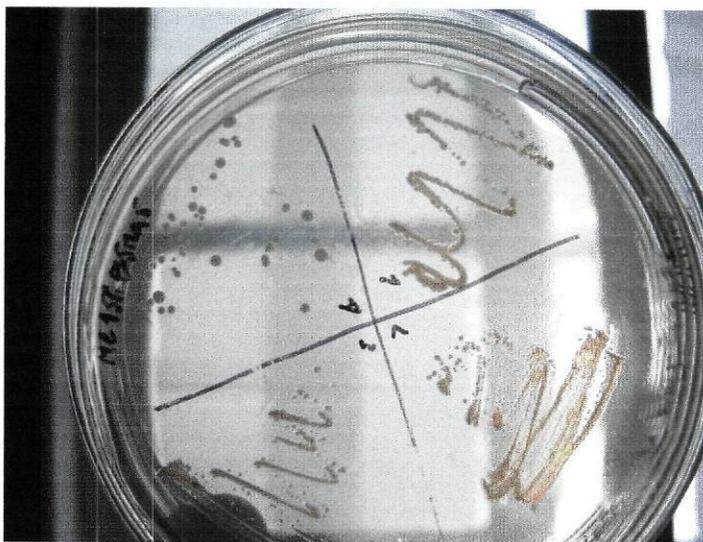


Figura 12. Pequenas colónias brancas de contornos regulares e um riscado com colónias vermelhas.

Este meio complexo MC156‰ apresentou resultados bastante superiores ao meio simples MS250‰. Nomeadamente, ao fim de 21 dias registámos uma absorvância máxima de  $1,613 \pm 0,187$  a 520nm. A partir desse dia o valor da absorvância iniciou uma ligeira descida, indicando deste modo que a cultura tinha atingido o máximo de crescimento e entrava numa fase degenerativa pouco acentuada. É interessante verificar no gráfico da figura 11, que o desenvolvimento da cultura de Halobactérias em MC156‰, reflectido nos valores de absorvância, apresenta-se significativamente diferente do controlo.

Este facto, comprovado pela análise estatística resumida nos quadros da tabela 2, permite-nos afirmar que a cultura de Halobactérias é significativamente diferente do controlo ( $P < 0,001$ ). No caso particular deste meio de cultura, a diferença parece já ser bastante evidente a partir do 3º dia de ensaio. Após posterior incubação de um inóculo deste meio em placas de marine agar, as observações ao microscópio óptico composto e os testes de Gram realizados, levaram-nos a presumir que o que se tinha desenvolvido neste meio foram *Halococcus sp.* e *Halobacterium sp.*.

Estes resultados parecem ser concordantes com os obtidos por OREN, A., 1994, que utilizou um meio igual, mas recorrendo a agar a 2% para obter um meio solidificado. Ou seja, o meio de cultura proporciona uma boa promoção do crescimento de membros da Família

*Halobacteriaceae*, não sendo por isso restritivo. Como pretendemos obter um meio de cultura para Halobactérias vermelhas, realizamos novo ensaio.

Na tentativa de obter um meio de cultura restritivo para o crescimento de *Halobacterium*, realizámos novo ensaio com um meio designado para o crescimento de *Halobacterium halobium* e *H. salinarum* (OREN, A., 1994; OREN, A., & RODRÍGUEZ – VALERA, F., 2001).

Após 53 dias de monitorização das culturas mantidas ao abrigo da luz, em estufa a 38°C, obtivemos os resultados que abaixo se apresentam na figura 13, onde estão representadas as absorvâncias médias lidas a 520nm das culturas ensaiadas. Sendo uma delas, relativa às médias das amostras com meio de cultura complexo (MC250‰), inoculado com colónias vermelhas isoladas a partir de uma amostra das salinas de Rio Maior. E a outra relativa a um controlo realizado com amostras de meio de cultura MC250‰ sem inóculo. Registam-se ainda os desvios padrão das amostras sob a forma de semi rectas verticais.

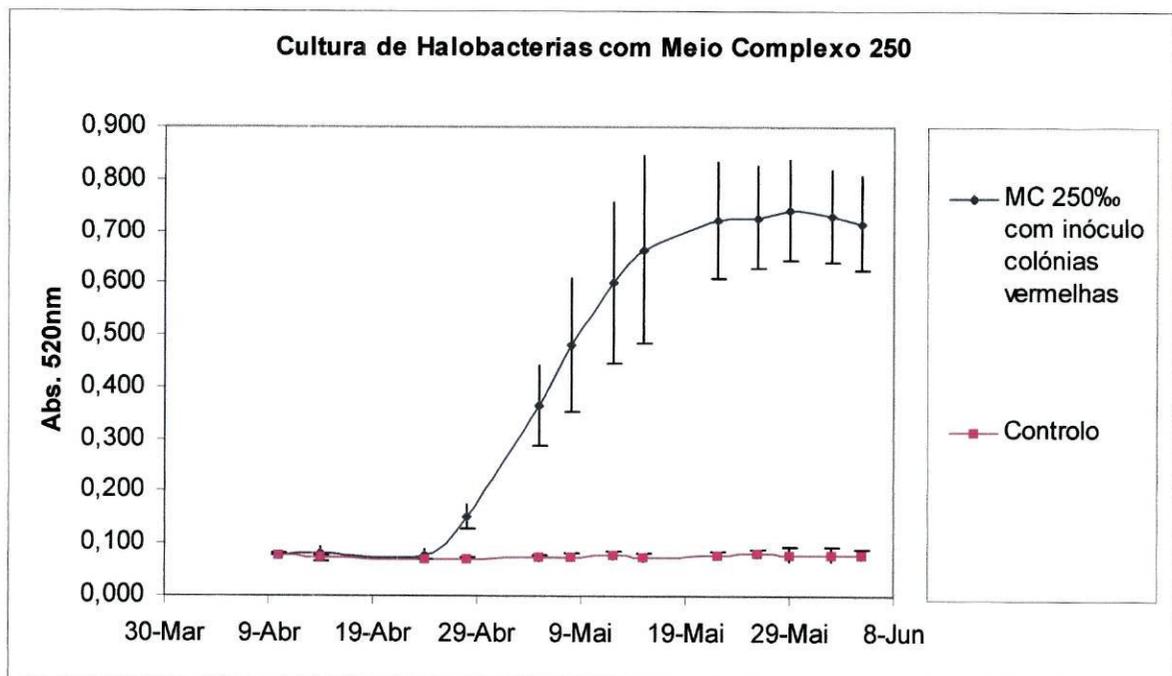


Figura 13. Evolução da absorvância média a 520nm de duas culturas.

No gráfico da figura 13 podemos ver que durante os primeiros 14 dias do ensaio (10 de Abril a 24 de Abril), as duas culturas apresentavam absorvâncias muito semelhantes. Para confirmar esta hipótese ( $H_0$ ) recorreremos a uma ANOVA do tipo I. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Valores obtidos durante a Análise de Variância do Tipo I, realizada às duas culturas ensaiadas.

**De 10 Abril até 24 Abril**

**ANOVA: Factor único**

**SUMÁRIO**

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
MC 250‰	9	0,714	0,079333	6,75E-05
Controlo	6	0,443	0,073833	3,02E-05

**ANOVA**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,000109	1	0,000109	2,049264	0,17588	4,667186
Dentro de grupos	0,000691	13	5,31E-05			
Total	0,0008	14				

Com base nestes resultados, valor de F (2,049264) inferior ao valor de F crítico (4,667186), podemos aceitar a hipótese  $H_0$  e afirmar, com 95% de certeza, que as amostras foram retiradas de populações normalmente distribuídas com médias e variâncias iguais. Ou seja, a diferença entre a cultura em meio complexo (MC250‰) com inoculo de Halobactérias vermelhas e a cultura controlo em meio MC250‰, não é significativa.

No entanto o ensaio decorreu durante 57 dias. Tendo em consideração os valor obtidos ao longo dos 57 dias, e recorrendo novamente a uma ANOVA do tipo I (tabela 4).

Tabela 4. Valores obtidos durante a Análise de Variância do Tipo I, realizada às duas culturas ensaiadas.

**De 10 de Abril até 02 Junho**

**ANOVA: Factor único**

**SUMÁRIO**

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
MC 250‰	36	16,257	0,451583	0,083214
Controlo	24	1,818	0,07575	4,4E-05

**ANOVA**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>Valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	2,03401	1	2,03401	40,49177	3,41E-08	4,006864
Dentro de grupos	2,913495	58	0,050233			
Total	4,947505	59				

Verificando-se então que, tendo em conta todo esse intervalo de tempo, a diferença entre as absorvâncias lidas a 520nm, é significativa e indicadora de estarmos na presença de duas populações diferentes. Para confirmar esta última afirmação, retiramos 1mL da cultura em Meio complexo (MC250‰) e inoculamos em placas de marine agar. Essas placas foram mantidas na obscuridade a 38°C, durante 3 a 4 dias. Após esse período de incubação foram registadas colónias vermelhas de contornos regulares (figura 14). Uma amostra das colónias vermelhas, observada ao microscópio óptico, revelou que estas colónias eram constituídas por numerosas células em forma de bastonete, com relativa mobilidade e tamanho entre 1 a 4µm. Após um resultado negativo na coloração de Gram e tendo em conta as características atrás mencionadas, julgamos estar na presença de *Halobacterium sp.*.

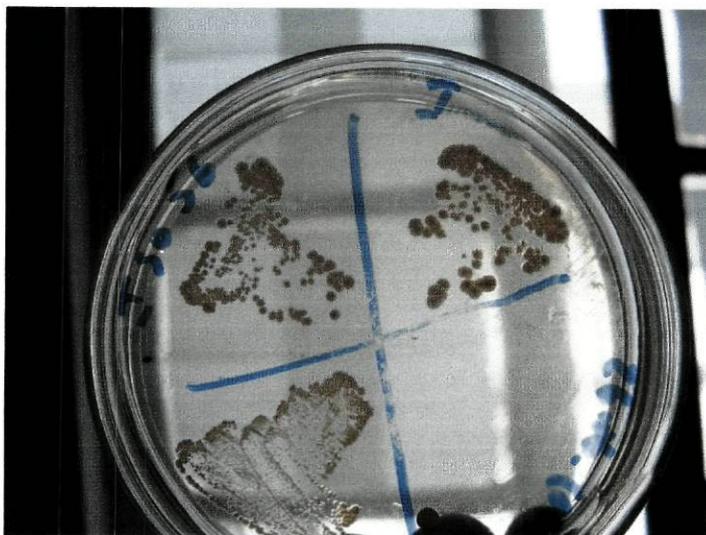


Figura 14. Riscado com colónias vermelhas.

O meio complexo MC250‰ registou um crescimento, com o valor de absorvância máximo de  $0,741 \pm 0,097$  a 520nm, ao fim de 50 dias. No entanto, é interessante verificar que durante os primeiros 14 dias do ensaio, os valores de absorvância da cultura ensaiada não diferiam muito do controlo. Facto confirmado através de uma análise de variância realizada apenas aos dados relativos aos primeiros 14 dias. Quando a análise estatística inclui os dados relativos aos 57 dias do ensaio, um valor de  $P < 0,001$  revela que a diferença entre a cultura ensaiada e a cultura controlo é significativa. A posterior incubação de um inóculo desta cultura em placas de marine agar, as observações ao microscópio óptico composto e os testes de Gram realizados, levaram-nos a presumir se tinha desenvolvido neste meio *Halobacterium sp.*. Face a estes dados, julgamos ter encontrado o meio de crescimento óptimo para o desenvolvimento de Halobactérias vermelhas, pois não só apresenta valores elevados de

absorvância a 520nm, como apresenta capacidade restritiva. Um meio igual ao por nós utilizado, tinha já sido utilizado com sucesso por OREN, A., 1994, OREN, A., 1999, e OREN, A., & RODRÍGUEZ – VALERA, F., 2001. LEE, S. Y. et al., 1998 utilizou um meio bastante semelhante conseguindo valores de absorvância a 660nm próximos de 2,000. Recorrendo posteriormente a um sistema de recirculação do meio de modo a aumentar o crescimento da cultura.

Segundo VIEIRA, N., 1989, a proliferação de bactérias é possível nos cristalizadores, porque a evaporação, além de conduzir a um aumento espectacular do cloreto de sódio, conduz também a uma maior concentração de nutrientes orgânicos e inorgânicos, proporcionando aos organismos halófilos um meio bastante rico.

OREN, A., & RODRÍGUEZ – VALERA, F., 2001, mencionam no seu trabalho as vantagens da utilização de meios enriquecidos na promoção de crescimento de Halobactérias. O meio por nós anteriormente utilizado apresenta resultados satisfatórios em termos de especificidade e desenvolvimento das culturas de Halobactérias vermelhas, mas poderia ser modificado de modo a obtermos resultados semelhantes num intervalo de tempo mais curto. Por isso, resolvemos seguir as indicações destes autores e utilizar água dos cristalizadores das salinas de Aveiro ultra filtrada, como factor de enriquecimento.

Por isso realizamos um ensaio onde procuramos averiguar a vantagem de usar água dos cristalizadores das salinas ultra filtrada, como factor de enriquecimento de um meio de cultura para Halobactérias. Preparámos, por isso, um meio enriquecido (ME250‰) contendo 40mL de água dos cristalizadores ultra filtrada e 10mL de meio de cultura complexo MC250‰. Monitorizámos a absorvância a 520nm deste meio e comparámos com um controlo contendo apenas 50mL de água dos cristalizadores ultra filtrada. Ambas as culturas foram inoculadas com colónias de Halobactérias vermelhas. Após 47 dias de monitorização das culturas mantidas ao abrigo da luz, em estufa a 38°C, obtivemos os resultados que abaixo se apresentam sob a forma de um gráfico (figura 15), onde estão representadas os valores das absorvâncias médias lidas a 520nm das culturas ensaiadas. Sendo um deles relativo às médias das amostras com meio de cultura enriquecido e a outra relativa a um controlo. Registam-se ainda os desvios padrão das amostras sob a forma de semi rectas verticais.

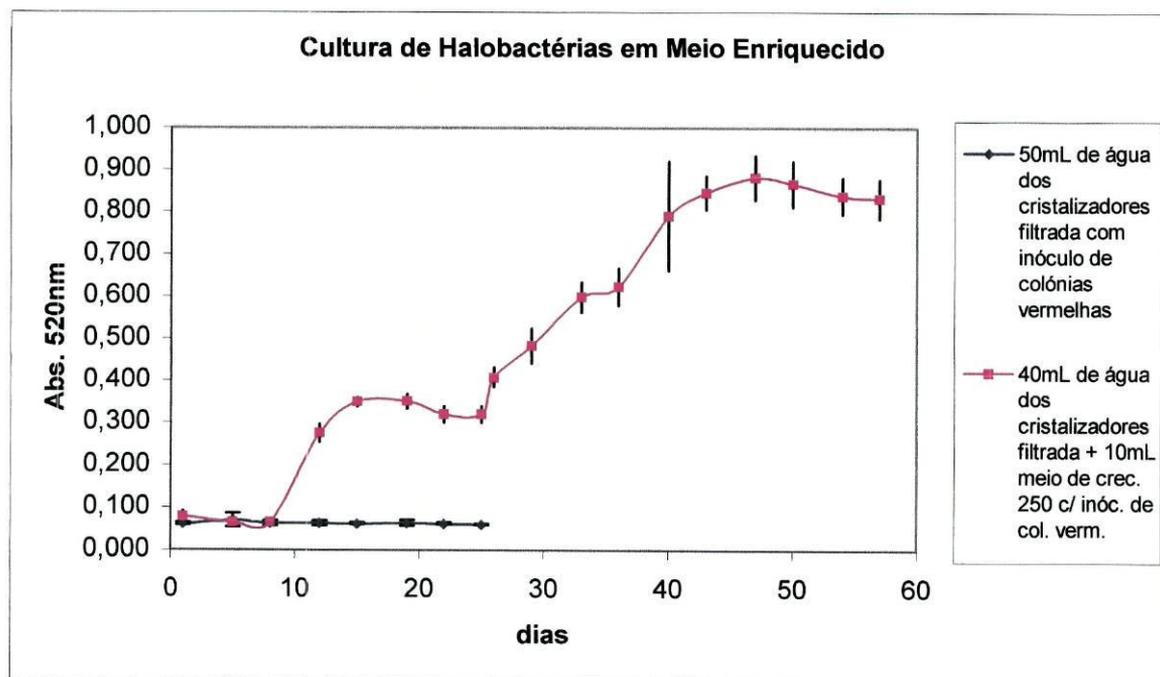


Figura 15. Evolução da absorvância média a 520nm das duas culturas.

Uma das nossas primeiras observações prendeu-se com o facto de as diferenças entre as culturas parecerem já evidentes após 12 dias. O que a verificar-se verdadeiro representa uma melhoria no tempo de desenvolvimento da cultura, quando comparado com o valor de 14 dias para o caso do meio de cultura complexo MC250% utilizado isoladamente num ensaio anterior. Mas para verificarmos se essa diferença era significativa realizámos uma ANOVA do tipo I, aos valores obtidos até essa data (tabela 5).

Tabela 5. Valores obtidos durante a Análise de Variância do Tipo I, realizada às duas culturas ensaiadas.

**Do 1 ao 12 dia**

**ANOVA: Factor único**

**SUMÁRIO**

Grupos	Contagem	Soma	Média	Variância
50mL água cristalizadores	12	0,767	0,063917	7,43E-05
ME250%	12	1,449	0,12075	0,008895

**ANOVA**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	Valor P	F crítico
Entre grupos	0,01938	1	0,01938	4,321582	0,049499	4,300944
Dentro de grupos	0,098659	22	0,004485			
Total	0,118039	23				

Os resultados não foram muito conclusivos. Apesar de podermos com 95% de certeza afirmar que as culturas são significativamente diferentes, os valores de F (4,321582) excedem apenas ligeiramente os valores de F crítico (4,300944). Por isso, resolvemos reavaliar os dados, mas desta vez tendo em conta os primeiros 15 dias do ensaio (tabela 6).

Tabela 6. Valores obtidos durante a Análise de Variância do Tipo I, realizada às duas culturas ensaiadas.

**Ao longo dos 15 dias**  
**ANOVA: Factor único**

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
50mL água cristalizadores	15	0,953	0,063533	6E-05
ME250‰	15	2,496	0,1664	0,01594

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>Valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,079362	1	0,079362	9,919968	0,003867	4,195982
Dentro de grupos	0,224005	28	0,008			
Total	0,303367	29				

Face a estes valores de F (9,919968) e F crítico (4,195982), podemos então afirmar com mais confiança que as culturas são diferentes.

Como é do conhecimento geral de que as culturas de Halobactérias possuem um tempo de incubação relativamente longo, resolvemos prolongar a monitorização da cultura até aos 47 dias. Pois, após este tempo de incubação, a cultura apresentava já valores médios de absorvância a 520nm que superavam os obtidos com o meio de cultura complexo MC250‰, sem enriquecimento. Procedemos então ao inóculo em placas de marine agar de 1mL desta cultura. Essas placas foram mantidas na obscuridade a 38°C, durante 3 a 4 dias. Após esse período de incubação foram registadas inúmeras colónias vermelhas de contornos regulares (figura 16). Uma amostra das colónias vermelhas, observada ao microscópio óptico, revelou que estas colónias eram constituídas por numerosas células em forma de bastonete, com relativa mobilidade e tamanho entre 1 a 4µm. Após um resultado negativo na coloração de Gram e tendo em conta as características atrás mencionadas, julgamos estar na presença de *Halobacterium sp.*



Figura 16. Colónias vermelhas de Halobactérias.

Estes resultados parecem indicar que o enriquecimento de culturas de halobactérias é possível e conduz a uma redução do tempo de incubação e a um aumento no número de células, inferido através dos valores de absorvância a 520nm.

OREN, A., & RODRÍGUEZ – VALERA, F., 2001, mencionam no seu trabalho as vantagens da utilização de meios enriquecidos na promoção de crescimento de Halobactérias. Por isso, resolvemos seguir as indicações destes autores e utilizar água dos cristalizadores das salinas de Aveiro ultra filtrada, como factor de enriquecimento. Este meio enriquecido, ME250‰, apresentou um crescimento superior ao meio complexo MC250‰, com as culturas a registarem uma absorvância máxima a 520nm, ao fim de 47 dias, de  $0,881 \pm 0,053$ . Ou seja, não só a absorvância máxima é superior como também o tempo de incubação foi mais reduzido.

Após 52 dias de monitorização (meio de cultura complexo MC250‰) e 47 dias (meio de cultura enriquecido ME250‰) das culturas mantidas ao abrigo da luz, em estufa a 38°C, obtivemos os resultados que abaixo se apresentam na figura 17, onde estão representadas os valores das absorvâncias médias lidas a 520nm das culturas ensaiadas. Sendo um deles relativo às médias das amostras do meio de cultura complexo MC250‰ e a outra relativa ao meio de cultura enriquecido ME250‰. Registam-se ainda os desvios padrão das amostras sob a forma de semi rectas verticais.

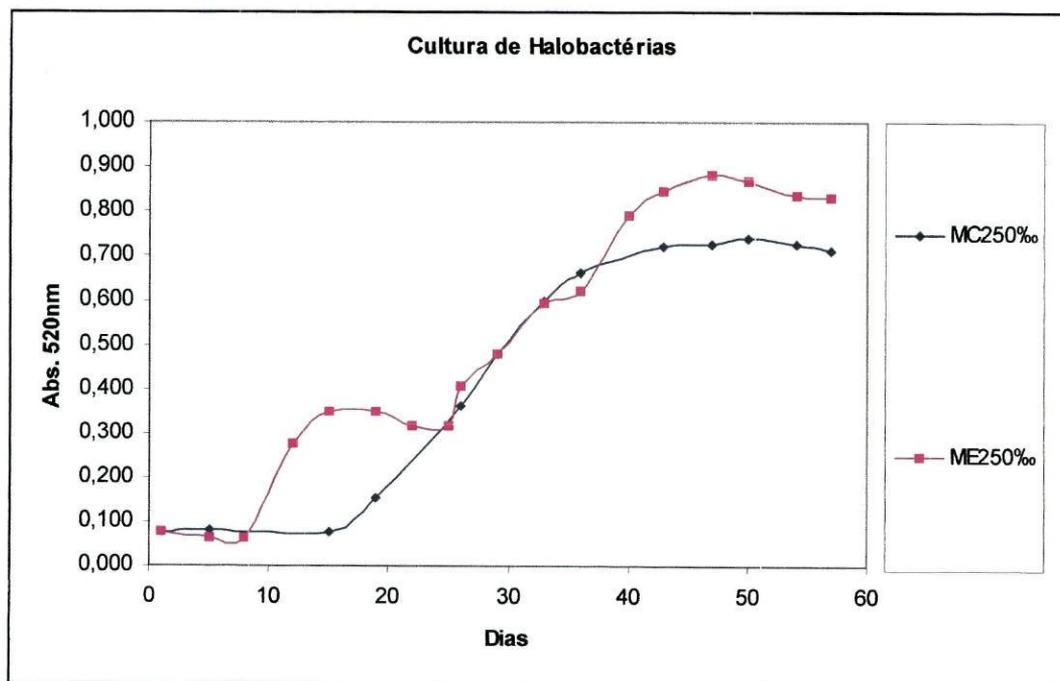


Figura 17. Evolução da absorvância média a 520nm dos dois meios de cultura.

Atendendo aos resultados destes dois últimos meios de cultura, MC250‰ e ME250‰, resolvemos realizar uma análise de variância do Tipo I, ANOVA Tipo I, para verificar se existiam diferenças significativas entre eles (tabela 7). Face aos valores de F (4,690205) e F crítico (3,977789) encontrados, podemos afirmar com mais confiança que os dois meios de cultura são diferentes. Portanto, o meio de crescimento enriquecido ME250‰ apresenta-se como o melhor meio para a promoção do crescimento de Halobactérias vermelhas.

Tabela 7. Valores obtidos durante a Análise de Variância do Tipo I, realizada aos dois meios de cultura que melhores resultados apresentaram.

**ANOVA: Factor único**

**SUMÁRIO**

<i>Grupos</i>	<i>Contagens</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
MC 250‰	36	16,257	0,451583	0,083214
ME 250‰	36	11,803	0,327861	0,034278

**ANOVA**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,275529	1	0,275529	4,690205	0,033744	3,977789
Dentro de grupos	4,112199	70	0,058746			
Total	4,387728	71				

OREN, A., 1994, VILHELMSSON, O., et al., 1997 e PRASAD, M. M., & SEENAYYA, G., 2000, preferem meios sólidos para isolar e avaliar o número de unidades formadoras de colónias, de bactérias Halofílicas.

LEE, S. Y. et al., 1998, referem valores próximos de 2,000 de absorvância a 660nm, ao fim de 3 a 5 dias, para culturas de Halobactérias em modo “batch” em condições que diferem das nossas, na complexidade do meio de cultura utilizado, no fotoperíodo contínuo e nos níveis de oxigénio (1,3p.p.m.) da cultura, sendo por isso difícil estabelecer qualquer comparação. OREN, A., & LITCHFIELD, C. D., 1999, utilizando um meio complexo com a mesma salinidade por nós utilizada, sem recorrer a iluminação e em meio anaeróbio com L-Arginina.HCl (5g/L), obtém um meio de crescimento restritivo que ao fim de 5 a 7 dias apresenta valores de absorvância a 660nm, duas vezes superiores ao controlo. OREN, A., & RODRÍGUEZ – VALERA, F., 2001, recorrem novamente a este meio de cultura complexo, sem L-Arginina.HCl mas com agitação, como meio de crescimento óptimo para *Halobacterium salinarum*.

### 3.2 DIETAS

Tendo como base os resultados obtidos na primeira etapa deste trabalho e face aos objectivos que pretendíamos alcançar, optámos por usar as Halobactérias que se desenvolveram no meio complexo designado para o crescimento de *Halobacterium halobium* e *H. salinarum* (OREN, A., 1994; OREN, A., & RODRÍGUEZ – VALERA, F., 2001), enriquecido com água dos cristalizadores das salinas de Aveiro (ME250‰), segundo proposta de OREN, A., & RODRÍGUEZ – VALERA, F., 2001, como dieta alimentar alternativa, para o desenvolvimento de náuplios de *Artemia sp.*

Esses náuplios foram alimentados com cinco dietas alimentares diferentes: DIETA A; DIETA B; DIETA C; DIETA D e DIETA E.

Os frascos foram colocados à temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ) e com fotoperíodo de aproximadamente 7 horas luz, 17 horas de obscuridade.

O ensaio decorreu até o número de indivíduos não ser suficientes para a realização das amostragens.

No gráfico da figura 18 está representada a evolução do número médio de indivíduos de *Artemia sp.* por frasco ao longo do tempo, para três das dietas ensaiadas. Registam-se ainda os desvios padrão das amostras sob a forma de semi rectas verticais.

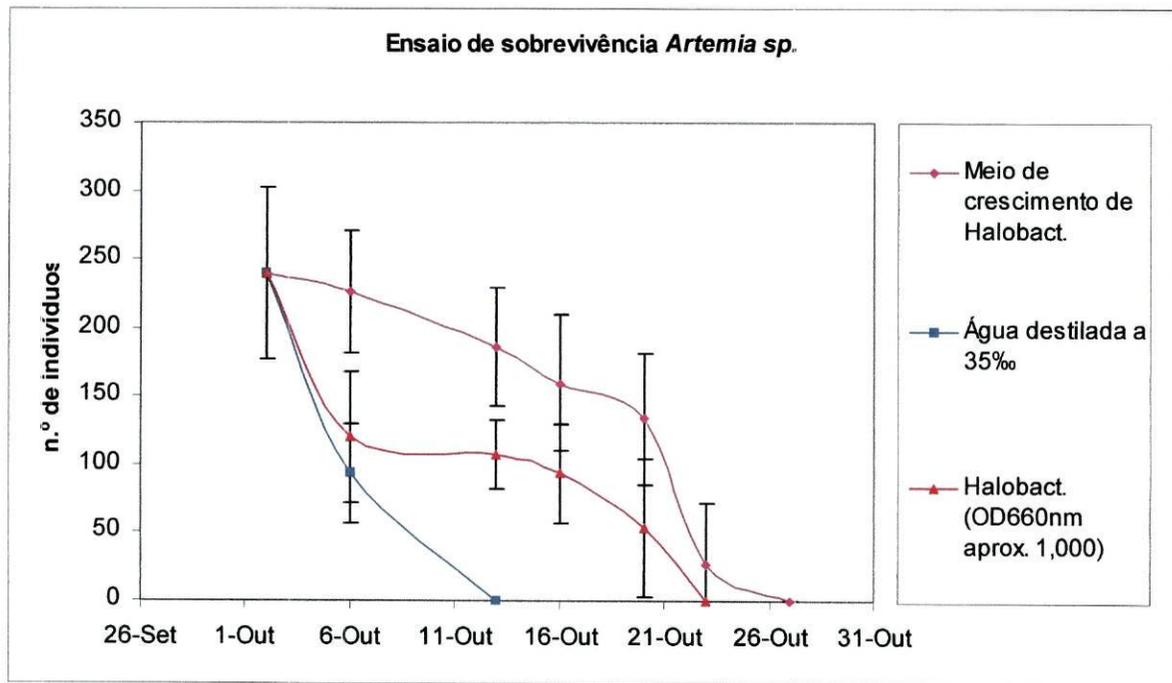


Figura 18. Evolução da densidade de *Artemia sp.*, para três das dietas ensaiadas, DIETA A, DIETA B e DIETA D.

No gráfico da figura 18, podemos ver que a dieta alimentar utilizada como controlo de procedimento (DIETA B), apresenta uma mortalidade elevada, e por isso, taxas de sobrevivência baixas, tendo ocorrido a morte de todos os indivíduos ao fim de 11 dias.

Estes resultados parecem indicar ainda que a dieta constituída por meio de crescimento complexo enriquecido ME250‰ (DIETA A), apresenta melhores resultados que a dieta constituída por cultura de Halobactérias (DIETA D).

Para verificar que a diferença entre as duas dietas era significativa ao longo de todo o ensaio, realizámos uma análise de variância (ANOVA tipo I) aos valores obtidos para cada uma delas. Deste modo poderíamos com apenas 5% de possibilidade de aceitar uma hipótese falsa ( $H_0$ ) como verdadeira (erro do tipo 2), concluir acerca da diferença entre as duas dietas (tabela 8).

Tabela 8. Valores obtidos durante a Análise de Variância do Tipo I, realizada a duas dietas ensaiadas, DIETA A e DIETA D, respectivamente.

**De 6 a 20 de Outubro**  
**ANOVA: Factor único**

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagens</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
DIETA A	120	212	1,766667	0,331653
DIETA D	120	112	0,933333	0,230812

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	41,66667	1	41,66667	148,1574	8,05E-27	3,880828
Dentro de grupos	66,93333	238	0,281232			
Total	108,6	239				

Como obtivemos um valor de F (148,1574) superior ao valor do F crítico (3,880828), podemos com 95% de certeza rejeitar a hipótese  $H_0$  (as amostras foram retiradas de populações normalmente distribuídas com médias e variâncias iguais) e aceitar  $H_1$  (assumindo que as populações possuem variâncias iguais e por isso as amostras são retiradas de populações com diferentes médias) afirmar que ao longo deste ensaio, a sobrevivência dos indivíduos alimentados com a DIETA A, é significativamente diferente da sobrevivência dos indivíduos alimentados com a DIETA D.

No gráfico da figura 19 podemos verificar a evolução do número médio de indivíduos ao longo do tempo para os aquários alimentados apenas com um inóculo inicial de 20mL de cultura da micro alga *Tetraselmis suecica* (OD660nm de aproximadamente 1,000) (DIETA C), que serviu de controlo para uma outra dieta constituída por 5mL diários de cultura de *T. suecica* com densidade óptica próxima da unidade a 660nm (DIETA E). E ainda, uma dieta para controlo do procedimento, constituída por 5mL diários de água destilada a 35‰ (DIETA B). Registaram-se ainda os desvios padrão das amostras sob a forma de semi rectas verticais.

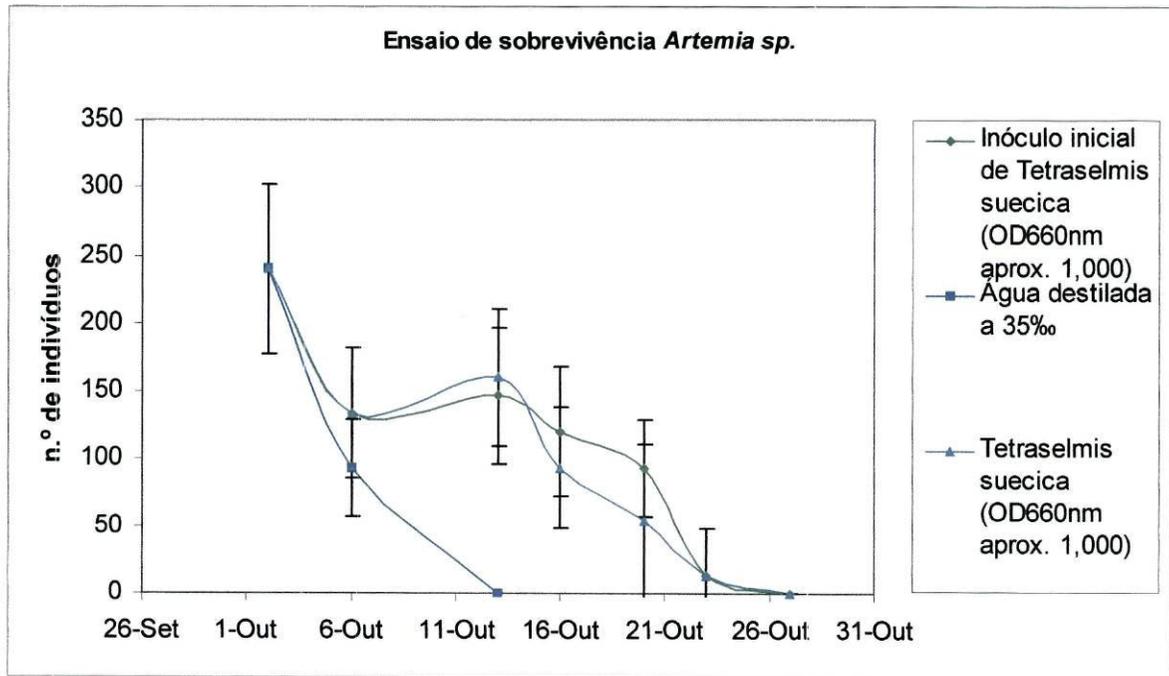


Figura 19. Evolução da densidade de *Artemia sp.*, para três das dietas ensaiadas, DIETA C, DIETA B e DIETA E.

Nesta figura verificamos que as duas dietas com *T. suecica* (DIETA C e E) apresentam comportamentos semelhantes, ao longo do período de tempo considerado. Pelo contrário, a dieta controlo de procedimento (DIETA B), na qual apenas eram adicionados diariamente aos aquários 5mL de água destilada a 35‰, revelou uma mortalidade elevada, não sobrevivendo nenhum indivíduo para além do 11º dia.

Para certificar se a diferença entre as duas dietas era significativa ao longo de todo o ensaio, realizámos uma análise de variância (ANOVA tipo I) aos valores obtidos para cada uma delas (tabela 9).

Tabela 9. Valores obtidos durante a Análise de Variância do Tipo I, realizada a duas dietas ensaiadas, DIETA C e DIETA E, respectivamente.

**De 6 a 23 de Outubro**  
**ANOVA: Factor único**

**SUMÁRIO**

Grupos	Contagens	Soma	Média	Variância
DIETA C	150	152	1,013333	0,415928
DIETA E	150	136	0,906667	0,501298

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	0,853333	1	0,853333	1,860683	0,173575	3,872856
Dentro de grupos	136,6667	298	0,458613			
Total	137,52	299				

Como obtivemos um valor de F (1,860683) inferior ao valor do F crítico (3,872856), podemos aceitar a hipótese  $H_0$  (as amostras foram retiradas de populações normalmente distribuídas com médias e variâncias iguais) e rejeitar  $H_1$  (assumindo que as populações possuem variâncias iguais e por isso as amostras são retiradas de populações com diferentes médias) afirmar que ao longo deste ensaio, a sobrevivência dos indivíduos alimentados com a DIETA C, não é significativamente diferente da sobrevivência dos indivíduos alimentados com a DIETA E.

Verificadas estas duas situações, observámos comparativamente a eficácia das dietas que obtiveram melhores resultados no caso anterior. Para isso, construímos um gráfico com os valores relativos ao número médio de indivíduos para a DIETA E e para a DIETA A (figura 20. Registam-se ainda os desvios padrão das amostras sob a forma de semi rectas verticais.

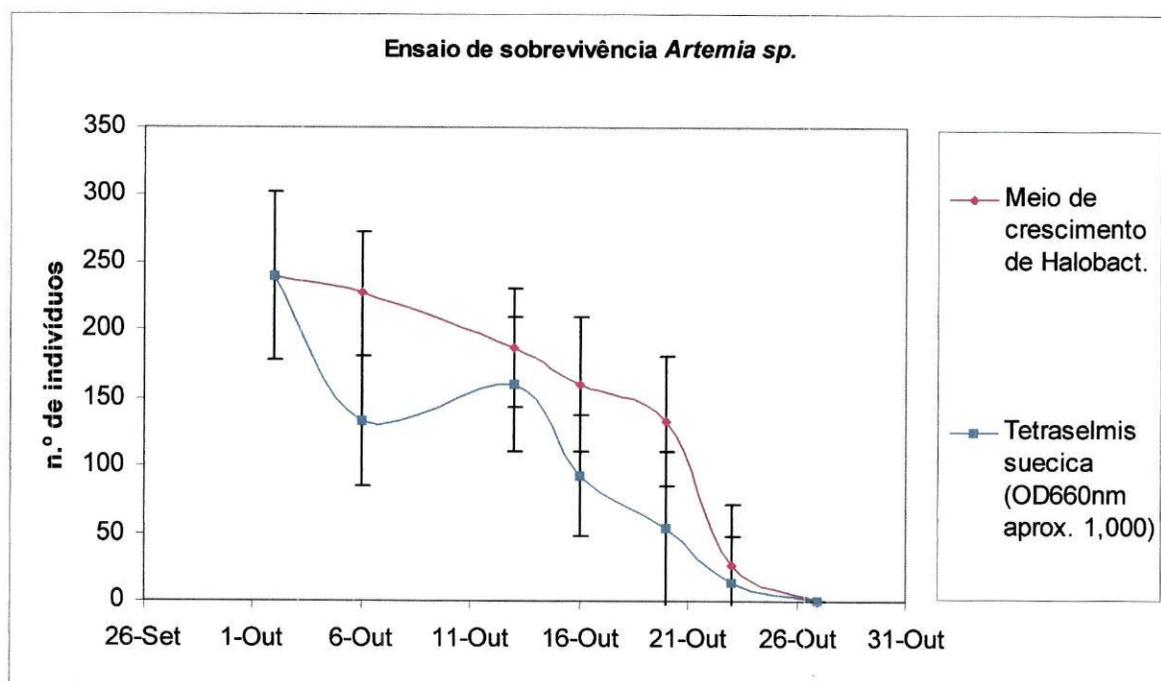


Figura 20. Evolução da densidade de *Artemia sp.*, para duas das dietas ensaiadas, DIETA A e DIETA E.

Podemos verificar que a dieta alimentar que consistia em 5mL diários de meio complexo enriquecido ME250‰ (DIETA A), parece apresentar melhor taxa de sobrevivência que a dieta constituída por 5mL diários de cultura de *T. suecica* com densidade óptica próxima da unidade a 660nm (DIETA E). Para verificarmos se esta hipótese era ou não verdadeira recorreremos mais uma vez a uma análise de variância (ANOVA) do tipo I (tabela 10).

Tabela 10. Valores obtidos durante a Análise de Variância do Tipo I, realizada a duas dietas ensaiadas, DIETA A e DIETA E, respectivamente.

**De 6 a 23 de Outubro**  
**ANOVA: Factor único**

**SUMÁRIO**

<i>Grupos</i>	<i>Contagens</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
DIETA A	150	220	1,466667	0,666667
DIETA E	150	136	0,906667	0,501298

**ANOVA**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	23,52	1	23,52	40,27521	8,19E-10	3,872856
Dentro de grupos	174,0267	298	0,583982			
Total	197,5467	299				

Como o valor de F obtido (40,27521) é superior ao valor de F crítico (3.872856), podemos aceitar a nossa hipótese alternativa  $H_1$  e afirmar que as populações possuem variâncias iguais e por isso as amostras são retiradas de populações com diferentes médias. Revelando deste modo que a dieta alimentar constituída por 5mL diários de meio complexo enriquecido ME250‰ (DIETA A) é a que apresenta melhores resultados neste ensaio.

No primeiro ensaio, as dietas que melhores resultados de sobrevivência apresentaram foram as DIETAS A, C e E. Mais concretamente, os organismos sobrevivem durante 21 dias. Com a DIETA B, os organismos sobrevivem apenas 4 dias e com a DIETA D, os organismos sobrevivem 18 dias. Não parecem existir diferenças significativas entre as DIETAS C e E, neste primeiro ensaio, mas entre A e E a diferença é já significativa ( $P < 0,001$ ).

Durante este ensaio de sobrevivência de *Artemia sp.* alimentada com 5 dietas alimentares diferentes, foi também medido o crescimento dos indivíduos sujeitos às diferentes dietas. A figura 21 apresenta o comprimento médio total (desde o olho naupliar à concavidade

da furca) dos indivíduos sujeitos à DIETA A, à DIETA B e à DIETA D. Registam-se ainda os desvios padrão das amostras sob a forma de semi rectas verticais.

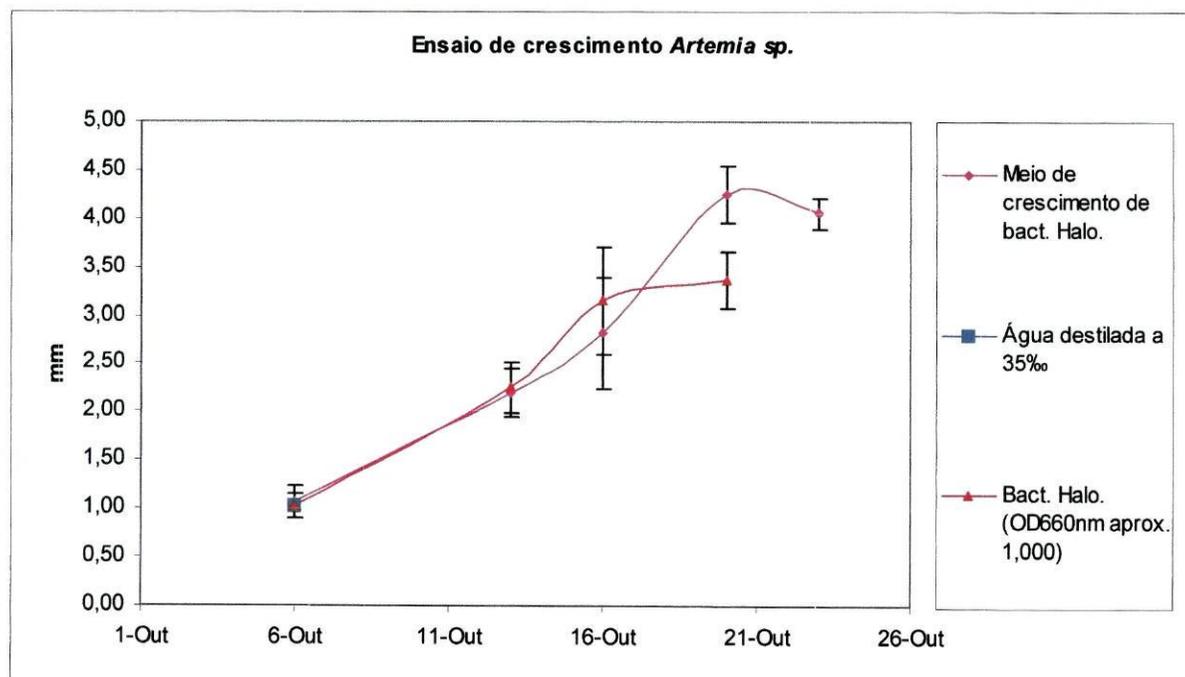


Figura 21. Crescimento médio de indivíduos de *Artemia sp.*, para três das dietas ensaiadas, DIETA A, DIETA B e DIETA D.

Para a dieta controlo (DIETA B), podemos verificar que só aparece representado neste gráfico um valor (dia 6 de Outubro), pois na segunda amostragem realizada para medir o comprimento dos indivíduos (dia 13 de Outubro), já não existiam indivíduos vivos.

Podemos constatar, que os indivíduos sujeitos à dieta constituída por 5mL diários de meio complexo enriquecido ME250‰ (DIETA A), apresentam um comprimento médio total superior, no final do ensaio, quando comparado com os indivíduos sujeitos à dieta constituída por 5mL diários de cultura de Halobactérias, com densidade óptica aproximada da unidade a 660nm, que se desenvolveram em meio complexo enriquecido ME250‰ (DIETA D). Contudo, a análise de variância realizada a estas duas populações, revelou que as diferenças não são estatisticamente significativas, para se poder dizer que a DIETA A, apresenta uma maior eficácia quando comparada com a DIETA D. Como podemos verificar pelo valor de F (0,880361), inferior ao valor de F crítico (3,880828), registado na tabela 11.

Tabela 11. Valores obtidos durante a Análise de Variância do Tipo I, realizada a duas dietas ensaiadas, DIETA A e DIETA D, respectivamente.

**De 6 a 20 de Outubro**  
**ANOVA: Factor único**

**SUMÁRIO**

Grupos	Contagens	Soma	Média	Variância
DIETA A	120	310	2,583333	1,455182
DIETA D	120	294	2,45	0,968067

**ANOVA**

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	1,066667	1	1,066667	0,880361	0,349054	3,880828
Dentro de grupos	288,3667	238	1,211625			
Total	289,4333	239				

Relativamente à eficiência da dieta alimentar constituída por um inóculo inicial de 20mL de cultura da micro alga *Tetraselmis suecica* (OD660nm de aproximadamente 1,000) (DIETA C), da dieta constituída por 5mL diários de cultura de *T. suecica* com densidade óptica próxima da unidade a 660nm (DIETA E), e ainda, da dieta para controlo do procedimento, constituída por 5mL diários de água destilada a 35‰ (DIETA B). No gráfico da figura 22 são apresentados os resultados obtidos. Registam-se ainda os desvios padrão das amostras sob a forma de semi rectas verticais.

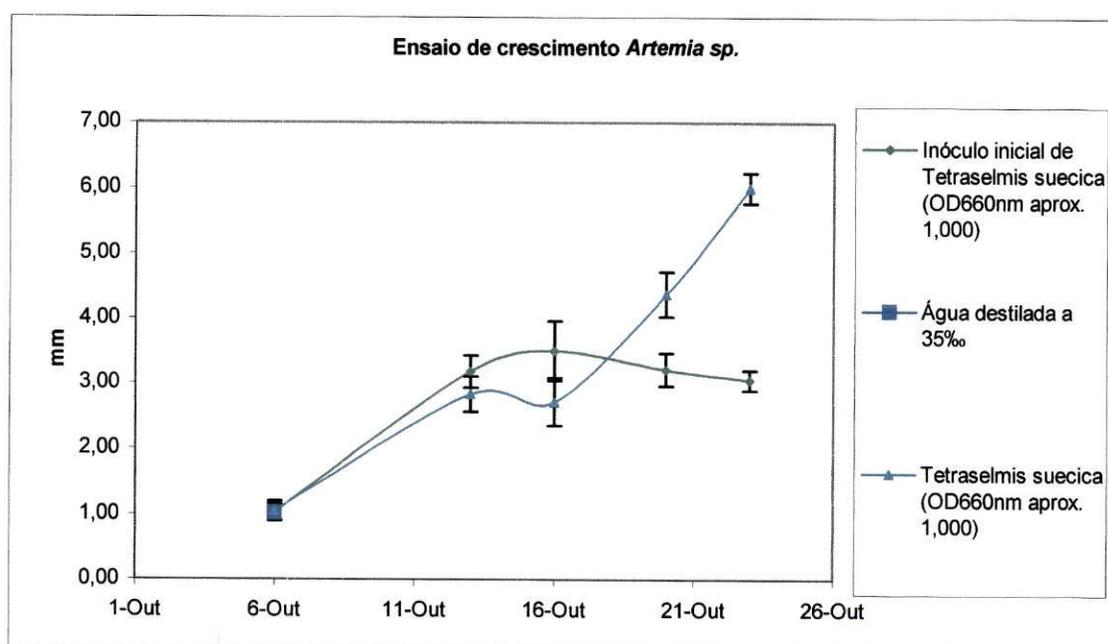


Figura 22. Crescimento médio de indivíduos de *Artemia sp.*, para três das dietas ensaiadas, DIETA C, DIETA B e DIETA E.

Para a dieta controlo, podemos verificar novamente que só aparece representado neste gráfico um valor (dia 6 de Outubro), pois na segunda amostragem realizada para medir o comprimento dos indivíduos (dia 13 de Outubro), já não existiam indivíduos vivos nestes aquários.

Podemos constatar ainda que os indivíduos sujeitos à DIETA C, apresentam um tamanho médio no final do ensaio bastante inferior aos indivíduos sujeitos à DIETA E. A análise de variância realizada a estas duas populações, revelou que as diferenças observadas são estatisticamente significativas, podendo afirmar-se que a dieta alimentar constituída por um inóculo inicial de 20mL de cultura da micro alga *T. suecica* (DIETA C), apresenta uma eficiência inferior ao da dieta constituída por 5mL diários de cultura de *T. suecica* (DIETA E). Como podemos verificar pelo valor de F (14,12949), superior ao valor de F crítico (3,872856) (tabela 12).

Tabela 12. Valores obtidos durante a Análise de Variância do Tipo I, realizada a duas dietas ensaiadas, DIETA C e DIETA E, respectivamente.

**De 6 a 23 de Outubro**  
**ANOVA: Factor único**

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagens</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
DIETA C	150	419,5	2,796667	0,876163
DIETA E	150	509	3,393333	2,897942

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	26,70083	1	26,70083	14,14949	0,000203	3,872856
Dentro de grupos	562,3417	298	1,887053			
Total	589,0425	299				

Finalmente comparou-se as dietas que melhores resultados obtiveram, nomeadamente, a adição de 5mL diários de meio complexo enriquecido ME250% (DIETA A) e a adição de 5mL diários de *T. suecica* (DIETA E). O gráfico da figura 23 representa o comprimento médio total dos indivíduos sujeitos a essas duas dietas. Registam-se ainda os desvios padrão das amostras sob a forma de semi rectas verticais.

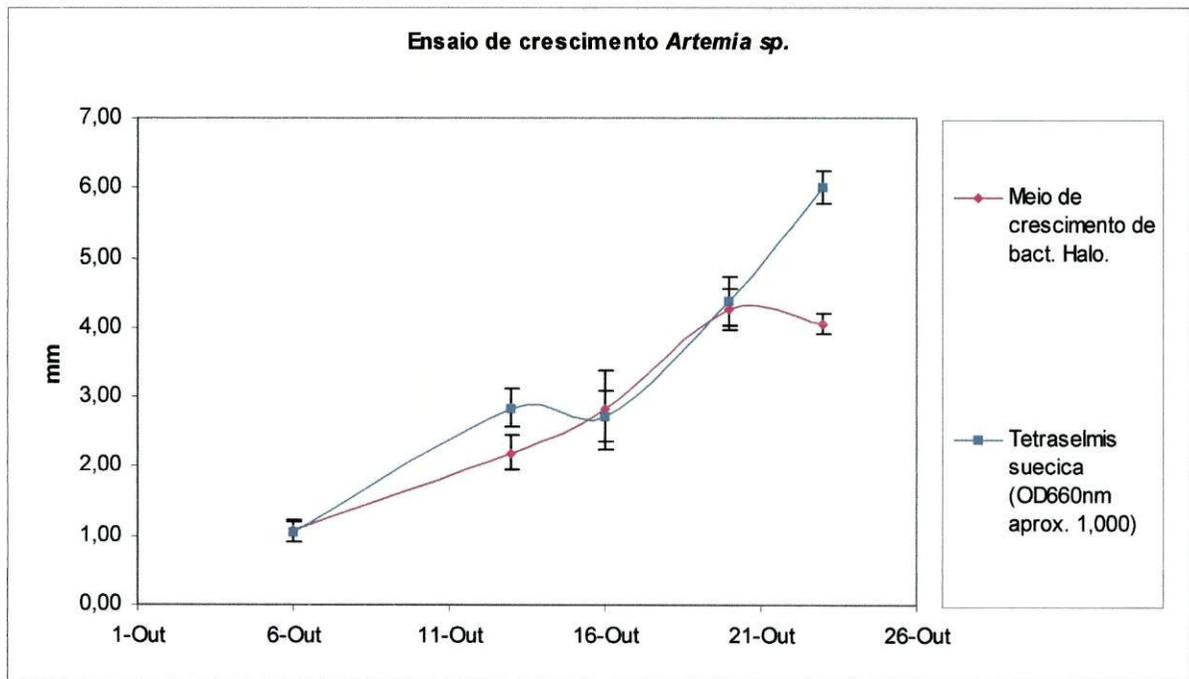


Figura 23. Crescimento médio de indivíduos de *Artemia sp.*, para duas das dietas ensaiadas, DIETA A e DIETA E.

Pela análise dos resultados (figura 23) podemos verificar que as duas dietas alimentares não apresentam diferenças significativas em termos de comprimento médio total dos indivíduos, ao longo do ensaio. Com a exceção da última amostragem (23 de Outubro) em que essa diferença parece ser visível. Contudo, visto tratarem-se de valores apenas referentes a uma amostragem, resolvemos tratar os dados como um todo, isto é, considerar os valores ao longo de todo o ensaio (de 6 a 23 de Outubro) (tabela 13).

Tabela 13. Valores obtidos durante a Análise de Variância do Tipo I, realizada a duas dietas ensaiadas, DIETA E e DIETA A, respectivamente.

**De 6 a 23 de Outubro**  
**ANOVA: Factor único**

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagens</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
DIETA E	150	509	3,393333	2,897942
DIETA A	150	431,5	2,876667	1,51321

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	20,02083	1	20,02083	9,077372	0,00281	3,872856
Dentro de grupos	657,2617	298	2,205576			
Total	677,2825	299				

O valor de F (9,077372) superior ao valor de F crítico (3,872856), indica que devemos aceitar a hipótese  $H_1$  e considerar que as amostras foram retiradas de populações normalmente distribuídas com médias e variâncias diferentes. Ou seja, as diferenças observadas são significativas e a DIETA E apresenta um desempenho superior ao da DIETA A.

No primeiro ensaio, as dietas que melhores comprimentos totais apresentaram foram as DIETAS A, C e E. Mais concretamente, os organismos apresentam um comprimento total de  $4,05 \pm 0,15$ mm,  $3,05 \pm 0,15$ mm e  $6,00 \pm 0,23$ mm, respectivamente. Com a DIETA B, os organismos apresentam um comprimento total de  $1,02 \pm 0,09$ mm e com a DIETA D, os organismos apresentavam um comprimento total de  $3,37 \pm 0,29$ mm. Contudo, existem diferenças significativas entre as DIETAS A,C e E, neste primeiro ensaio. Levando-nos a supor que a DIETA C é a que melhores resultados apresenta.

Como base nos resultados obtidos na primeira parte deste trabalho e face aos objectivos que pretendíamos alcançar. Optámos por usar em adição às dietas utilizadas na primeira parte, uma nova dieta, constituída pela junção de duas das dietas utilizadas (DIETA D e E), como dieta alimentar alternativa, para o desenvolvimento de nauplios de *Artemia sp.*.

A DIETA F é constituída por 2,5mL de cultura de Halobactérias, com densidade óptica aproximada da unidade a 660nm, que se desenvolveram em meio complexo enriquecido ME250‰ e 2,5mL de cultura da micro alga *Tetraselmis suecica* (OD660nm de aproximadamente 1,000).

Os frascos foram colocados à temperatura ambiente ( $\pm 19^{\circ}\text{C}$ ) e com fotoperíodo de aproximadamente 7 horas luz, 17 horas de obscuridade. O facto da sala onde estes aquários estavam colocados não possuir qualquer tipo de sistema de aquecimento, condicionou a manutenção da mesma temperatura ambiente deste ensaio, face ao outro ensaio descrito na segunda parte.

O ensaio decorreu até o número de indivíduos não serem suficientes para a realização das amostragens.

No gráfico da figura 24 estão representados a evolução do número médio de indivíduos de *Artemia sp.* por aquário ao longo do tempo, para quatro das dietas ensaiadas. Registam-se ainda os desvios padrão das amostras sob a forma de semi rectas verticais.

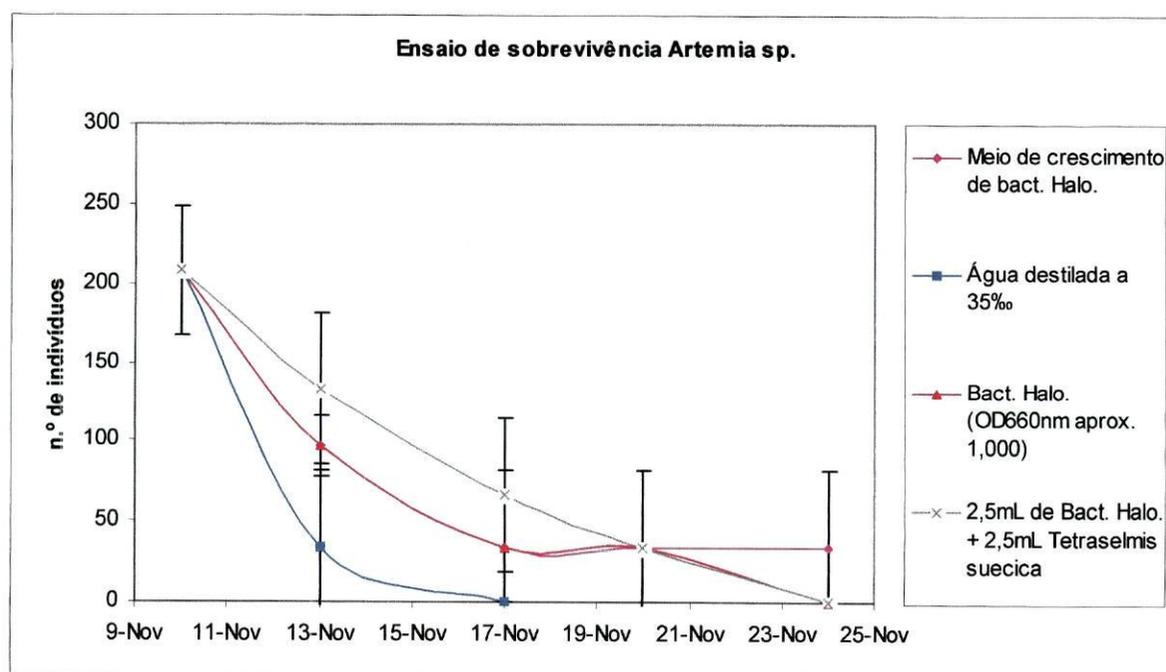


Figura 24. Evolução da densidade de *Artemia sp.*, para quatro das dietas ensaiadas, DIETA A, DIETA B, DIETA D e DIETA F.

Podemos verificar que a dieta alimentar utilizada como controlo (DIETA B), apresenta uma mortalidade elevada, e por isso, taxas de sobrevivência baixas. Tendo ocorrido a morte de todos os indivíduos ao fim de 7 dias. O que comparativamente aos resultados da primeira parte (11 dias) indicia que a temperatura ambiente influenciou a sobrevivência.

Podemos verificar que a DIETA A apresenta resultados iguais aos DIETA D e melhores do que os resultados da dieta mista (DIETA F).

Para verificar se a diferença entre a dieta constituída por meio de crescimento complexo enriquecido ME250% (DIETA A) e a dieta constituída por cultura de Halobactérias (DIETA D) é significativa, recorreremos a uma Análise de Variância do tipo I (ANOVA tipo I) (tabela 14).

Tabela 14. Valores obtidos durante a Análise de Variância do Tipo I, realizada a duas dietas ensaiadas, DIETA A e DIETA D, respectivamente.

**De 13 a 20 de Novembro**  
**ANOVA: Factor único**

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagens</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
DIETA A	90	49	0,544444	0,250811
DIETA D	90	49	0,544444	0,250811

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0	1	0	0	1	3,894229
Dentro de grupos	44,64444	178	0,250811			
Total	44,64444	179				

Como obtivemos um valor de F (0) inferior ao valor do F crítico (3,894229), podemos com 95% de certeza aceitar a hipótese  $H_0$  (as amostras foram retiradas de populações normalmente distribuídas com médias e variâncias iguais) e rejeitar  $H_1$  (assumindo que as populações possuem variâncias iguais e por isso as amostras são retiradas de populações com diferentes médias) afirmar que ao longo deste ensaio, a sobrevivência dos indivíduos alimentados com a DIETA A, não é significativamente diferente da sobrevivência dos indivíduos alimentados com a DIETA D, contrariando as observações realizadas na primeira parte.

Para verificar se a diferença entre a dieta constituída por meio de crescimento complexo enriquecido ME250% (DIETA A) e a dieta mista (DIETA F), recorreremos novamente a uma ANOVA tipo I (tabela 15).

Tabela 15. Valores obtidos durante a Análise de Variância do Tipo I, realizada a duas dietas ensaiadas, DIETA A e DIETA F, respectivamente.

**De 13 a 20 de Novembro**

**ANOVA: Factor único**

**SUMÁRIO**

<i>Grupos</i>	<i>Contagens</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
DIETA A	90	49	0,544444	0,250811
DIETA F	90	70	0,777778	0,399501

**ANOVA**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	2,45	1	2,45	7,534844	0,006672	3,894229
Dentro de grupos	57,87778	178	0,325156			
Total	60,32778	179				

Como obtivemos um valor de F (7,534844) superior ao valor do F crítico (3,894229), podemos com 95% de certeza afirmar que ao longo deste ensaio, a sobrevivência dos indivíduos alimentados com a DIETA A, é significativamente diferente da sobrevivência dos indivíduos alimentados com a DIETA F.

No gráfico da figura 25 verifica-se a evolução do número médio de indivíduos ao longo do tempo para os frascos alimentados apenas com a DIETA C, a DIETA E, a DIETA F, e a DIETA B. Registam-se ainda os desvios padrão das amostras sob a forma de semi rectas verticais.

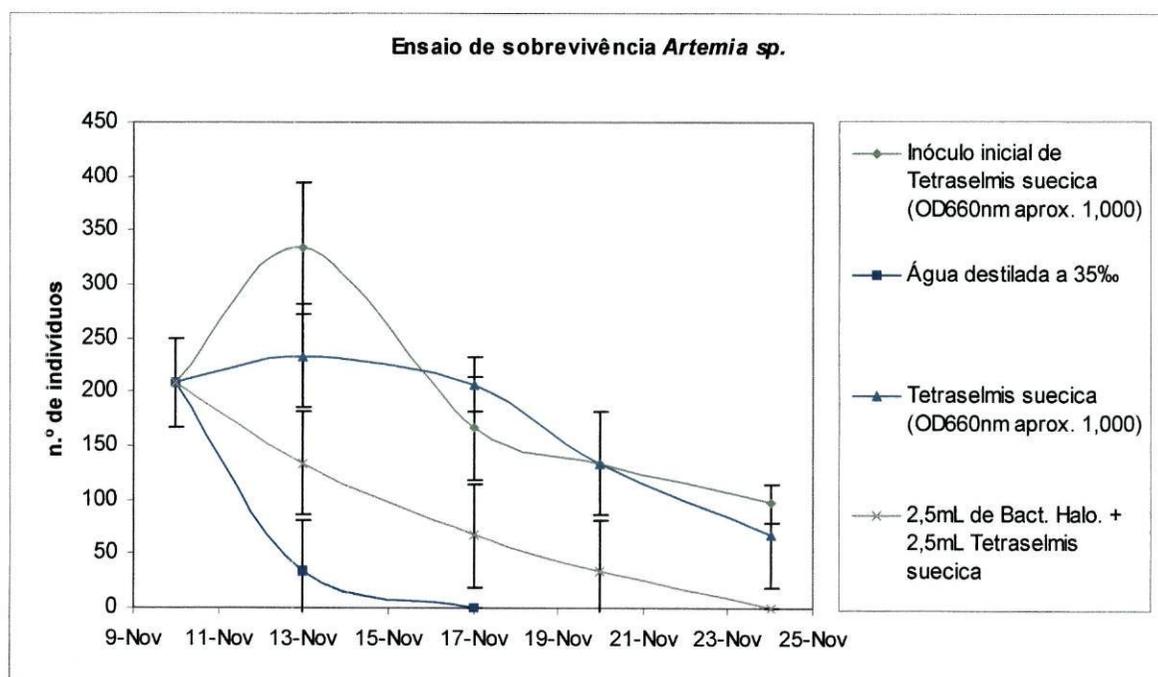


Figura 25. Evolução da densidade de *Artemia sp.*, para quatro das dietas ensaiadas, DIETA C, DIETA B, DIETA E e DIETA F.

Podemos verificar que as duas dietas com *T. suecica* (DIETA C e E) apresentam comportamentos semelhantes, ao longo do período de tempo considerado. Pelo contrário, a dieta mista (DIETA F) parece apresentar uma menor eficiência, em termos de sobrevivência. A dieta controlo de procedimento (DIETA B) revelou uma mortalidade elevada, não sobrevivendo nenhum indivíduo para além do 7º dia.

Para verificar se a diferença entre a dieta constituída por um inóculo inicial de 20mL de cultura da micro alga *Tetraselmis suecica* (OD660nm de aproximadamente 1,000) (DIETA C) e a dieta constituída por 5mL diários de cultura de *T. suecica* com densidade óptica próxima da unidade a 660nm (DIETA E) era significativa ao longo de todo o ensaio, realizamos uma análise de variância (ANOVA tipo I) aos valores obtidos para cada uma delas (tabela 16).

Tabela 16. Valores obtidos durante a Análise de Variância do Tipo I, realizada a duas dietas ensaiadas, DIETA C e DIETA E, respectivamente.

**De 13 a 24 de Novembro**  
**ANOVA: Factor único**

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagens</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
DIETA C	120	219	1,825	1,036345
DIETA E	120	192	1,6	0,611765

ANOVA

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	3,0375	1	3,0375	3,686042	0,056065	3,880828
Dentro de grupos	196,125	238	0,824055			
Total	199,1625	239				

Como obtivemos um valor de F (3,686042) inferior ao valor do F crítico (3,880828), podemos aceitar a hipótese  $H_0$  (as amostras foram retiradas de populações normalmente distribuídas com médias e variâncias iguais) e rejeitando  $H_1$  (assumindo que as populações possuem variâncias iguais e por isso as amostras são retiradas de populações com diferentes médias) afirmar que ao longo deste ensaio, a sobrevivência dos indivíduos alimentados com a DIETA C, não é significativamente diferente da sobrevivência dos indivíduos alimentados com a DIETA E.

Para avaliar se a diferença aparente entre a dieta constituída por 5mL diários de cultura da micro alga *Tetraselmis suecica* (DIETA E) e a dieta mista (DIETA F), constituída por 2,5mL de cultura de Halobactérias e 2,5mL de cultura da micro alga *Tetraselmis suecica*, se traduzia em resultados estatisticamente significativos, realizamos uma ANOVA tipo I (tabela 17).

Tabela 17. Valores obtidos durante a Análise de Variância do Tipo I, realizada a duas dietas ensaiadas, DIETA F e DIETA E, respectivamente.

**De 13 a 20 de Novembro**  
**ANOVA: Factor único**

SUMÁRIO

<i>Grupos</i>	<i>Contagens</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
DIETA F	90	70	0,777778	0,399501
DIETA E	90	172	1,911111	0,351561

ANOVA

Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	57,8	1	57,8	153,9156	7,18E-26	3,894229
Dentro de grupos	66,84444	178	0,375531			
Total	124,6444	179				

Como obtivemos um valor de F (153,9156) superior ao valor do F crítico (3,894229), podemos dizer que as populações possuem variâncias iguais e por isso as amostras são retiradas de populações com diferentes médias, ou seja, afirmar que ao longo deste ensaio, a sobrevivência dos indivíduos alimentados com a DIETA F é significativamente diferente da DIETA E.

À semelhança do que aconteceu na primeira parte deste trabalho, as dietas alimentares que obtiveram melhores resultados foram objecto de uma análise comparativa (DIETA A, DIETA E, e DIETA F) registada no gráfico 26. Registam-se ainda os desvios padrão das amostras sob a forma de semi rectas verticais.

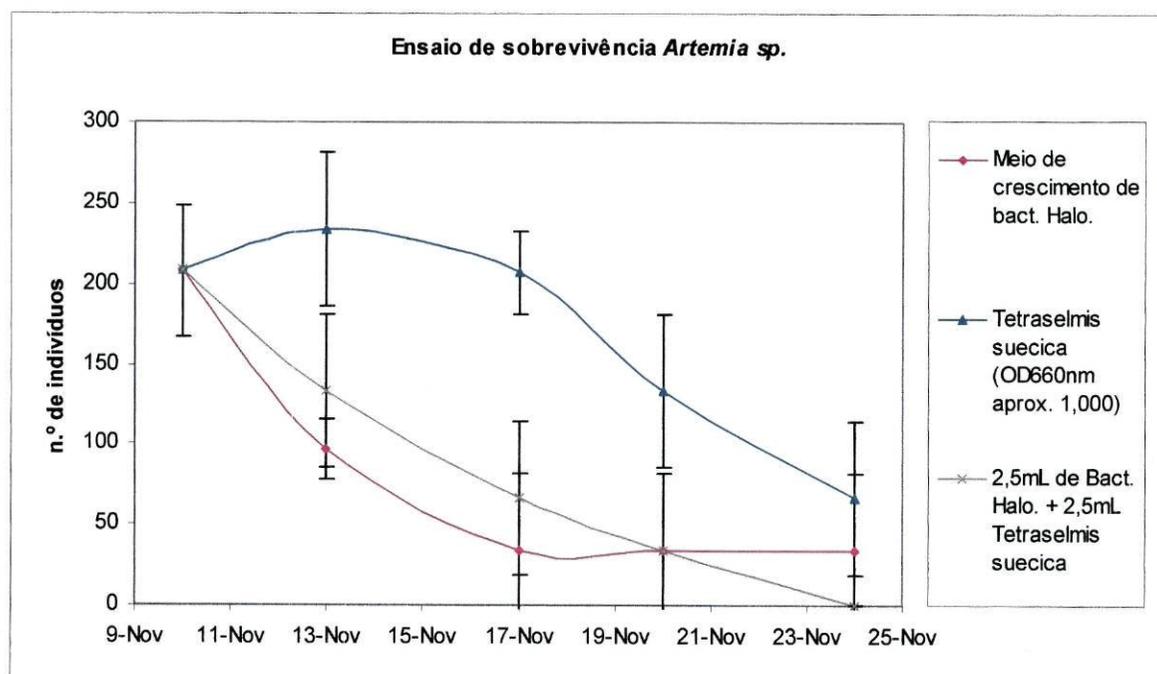


Figura 26. Evolução da densidade de *Artemia sp.*, para quatro das dietas ensaiadas, DIETA A, DIETA E e DIETA F.

Verificou-se assim que a DIETA E, parece apresentar melhor taxa de sobrevivência que a DIETA A. Para testarmos se esta hipótese era ou não verdadeira recorreremos mais uma vez a uma análise de variância (ANOVA) do tipo I (tabela 18).

Tabela 18. Valores obtidos durante a Análise de Variância do Tipo I, realizada a duas dietas ensaiadas, DIETA E e DIETA A, respectivamente.

**De 13 a 24 de Novembro**  
**ANOVA: Factor único**

**SUMÁRIO**

<i>Grupos</i>	<i>Contagens</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
DIETA E	120	192	1,6	0,611765
DIETA A	120	59	0,491667	0,252031

**ANOVA**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	73,70417	1	73,70417	170,6519	9,16E-30	3,880828
Dentro de grupos	102,7917	238	0,431898			
Total	176,4958	239				

Como o valor de F obtido (170,6519) é superior ao valor de F crítico (3,880828), podemos aceitar a nossa hipótese alternativa  $H_1$  e afirmar que as populações possuem variâncias iguais e por isso as amostras são retiradas de populações com diferentes médias. Revelando deste modo que a DIETA E é a que apresenta melhores resultados neste ensaio.

No segundo ensaio, as dietas A, C e E, continuam a apresentar melhores resultados de sobrevivência. Mais concretamente, os organismos sobrevivem durante 14 dias. Com a DIETA B, os organismos sobrevivem apenas 3 dias e com a DIETA D e DIETA F, os organismos sobrevivem 10 dias. Continuamos a não verificar diferenças significativas ente as DIETAS C e E, em termos de sobrevivência, mas entre A e E a diferença é já significativa ( $P < 0,001$ ).

Face a estes valores de sobrevivência, podemos afirmar que os dois ensaios são concordantes em termos gerais. Sendo que a diferença no número de dias poderá dever-se às diferenças de temperatura ambiente verificadas.

Referem temperaturas superiores a 26°C como mínimo para obter uma razoável sobrevivência das culturas de *Artemia sp.*, independentemente do alimento utilizado, DWIVEDI, S. N., et. al., 1980, JOHNSON, D. A., 1980, VIEIRA, N., 1988, GONZÁLEZ, E.

O., et. al., 1994, FÁBREGAS, J., et. al., 1996, TRIANTAPHYLLIDIS, G. V., et. al., 1997, MCEVOY, A., et. al., 1997, BAERT, P., et al., 1997, NAEGEL, L. C. A., 1999, THINH, L. V., et. al., 1999, OLSEN, A. I., et. al., 2000, BURGA, R. E. C., 2002 e OROZCO – MEDINA, C., et. al., 2002.

Por sua vez, referem temperaturas acima dos 28°C, DOBBELIER, J., et. al., 1980, ROYAN, J. P., 1980, VERSICHELE, D. & SORGELOOS, P., 1980, ESTÉVEZ, A., et. al., 1998, KOLKOVSKI, S., et. al., 2000.

Apenas, VIEIRA, N., 1989, GONZÁLEZ, E. O., 1994, BARATA, C., et. al., 1996, BASBUG, Y., & DEMIRKALP, F. Y., 1997, BURGA, R. E. C., 2002, ZMORA, O., et. al., 2002, e MALDONADO – MONTIEL, T. D. N. J., et. al., 2003, sugerem situações muito particulares de temperaturas ambientais inferiores a 25°C, maioritariamente relacionadas com culturas intensivas em grande escala realizadas em lagoas ao ar livre.

Em ensaios de apenas 7 dias com náuplios de *Artemia sp.* alimentados com micro algas (*Dunaliella tertiolecta*, *Spirulina sp.*, *Enteromorpha sp.* e *Rhodotorula sp.*), JOHNSON, D. A., 1980, obteve valores bem mais interessantes em termos de sobrevivência, registando apenas 7% de mortalidade. Mas não podemos ignorar o facto de este investigador ter mantido os aquários a 27°C e ter renovado o meio 1x por dia.

Utilizando também *Tetraselmis suecica* para alimentação de náuplios de *Artemia sp.*, FÁBREGAS, J., et. al., 1996, refere valores entre 14,5% e 33,4% de mortalidade, em condições bastante semelhantes às nossas, nomeadamente, alimentação 1x por dia, salinidade 30‰ e temperatura de 25°C. Contudo, estes investigadores proporcionaram às suas culturas uma oxigenação constante ao longo do ensaio.

THINH, L. V., et. al., 1999, realizaram ensaios de 7 dias com náuplios de *Artemia sp.*, alimentados com diversas micro algas (*Chaetoceros sp.*, *Skeletonema sp.*, *S. costatum*, *Nitzshia paleacea*, *Cryptomonas sp.*, *Nephroselmis sp.*, *Tetraselmis sp.*, *Isochrysis sp.*, *Rhodorus sp.*), tendo registado taxas de sobrevivência de 97% para todas as micro algas excepto *Nephroselmis sp.* e *Tetraselmis sp.* que registaram 65% de sobrevivência.

Utilizaram, também, micro algas como alimento para náuplios de *Artemia sp.*, mas revelam-se omissos quanto à sobrevivência observada nas suas culturas, ROYAN, J. P., 1980, VERSICHELE, D. & SORGELOOS, P., 1980, VIEIRA, N., 1988, VIEIRA, N., 1989, GONZÁLEZ, E. O., 1994, BARATA, C., et. al., 1996, BAERT, P., et al., 1997, OLSEN, A. I., et. al., 2000 e ZMORA, O., et. al., 2002.

Durante este ensaio de sobrevivência de *Artemia sp.* alimentada com 6 dietas alimentares diferentes, foi também medido o crescimento dos indivíduos sujeitos às diferentes dietas. A figura 27 apresenta o comprimento médio total (desde o olho naupliar à concavidade da furca) dos indivíduos sujeitos à DIETA A, à DIETA D, à DIETA F e à DIETA B. Registam-se ainda os desvios padrão das amostras sob a forma de semi rectas verticais.

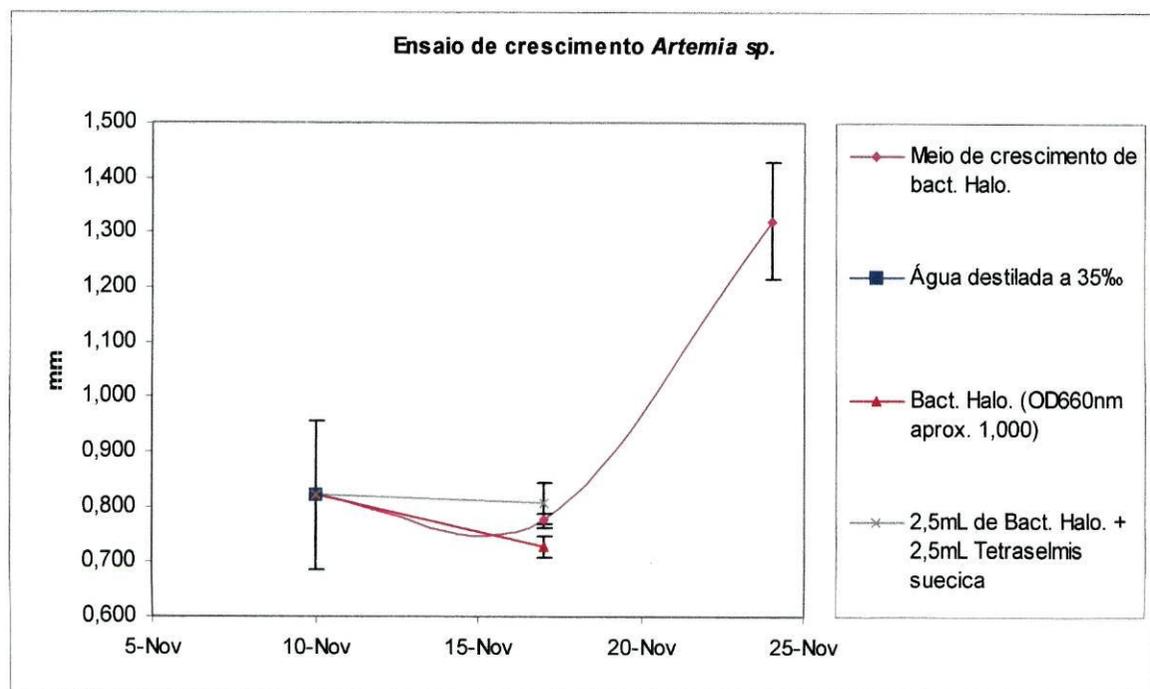


Figura 27. Comprimento médio de indivíduos de *Artemia sp.*, para quatro das dietas ensaiadas, DIETA A, DIETA B, DIETA D e DIETA F.

Como podemos constatar no gráfico da figura 27, as DIETAS D e F não apresentavam indivíduos suficientes ao fim de 14 dias para se poder proceder a uma amostragem significativa. Por isso, em termos de crescimento dos náuplios de *Artemia sp.*, podemos afirmar que a DIETA A é a que apresenta melhores resultados.

Relativamente ao desempenho da DIETA C, DIETA E, DIETA F e DIETA B, o gráfico da figura 28 ilustra os resultados obtidos. Registam-se ainda os desvios padrão das amostras sob a forma de semi rectas verticais.

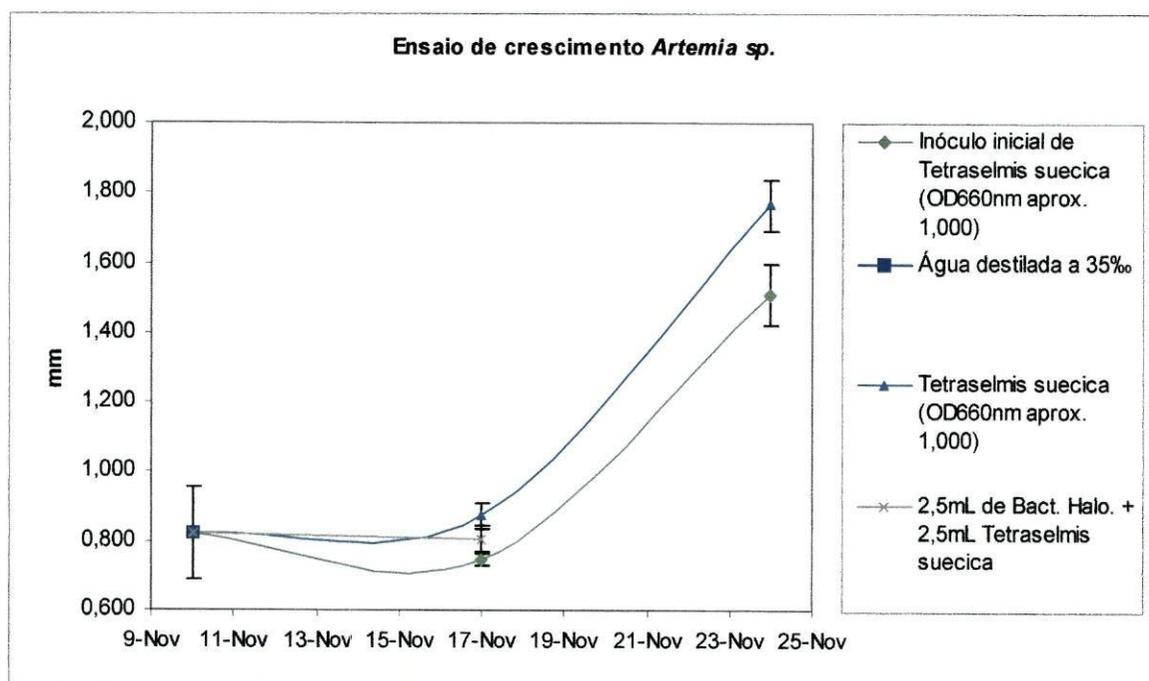


Figura 28. Comprimento médio de indivíduos de *Artemia sp.*, para quatro das dietas ensaiadas, DIETA C, DIETA B, DIETA E e DIETA F.

Para a dieta controlo (DIETA B), podemos verificar novamente que só aparece representado neste gráfico um valor (dia 10 de Novembro), pois na segunda amostragem realizada para medir o comprimento dos indivíduos (dia 17 de Novembro), já não existiam indivíduos vivos.

Observámos também que a DIETA F, não apresentava indivíduos suficientes ao fim de 14 dias para se poder proceder a uma amostragem significativa.

Podemos constatar ainda que, os indivíduos sujeitos à DIETA C, apresentam um tamanho médio no final do ensaio inferior aos indivíduos sujeitos à DIETA E. Tendo este facto já sido registado no primeiro ensaio por nós realizado.

A análise de variância realizada a estas duas populações, revela que as diferenças são estatisticamente significativas, podendo-se afirmar que a DIETA C, apresenta um valor de eficiência inferior ao da DIETA E. Como podemos verificar pelo valor de F (6,002945), superior ao valor de F crítico (3,921485), (tabela 19).

Tabela 19. Valores obtidos durante a Análise de Variância do Tipo I, realizada a duas dietas ensaiadas, DIETA C e DIETA E, respectivamente.

**De 17 a 24 de Novembro**  
**ANOVA: Factor único**

**SUMÁRIO**

<i>Grupos</i>	<i>Contagens</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
DIETA C	60	67,758	1,1293	0,152304
DIETA E	60	79,126	1,318767	0,206496

**ANOVA**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1,076929	1	1,076929	6,002945	0,01575	3,921485
Dentro de grupos	21,16921	118	0,1794			
Total	22,24613	119				

Resta então, comparar as dietas que melhores resultados obtiveram, nomeadamente, a adição de 5mL diários de meio complexo enriquecido ME250‰ (DIETA A) e a adição de 5mL diários de *T. suecica* (DIETA E). O gráfico da figura 29 representa o comprimento médio dos indivíduos sujeitos a essas duas dietas. Registam-se ainda os desvios padrão das amostras sob a forma de semi rectas verticais.

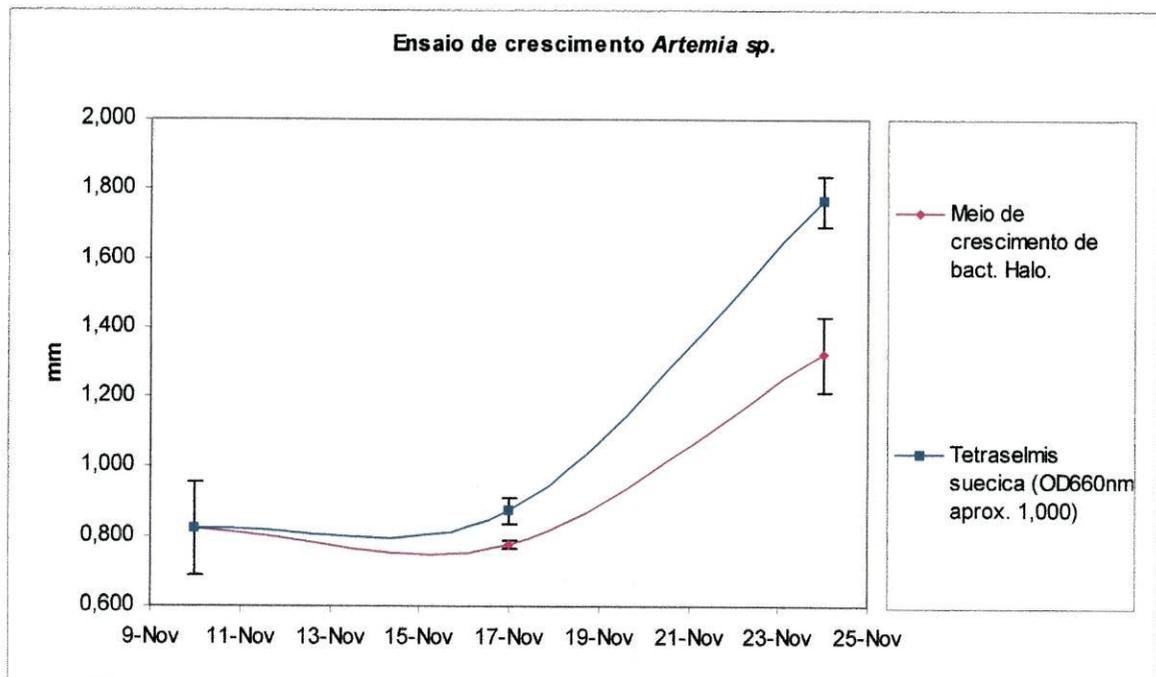


Figura 29. Comprimento médio de indivíduos de *Artemia sp.*, para quatro das dietas ensaiadas, DIETA A e DIETA E.

A análise dos resultados parece sugerir que as duas dietas alimentares apresentam diferenças significativas em termos de comprimento médio total dos indivíduos, ao longo do ensaio (tabela 20).

Tabela 20. Valores obtidos durante a Análise de Variância do Tipo I, realizada a duas dietas ensaiadas, DIETA E e DIETA A, respectivamente.

**De 17 a 24 de Novembro**  
**ANOVA: Factor único**

**SUMÁRIO**

<i>Grupos</i>	<i>Contagens</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
DIETA E	60	79,126	1,318767	0,206496
DIETA A	60	62,905	1,048417	0,081286

**ANOVA**

<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	2,192674	1	2,192674	15,23843	0,000158	3,921485
Dentro de grupos	16,97914	118	0,143891			
Total	19,17181	119				

O valor de F (15,23843) superior ao valor de F crítico (3,921485), indica que devemos aceitar a hipótese  $H_1$  e considerar que as amostras foram retiradas de populações normalmente distribuídas com médias iguais. Ou seja, as diferenças observadas são significativas.

No segundo ensaio, as dietas que melhores comprimentos totais apresentaram foram as DIETAS A, C e E. Mais concretamente, os organismos apresentam um comprimento total de  $1,321 \pm 0,106$ mm,  $1,511 \pm 0,089$ mm e  $1,766 \pm 0,073$ mm, respectivamente. Com a DIETA B, os organismos apresentaram um comprimento total de  $0,820 \pm 0,134$ m. Com a DIETA D, os organismos apresentaram um comprimento total de  $0,729 \pm 0,018$ mm e com a DIETA F, os organismos apresentaram um comprimento total de  $0,806 \pm 0,039$ mm.

Face a estes valores de comprimento total, podemos afirmar que as duas réplicas são concordantes em termos gerais. Sendo que a diferença no comprimento está relacionada com a diferença de idade (dias) verificadas entre os indivíduos amostrados.

JOHNSON, D. A., 1980, alimentou náuplios de *Artemia sp.* com diversas micro algas, tendo registado comprimentos de indivíduos com 3 e 7 dias de: 1,6mm e 6,2mm com *Dunaliella tertiolecta*; 1,4mm e 7,0mm com *Spirulina sp.*; 1,6mm e 3,0mm com *Enteromorpha sp.*; 1,9mm e 6,0mm com *Rhodotorula sp.*.

VIEIRA, N., 1989, refere um comprimento total de 11,5mm para indivíduos adultos alimentados com *Dunaliella salina* e *Dunaliella viridis*, e 10,5mm para indivíduos alimentados com *Tetraselmis sp.*. Sendo que estas culturas foram mantidas a temperaturas entre os 25 e os 28°C e níveis de oxigenação próximos da saturação.

FÁBREGAS, J., et. al., 1996, apresenta valores de comprimento total de adultos alimentados com *Tetraselmis suecica* entre 5,31mm e 8,30mm. Temperatura de 25°C e níveis de oxigenação próximos da saturação.

TRIANAPHYLLIDIS, G. V., et. al., 1997, introduz uma inovação na alimentação das suas culturas e além de alimentar os indivíduos com *Dunaliella tertiolecta*, adiciona um preparado de uma levedura (LANSY PZ). O meio renovado após 8 dias e depois de 3 em 5 dias, a temperatura de 25°C e um arejamento moderado, proporcionaram que o estado adulto tenha sido atingido ao fim de 30 a 40 dias com tamanhos entre 8,41mm e 12,37mm, nos machos e 10,99mm e 16,35mm, nas fêmeas.

Renovando o meio diariamente, NAEGEL, L. C. A., 1999, e alimentando os náuplios com *Chaetoceros sp.*, mantendo uma temperatura de 25°C e uma oxigenação intensa, conseguiu que as suas culturas atingissem o estado adulto ao fim de 11 dias. Observando comprimentos totais de 0,48mm em náuplios com 3 dias, 1,9mm em indivíduos com 7 dias e 4,64mm nos adultos.

THINH, L. V., et. al., 1999, registou comprimentos totais, respectivamente em náuplios com 24 horas e em indivíduos com 7 dias de: 0,75mm e 5,5mm quando alimentados com *Chaetoceros sp.*, *Skeletonema sp.*, *S. costatum* e *Nitzshia paleacea*; 0,92mm e 6,5mm quando alimentados com *Cryptomonas sp.*; 0,85mm e 3,5mm quando alimentados com *Nephroselmis sp.* e *Tetraselmis sp.*; 0,72mm e 4,5mm quando alimentados com *Isochrysis sp.*; e 0,81mm e 5,0mm quando alimentados com *Rhodorus sp.*

OLSEN, A. I., et. al., 2000, prefere *Isochrysis galbana* para alimentar os seus indivíduos em ensaio de 3 e 4 dias, registando comprimentos totais máximos de 1,30mm e 1,50mm, para 3 e 4 dias, respectivamente.

Utilizando, também *Isochrysis galbana* na alimentação dos seus náuplios, BURGA, R. E. C., 2002, consegue pré adultos com 4,81mm de comprimento total.

Utilizando micro algas como alimento para náuplios de *Artemia sp.*, mas omissos quanto ao tamanho observado nos indivíduos durante os ensaios, ROYAN, J. P., 1980, VERSICHELE, D. & SORGELOOS, P., 1980, VIEIRA, N., 1988, GONZÁLEZ, E. O., 1994 e BAERT, P., et al., 1997.

#### 4. CONCLUSÃO

De todos os meios ensaiados, o meio que revelou melhor eficácia foi o meio enriquecido ME250‰, registando uma absorvância máxima, ao fim de 47 dias em estufa a 38°C, de  $0,881 \pm 0,053$ . Essa eficácia ficou a dever-se à utilização de água dos cristalizadores de salinas ultra filtrada como factor de enriquecimento.

Os dois ensaios relativos à sobrevivência e ao crescimento de náuplios de *Artemia sp.* não decorreram nas mesmas condições ambientais. O primeiro ensaio decorreu sob condições mais favoráveis, nomeadamente, a temperatura ambiente era superior em cerca de 6°C ( $\pm 25^\circ\text{C}$  no primeiro ensaio contra os  $\pm 19^\circ\text{C}$  do segundo ensaio). E este facto, isoladamente ou em conjugação com outros factores, que não conseguimos controlar, condicionou as diferenças verificadas entre estes dois ensaios.

As dietas que melhores resultados apresentaram, foram as dietas compostas por meio enriquecido ME250‰ (DIETA A) e *Tetraselmis suecica* (DIETA E), 21 e 14 dias, respectivamente no primeiro e no segundo ensaio.

Em relação aos comprimentos totais dos indivíduos (desde o olho naupliar até à concavidade da furca), o primeiro ensaio voltou a apresentar valores superiores ao do segundo ensaio. Contudo, este factor está estritamente relacionado com as diferenças em idade (dias) entre os indivíduos amostrados no final dos dois ensaios, pois, os indivíduos amostrados no final do segundo ensaio eram entre 1 a 8 dias mais velhos que os do primeiro ensaio.

Novamente, se verificou que as dietas que melhores resultados registaram foram a DIETA A e a DIETA E, respectivamente com  $4,05 \pm 0,15\text{mm}$  e  $6,00 \pm 0,23\text{mm}$ , no primeiro ensaio e  $1,321 \pm 0,106\text{mm}$  e  $1,766 \pm 0,073\text{mm}$ , no segundo ensaio.

Este estudo devia ser continuado de modo a determinar a dinâmica de Halobactérias no meio natural, avaliando a sua relação ecológica, fisiológica e nutricional com *Artemia*. Também devia ser determinado o perfil de ácidos gordos polinsaturados e aminoácidos, quer em *Artemia* quer em Halobactérias, ficando assim completo o estudo da interacção bioquímica entre estes dois organismos.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- AMAT, F., BARATA, C., HONTORIA, F., NAVARRO, J. C. & VARÓ, I., 1995, Biogeography of the genus *Artemia* (Crustacea Branchiopoda, Anostraca) in Spain, *International Journal of Salt Lake Research*, 3:175 – 190.
- BAERT, P., ANH, N. T. N., QUYNH, V. D., HOA, N. V., & SORGELOOS, P., 1997, Increasing cyst yields in *Artemia* culture ponds in Vietnam: the multi-cycle system, *Aquaculture Research*, 28:809 – 814.
- BAITCHOROV, V. M., & NAGORSKAJA, L. L., 2000, The reproductive characteristics of *Artemia* in habitats of different salinity, *International Journal of Salt Lake Research*, 8:287 – 291.
- BARATA, C., HONTORIA, F., & AMAT FRANCISCO, 1996, Estimation of the biomass production of *Artemia* with regard to its use in aquaculture: temperature and strain effects, *Aquaculture*, 142:171 – 189.
- BASBUG, Y., & DEMIRKALP, F. Y., 1997, A note on the brine shrimp *Artemia* in Tuz Lake (Turkey), *Hydrobiologia*, 353:45 – 51.
- BROWN, M. R., JEFFREY, S. W., VOLKMAN, J. K., & DUNSTAN, G. A., 1997, Nutritional properties of microalgae for mariculture, *Aquaculture*, 151:315 – 331.
- BROWNE, R. A., SORGELOOS, P. & TROTMAN, C. N. A., 1991, *Artemia Biology*, CRC Press, Boston.
- BURGA, R. E. C., 2002, Producción semi-intensiva de biomasa de *Artemia franciscana* kellogg 1906 (cepa Virrilá, Perú) utilizando diferentes dietas, Tesis de Maestría en Recursos Acuáticos, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Peru.
- DOBBLIER, J., ADAM, N., BOSSUYT, E., BRUGGEMAN, E., & SORGELOOS, P., 1980, New Aspects of the use of Inert Diets for High Density Culturing of Brine Shrimp, *The Brine Shrimp Artemia*, Vol. 3, 165 – 174, Universa Press, Wetteren, Belgium.

- DWIVEDI, S. N., ANSARI, S. K. R. & AHMED, M. Q., 1980, Mass Culture of Brine Shrimp Under Controlled Conditions in Cement Pools at Bombay, India, *The Brine Shrimp Artemia*, Vol. 3, 175 – 183, Universa Press, Wetteren, Belgium.
- DYALL-SMITH, M., 2000, *The Halohandbook: Protocols for halobacterial genetics*, Ver. 3, Haloarchaeal Genetics Laboratory, Department of Microbiology and Immunology, University of Melbourne, Australia.
- ESTÉVEZ, A., MCEVOY, L. A., BELL, J. G., & SARGENT, J. R., 1998, Effects of temperature and starvation time on the pattern and rate of loss of essential fatty acids in *Artemia nauplii* previously enriched using arachidonic acid and eicosapentaenoic acid-rich emulsions, *Aquaculture*, 165: 295 – 311.
- FÁBREGAS, J., OTERO, A., MORALES, E., CORDERO B., & PATIÑO, M., 1996, *Tetraselmis suecica* cultured in different nutrient concentrations varies in nutritional value to *Artemia*, *Aquaculture*, 143:197 – 204.
- FOWLER, J., & COHEN, L., 1994, *Practical Statistics for Field Biology*, John Wiley & Sons, Chichester.
- FOX, R., 2001, *Artemia sp.*, *Invertebrate Zoology, Laboratory Exercises*, Lander University.
- GARCÍA - ORTEGA, A., VERRETH, J. A. J., COUTTEAU, P., SEGNER, H., HUISMAN, E. A., & SORGELOOS, P., 1998, Biochemical and enzymatic characterization of decapsulated cysts and nauplii of the brine shrimp *Artemia* at different developmental stages, *Aquaculture*, 161:501 – 514.
- GONZÁLEZ, E. O., RAMÍREZ, L. F. & HERRERA, F. D., 1994, An Energy budget for *Artemia franciscana* under Laboratory Conditions, *International Journal of Salt Lake Research*, 3: 1 – 7.
- HELLAND, S., TERJESEN, B., & BERG, L., 2003, Free amino acid and protein content in the planktonic copepod *Temora longicornis* compared to *Artemia franciscana*, *Aquaculture*, 215:213 – 228.

- JOHNSON, D. A., 1980, Evaluation of Various Diets for Optimal Growth and Survival of Selected Life Stages of Artemia, *The Brine Shrimp Artemia*, Vol. 3, 185 – 192, Universa Press, Wetteren, Belgium.
- KOLKOVKI, S., CZESNY, S., YACKEY, C., MOREAU, R., CIHLA, F., MAHAN, D. & DABROWSKI, K., 2000, The effect of vitamins C and E in (n-3) highly unsaturated fatty acids-enriched Artemia nauplii on growth, survival, and stress resistance of fresh water walleye *Stizostedion vitreum* larvae, *Aquaculture Nutrition*, 6: 199 – 206.
- LEE, S. Y., CHANG, H. N., UM, Y. S., & HONG, S. H., 1998, Bacteriorhodopsin production by cell recycle culture of Halobacterium halobium, *Biotechnology Letters*, Vol. 20, 8: 763 – 765.
- MALDONADO-MONTIEL, T. D. N. J., RODRÍGUEZ-CANCHÉ, L. G. & OLVERA-NOVOA, M. A., 2003, Evaluation of Artemia biomass production in San Crisanto, Yucatán, México, with the use of poultry manure as organic fertilizer, *Aquaculture*, 219:573 – 584.
- MCEVOY, L. A., NAVARRO, J. C., AMAT, F. & SARGENT, J. R., 1997, Application of Soya Phosphatidylcholine en Tuna Orbital Oil Enrichment Emulsions for Artemia, *Aquaculture International*, 5:517 – 526.
- NAEGEL, L. C. A., 1999, Controlled production of Artemia biomass using an inert commercial diet, compared with the micro algae Chaetoceros, *Aquaculture Engineering*, 21:49 – 59.
- NAVARRO, J. C., OLIVARES, J. M., HONTORIA, F., VIEIRA, N., & AMAT, F., 2002, Factors Conditioning the Nutritional Value of Artemia Cysts: Effect of Diet, Unpublished Paper.
- OLSEN, A., I., MÆLAND, A., WAAGBØ & OLSEN, Y., 2000, Effect of algal addition on stability of fatty acids and some water-soluble vitamins in juvenile Artemia sp., *Aquaculture Nutrition*, 6: 263 – 273.

- OREN, A., 1994, Characterization of the Halophilic Archaeal Community in Saltern Crystalliser Ponds by Means of Polar Lipid analysis, *International Journal of Salt Lake Research*, 3: 15 – 29.
- OREN, A., & LITCHFIELD, C. D., 1999, A procedure for the enrichment and isolation of Halobacterium, *FEMS Microbiology Letters*, 173:353 – 358.
- OREN, A., & RODRÍGUEZ – VALERA, F., 2001, The contribution of halophilic Bacteria to the red coloration of saltern crystallizer ponds, *FEMS Microbiology Ecology*, 36:123 – 130.
- OREN, A., 2002, Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria, *FEMS Microbiology Ecology*, 39:1 – 7.
- OROZCO - MEDINA, C., MAEDA-MARTÍNEZ, A. M., & LÓPEZ-CORTÉS, A., 2002, Effect of aerobic Gram-positive heterotrophic bacteria associated with *Artemia franciscana* cysts on the survival and development of its larvae, *Aquaculture*, 213: 15 – 29.
- PEDRÓS-ALIÓ, C., CALDERÓN-PAZ, J. I., MACLEAN, M. H., MEDINA, G., MARRASÉ, C., GASOL, J. M., & GUIXA-BOIXEREU, N., 2000, The microbial food web along salinity gradients, *FEMS Microbiology Ecology*, 32:143 – 155.
- PERSOONE, G. & SORGELOOS, P., 1980, General Aspects of the Ecology and Biogeography of Artemia, *The Brine Shrimp Artemia*, Vol. 3, 3 – 4, Universa Press, Wetteren, Belgium.
- PRASAD, M. M., & SEENAYYA, G., 2000, Effect of spices on the growth of red halophilic cocci isolated from salt cured fish and solar salt, *Food Research International*, 33:793 – 798.
- ROYAN, J. P., 1980, Laboratory and Field Studies on an Indian Strain of the Brine Shrimp Artemia, *The Brine Shrimp Artemia*, Vol. 3, 223 – 230, Universa Press, Wetteren, Belgium.

- SAVAGE, A., & KNOTT B., 1998, *Artemia parthenogenetica* in Lake Hayward, Western Australia. II. Feeding biology in a shallow, seasonally stratified, hypersaline lake, *International Journal of Salt Lake Research*, 7:13 – 24.
- STAN-LOTTER, H., PFAFFENHUEMER, M., LEGAT, ANDREA, BUSSE, H. J., RADAX, C., & GRUBER, C., 2002, *Halococcus dombrowskii* s.p. nov., an Archeal Isolate from a Permian Alpine Salt deposit, *IJSEM Papers in Press*, Salzburg.
- THINH, L. V., RENAUD, S. M., & PARRY, D. L., 1999, Evaluation of recently isolated Australian tropical microalgae for the enrichment of the dietary value of brine shrimp, *Artemia nauplii*, *Aquaculture*, 170:161 – 173.
- TRIANAPHYLLIDIS, G. V., CRIEL, G. R. J., ABATZOPOULOS, T. J., & SORGeloos, P., 1997, International study on Artemia. LIII. Morphological study of Artemia with emphasis to Old World strains. I. Bisexual populations, *Hydrobiologia*, 357:139 – 153.
- VANHAECKE, P. & SORGeloos, P., 1980, International Study on Artemia IV: The Biometrics of Artemia Strains from Different Geographical Origin, *The Brine Shrimp Artemia*, Vol. 3, 393 – 405, Universa Press, Wetteren, Belgium.
- VERSICHELE, D. & SORGeloos, P., 1980, Controlled Production of Artemia Cysts in Batch Cultures, *The Brine Shrimp Artemia*, Vol. 3, 231 – 246, Universa Press, Wetteren, Belgium.
- VIEIRA, N., 1988, First Extensive Culture Essays of Artemia SP. in Aveiro, Publicações do Instituto de Zoologia Dr. Augusto Nobre, Faculdade de Ciências do Porto, N.º 201.
- VIEIRA, N., 1989, Contribuição para o conhecimento da biologia de Artemia s.p. proveniente das salinas de Aveiro. Sua importância em aquacultura e na dinâmica daquele ecossistema, Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto.

VILHELMSSON, O., HAFSTEINSSON, H., KRISTJÁNSSON, J. K., 1997, Extremely halotolerant bacteria characteristic of fully cured and dried cod, *International Journal of Food Microbiology*, 36:163 – 170.

ZMORA, O., AVITAL, E., & GORDIN, H., 2002, Results of an attempt for mass production of *Artemia* in extensive ponds, *Aquaculture*, 213:395 – 400.

## 6. ANEXOS

**Tabela I** - Valores obtidos durante o ensaio do meio de cultura simples MS250%.

Meio de cultura	Referência	OD 520nm				
MS 250% com inóculo	C1	0,091	0,146	0,216	0,253	0,260
MS 250% com inóculo	C1R2	0,064	0,151	0,220	0,243	0,266
	Média	<b>0,078</b>	<b>0,149</b>	<b>0,218</b>	<b>0,248</b>	<b>0,263</b>
	SD	0,019	0,004	0,003	0,007	0,004
Controlo	CNTR1	0,069	0,071	0,077	0,073	0,076
Controlo	CNTR2	0,071	0,070	0,073	0,070	0,075
	Média	<b>0,070</b>	<b>0,071</b>	<b>0,075</b>	<b>0,072</b>	<b>0,076</b>
	SD	0,001	0,001	0,003	0,002	0,001
	DATA:	06-Fev	10-Fev	13-Fev	17-Fev	20-Fev

Meio de cultura	Referência	OD 520nm		
MS 250% com inóculo	C1	0,247	0,231	0,229
MS 250% com inóculo	C1R2	0,280	0,247	0,242
	Média	<b>0,264</b>	<b>0,239</b>	<b>0,236</b>
	SD	0,023	0,011	0,009
Controlo	CNTR1	0,074	0,070	0,071
Controlo	CNTR2	0,068	0,065	0,069
	Média	<b>0,071</b>	<b>0,068</b>	<b>0,070</b>
	SD	0,004	0,004	0,001
	DATA:	24-Fev	27-Fev	03-Mar

**Tabela II** - Valores obtidos durante o ensaio do meio de cultura complexo MC156‰.

Meio de cultura	Referência	OD 520nm				
MC 156‰ com inóculo colónias vermelhas	1	0,154	0,898	1,131	1,197	1,539
MC 156‰ com inóculo colónias vermelhas	2	0,176	1,048	1,664	1,770	1,855
MC 156‰ com inóculo colónias vermelhas	3	0,161	0,752	1,002	1,109	1,233
	Média	<b>0,164</b>	<b>0,899</b>	<b>1,266</b>	<b>1,359</b>	<b>1,542</b>
	SD	0,011	0,148	0,351	0,359	0,311
Controlo	CNT1	0,168	0,180	0,178	0,178	0,179
Controlo	CNT2	0,163	0,177	0,175	0,171	0,175
	Média	<b>0,166</b>	<b>0,179</b>	<b>0,177</b>	<b>0,175</b>	<b>0,177</b>
	SD	0,004	0,002	0,002	0,005	0,003
	DATA:	24-Abr	28-Abr	5-Mai	8-Mai	12-Mai

Meio de cultura	Referência	OD 520nm		
MC 156‰ com inóculo colónias vermelhas	1	1,604	1,540	1,533
MC 156‰ com inóculo colónias vermelhas	2	1,804	1,754	1,745
MC 156‰ com inóculo colónias vermelhas	3	1,430	1,355	1,349
	Média	<b>1,613</b>	<b>1,550</b>	<b>1,542</b>
	SD	0,187	0,200	0,198
Controlo	CNT1	0,177	0,178	0,180
Controlo	CNT2	0,174	0,177	0,177
	Média	<b>0,176</b>	<b>0,178</b>	<b>0,179</b>
	SD	0,002	0,001	0,002
	DATA:	15-Mai	19-Mai	22-Mai

**Tabela III** - Valores obtidos durante o ensaio do meio de cultura complexo MC250%.

Descrição	Referência	OD 520nm				
MC 250‰ com inóculo colónias vermelhas	1	0,080	0,094	0,078	0,129	0,419
MC 250‰ com inóculo colónias vermelhas	2	0,079	0,066	0,088	0,176	0,398
MC 250‰ com inóculo colónias vermelhas	3	0,079	0,079	0,071	0,152	0,277
	Média	<b>0,079</b>	<b>0,080</b>	<b>0,079</b>	<b>0,152</b>	<b>0,365</b>
	SD	0,001	0,014	0,009	0,024	0,077
Controlo	CNT	0,077	0,072	0,066	0,069	0,068
Controlo	CNT2	0,081	0,077	0,070	0,074	0,077
	Média	<b>0,079</b>	<b>0,075</b>	<b>0,068</b>	<b>0,072</b>	<b>0,073</b>
	SD	0,003	0,004	0,003	0,004	0,006

DATA: 10-Abr 14-Abr 24-Abr 28-Abr 5-Mai

Descrição	Referência	OD 520nm			
MC 250‰ com inóculo colónias vermelhas	1	0,613	0,767	0,864	0,852
MC 250‰ com inóculo colónias vermelhas	2	0,473	0,580	0,614	0,646
MC 250‰ com inóculo colónias vermelhas	3	0,355	0,456	0,516	0,667
	Média	<b>0,480</b>	<b>0,601</b>	<b>0,665</b>	<b>0,722</b>
	SD	0,129	0,157	0,179	0,113
Controlo	CNT	0,070	0,072	0,069	0,075
Controlo	CNT2	0,078	0,082	0,080	0,084
	Média	<b>0,074</b>	<b>0,077</b>	<b>0,075</b>	<b>0,080</b>
	SD	0,006	0,007	0,008	0,006

DATA: 8-Mai 12-Mai 15-Mai 22-Mai

Descrição	Referência	OD 520nm			
MC 250‰ com inóculo colónias vermelhas	1	0,832	0,825	0,802	0,789
MC 250‰ com inóculo colónias vermelhas	2	0,633	0,635	0,628	0,612
MC 250‰ com inóculo colónias vermelhas	3	0,715	0,762	0,757	0,745
	Média	<b>0,727</b>	<b>0,741</b>	<b>0,729</b>	<b>0,715</b>
	SD	0,100	0,097	0,090	0,092
Controlo	CNT	0,075	0,070	0,069	0,071
Controlo	CNT2	0,087	0,088	0,088	0,085
	Média	<b>0,081</b>	<b>0,079</b>	<b>0,079</b>	<b>0,078</b>
	SD	0,008	0,013	0,013	0,010

DATA: 26-Mai 29-Mai 2-Jun 5-Jun

**Tabela IV** - Valores obtidos durante o ensaio do meio de cultura enriquecido ME250%.

Descrição	Referência	OD 520nm				
50mL de água dos cristalizadores filtrada com inóculo de colônias vermelhas	MCAFCSA1	0,059	0,088	0,069	0,069	0,060
50mL de água dos cristalizadores filtrada com inóculo de colônias vermelhas	MCAFCSA2	0,059	0,059	0,057	0,057	0,061
50mL de água dos cristalizadores filtrada com inóculo de colônias vermelhas	MCAFCSA3	0,065	0,061	0,062	0,062	0,065
	Média	<b>0,061</b>	<b>0,069</b>	<b>0,063</b>	<b>0,063</b>	<b>0,062</b>
	SD	0,003	0,016	0,006	0,006	0,003
40mL de água dos cristalizadores filtrada + 10mL meio de cresc. 250 c/ inóc. de col. verm.	MC250AF1	0,084	0,063	0,063	0,301	0,361
40mL de água dos cristalizadores filtrada + 10mL meio de cresc. 250 c/ inóc. de col. verm.	MC250AF2	0,089	0,068	0,068	0,258	0,337
40mL de água dos cristalizadores filtrada + 10mL meio de cresc. 250 c/ inóc. de col. verm.	MC250AF3	0,063	0,062	0,062	0,268	0,349
	Média	<b>0,079</b>	<b>0,064</b>	<b>0,064</b>	<b>0,276</b>	<b>0,349</b>
	SD	0,014	0,003	0,003	0,023	0,012
	DIAS:	1	5	8	12	15

Descrição	Referência	OD 520nm				
50mL de água dos cristalizadores filtrada com inóculo de colônias vermelhas	MCAFCSA1	0,060	0,060	0,059		
50mL de água dos cristalizadores filtrada com inóculo de colônias vermelhas	MCAFCSA2	0,071	0,062	0,060		
50mL de água dos cristalizadores filtrada com inóculo de colônias vermelhas	MCAFCSA3	0,059	0,064	0,061		
	Média	<b>0,063</b>	<b>0,062</b>	<b>0,060</b>		
	SD	0,007	0,002	0,001		
40mL de água dos cristalizadores filtrada + 10mL meio de cresc. 250 c/ inóc. de col. verm.	MC250AF1	0,369	0,341	0,341	0,436	0,531
40mL de água dos cristalizadores filtrada + 10mL meio de cresc. 250 c/ inóc. de col. verm.	MC250AF2	0,334	0,315	0,315	0,399	0,460
40mL de água dos cristalizadores filtrada + 10mL meio de cresc. 250 c/ inóc. de col. verm.	MC250AF3	0,349	0,304	0,304	0,391	0,458
	Média	<b>0,351</b>	<b>0,320</b>	<b>0,320</b>	<b>0,409</b>	<b>0,483</b>
	SD	0,018	0,019	0,019	0,024	0,042
	DIAS:	19	22	25	26	29

**Tabela IV** - Valores obtidos durante o ensaio do meio de cultura enriquecido ME250‰ (continuação).

Descrição	Referência	OD 520nm				
50mL de água dos cristalizadores filtrada com inóculo de colônias vermelhas	MCAFCSA1					
50mL de água dos cristalizadores filtrada com inóculo de colônias vermelhas	MCAFCSA2					
50mL de água dos cristalizadores filtrada com inóculo de colônias vermelhas	MCAFCSA3					
	Média					
	SD					
40mL de água dos cristalizadores filtrada + 10mL meio de cresc. 250 c/ inóc. de col. verm.	MC250AF1	0,638	0,673	0,873	0,874	0,921
40mL de água dos cristalizadores filtrada + 10mL meio de cresc. 250 c/ inóc. de col. verm.	MC250AF2	0,588	0,603	0,857	0,864	0,902
40mL de água dos cristalizadores filtrada + 10mL meio de cresc. 250 c/ inóc. de col. verm.	MC250AF3	0,567	0,591	0,641	0,799	0,821
	Média	<b>0,598</b>	<b>0,622</b>	<b>0,790</b>	<b>0,846</b>	<b>0,881</b>
	SD	0,036	0,044	0,130	0,041	0,053
	DIAS:	33	36	40	43	47

Descrição	Referência	OD 520nm		
50mL de água dos cristalizadores filtrada com inóculo de colônias vermelhas	MCAFCSA1			
50mL de água dos cristalizadores filtrada com inóculo de colônias vermelhas	MCAFCSA2			
50mL de água dos cristalizadores filtrada com inóculo de colônias vermelhas	MCAFCSA3			
	Média			
	SD			
40mL de água dos cristalizadores filtrada + 10mL meio de cresc. 250 c/ inóc. de col. verm.	MC250AF1	0,906	0,869	0,865
40mL de água dos cristalizadores filtrada + 10mL meio de cresc. 250 c/ inóc. de col. verm.	MC250AF2	0,889	0,856	0,849
40mL de água dos cristalizadores filtrada + 10mL meio de cresc. 250 c/ inóc. de col. verm.	MC250AF3	0,804	0,788	0,778
	Média	<b>0,866</b>	<b>0,838</b>	<b>0,831</b>
	SD	0,055	0,044	0,046
	DIAS:	50	54	57

**Tabela V** - Valores obtidos durante o primeiro ensaio de sobrevivência com *Artemia sp.*.

Amostragens de 2mL de náuplios eclodidos

8	Média
12	<b>9,60</b>
11	SD
7	2,5033
9	
2-Out	
15	
10	
7	
9	
8	

Amostragens de 20mL para determinar o número de indivíduos em cada frasco

DATA	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	D1	D2	D3	E1	E2	E3	
	2	3	2	Média	1	1	1	Média	2	1	2	Média	1	1	1	Média
	2	2	3	<b>2,27</b>	0	1	1	<b>0,93</b>	2	2	2	<b>1,33</b>	1	1	1	<b>1,20</b>
	2	3	2	SD	1	1	1	SD	1	1	2	SD	0	1	1	SD
	2	2	3	0,45	1	0	1	0,37	1	1	1	0,48	1	1	2	0,48
6-Out	3	2	2		1	1	1		2	1	1		2	2	1	
	3	2	2		1	1	1		1	1	1		1	1	2	
	2	2	2		1	1	1		1	2	1		1	1	1	
	2	3	2		1	1	2		1	1	2		1	1	2	
	2	2	2		0	1	1		1	1	2		2	1	1	
	2	3	2		1	1	1		1	1	1		1	1	2	
	2	2	2	Média	0	0	0	Média	2	1	2	Média	1	1	1	Média
	2	2	2	<b>1,87</b>	0	0	0	<b>0,00</b>	2	1	1	<b>1,47</b>	1	1	1	<b>1,07</b>
	2	1	2	SD	0	0	0	SD	1	2	2	SD	1	1	1	SD
	2	1	2	0,43	0	0	0	0,00	1	2	2	0,51	1	1	1	0,25
13-Out	2	2	2		0	0	0		2	2	1		1	2	1	
	1	2	1		0	0	0		1	1	1		1	1	1	
	2	2	2		0	0	0		2	1	2		2	1	1	
	2	1	2		0	0	0		1	1	2		1	1	1	
	2	2	2		0	0	0		2	1	2		1	1	1	
	3	2	2		0	0	0		1	1	1		1	1	1	
	1	1	1	Média	0	0	0	Média	2	1	1	Média	1	1	1	Média
	1	1	2	<b>1,60</b>	0	0	0	<b>0,00</b>	1	1	1	<b>1,20</b>	1	1	1	<b>0,93</b>
	1	2	2	SD	0	0	0	SD	2	1	2	SD	1	1	1	SD
	2	2	2	0,50	0	0	0	0,00	1	1	1	0,48	1	1	1	0,37
16-Out	1	2	2		0	0	0		1	1	1		1	0	0	
	2	2	2		0	0	0		1	0	1		0	1	1	
	2	1	2		0	0	0		1	1	2		1	2	1	
	2	1	1		0	0	0		1	1	1		1	1	1	
	2	2	1		0	0	0		2	2	2		1	1	1	
	2	2	1		0	0	0		1	1	1		1	1	1	

**Tabela V** - Valores obtidos durante o primeiro ensaio de sobrevivência com *Artemia sp.* (continuação).

Amostragens de 20mL para determinar o número de indivíduos em cada frasco

DATA	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	D1	D2	D3	E1	E2	E3			
	1	1	2	Média			1	1	1	Média			0	1	1	Média		
	1	1	2	<b>1,33</b>			1	0	1	<b>0,93</b>			0	1	0	<b>0,53</b>		
	1	2	1	SD			1	0	0	SD			0	1	1	SD		
	2	2	2	0,48			1	1	1	0,37			0	1	1	0,51		
20-Out	1	1	2				1	1	1				0	0	1			
	1	2	1				1	1	1				0	0	0			
	2	1	1				1	1	1				1	0	1			
	2	1	1				1	1	1				1	1	0			
	1	1	1				2	1	1				1	1	0			
	1	1	1				1	1	1				1	0	1			
	0	0	0	Média			0	1	0	Média			0	0	0	Média		
	0	0	1	<b>0,27</b>			0	0	0	<b>0,13</b>			0	0	0	<b>0,00</b>		
	1	1	0	SD			0	0	0	SD			0	0	0	SD		
	0	1	1	0,45			0	0	1	0,35			0	0	0	0,00		
23-Out	0	0	1				0	0	0				0	0	0			
	0	0	0				0	0	0				0	0	0			
	0	0	0				0	0	0				0	0	0			
	0	0	0				0	0	0				0	0	0			
	1	1	0				1	0	1				0	0	0			
	0	0	0				0	0	0				0	0	0			
	0	0	0	Média			0	0	0	Média			0	0	0	Média		
	0	0	0	<b>0,00</b>			0	0	0	<b>0,00</b>			0	0	0	<b>0,00</b>		
	0	0	0	SD			0	0	0	SD			0	0	0	SD		
	0	0	0	0,00			0	0	0	0,00			0	0	0	0,00		
27-Out	0	0	0				0	0	0				0	0	0			
	0	0	0				0	0	0				0	0	0			
	0	0	0				0	0	0				0	0	0			
	0	0	0				0	0	0				0	0	0			
	0	0	0				0	0	0				0	0	0			
	0	0	0				0	0	0				0	0	0			

**Tabela VI** - Valores resumo das amostragens relativas ao primeiro ensaio de sobrevivência com *Artemia sp.*.

Dietas Alimentares (5mL/dia)		Número de <i>Artemia</i> por frasco (2L)						
Meio de crescimento de Halobact.	Média	<b>240</b>	<b>227</b>	<b>187</b>	<b>160</b>	<b>133</b>	<b>27</b>	<b>0</b>
	SD corr	63	45	43	50	48	45	0
Água destilada a 35‰	Média	<b>240</b>	<b>93</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	SD corr	63	37	0	0	0	0	0
Inóculo inicial de Tetraselmis suecica (OD <sub>660nm</sub> aprox. 1,000)	Média	<b>240</b>	<b>133</b>	<b>147</b>	<b>120</b>	<b>93</b>	<b>13</b>	<b>0</b>
	SD corr	63	48	51	48	37	35	0
Halobact. (OD <sub>660nm</sub> aprox. 1,000)	Média	<b>240</b>	<b>120</b>	<b>107</b>	<b>93</b>	<b>53</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	SD corr	63	48	25	37	51	0	0
Tetraselmis suecica (OD <sub>660nm</sub> aprox. 1,000)	Média	<b>240</b>	<b>133</b>	<b>160</b>	<b>93</b>	<b>53</b>	<b>13</b>	<b>0</b>
	SD corr	63	48	50	45	57	35	0
<b>DATA:</b>		2-Out	6-Out	13-Out	16-Out	20-Out	23-Out	27-Out

**Tabela VII** - Valores do comprimento total (em mm), obtidos durante o primeiro ensaio com *Artemia sp.*

Medições dos náuplios inoculados em cada frasco

<1 Média  
<1 <1  
<1 SD  
<1 0,000  
<1  
<1  
<1  
<1  
<1  
<1

Medições dos indivíduos amostrados	Meio de crescimento de bact. Halo.			Água destilada a 35‰			Inóculo inicial de Tetraselmis suecica (OD660nm aprox. 1,000)			Bact. Halo. (OD660nm aprox. 1,000)			Tetraselmis suecica (OD660nm aprox. 1,000)							
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	D1	D2	D3	E1	E2	E3					
6-Out	1,0	1,0	1,0	Média	1,0	1,0	1,0	Média	1,0	1,0	1,0	Média	1,0	1,0	1,0	Média	1,0	1,0	1,0	
	1,0	1,0	1,0	<b>1,07</b>	1,0	1,0	1,0	<b>1,02</b>	1,0	1,0	1,0	<b>1,03</b>	1,0	1,0	1,0	<b>1,03</b>	1,0	1,0	1,0	<b>1,05</b>
	1,0	1,0	1,0	SD	1,0	1,0	1,0	SD	1,0	1,0	1,0	SD	1,0	1,0	1,0	SD	1,0	1,0	1,0	SD
	1,5	1,5	1,5	0,17	1,0	1,0	1,0	0,09	1,5	1,0	1,0	0,13	1,0	1,0	1,0	0,13	1,0	1,0	1,0	0,15
	1,0	1,5	1,0		1,0	1,0	1,0		1,5	1,0	1,0		1,0	1,0	1,0		1,0	1,0	1,0	
	1,0	1,0	1,0		1,5	1,0	1,0		1,0	1,0	1,0		1,0	1,0	1,0		1,0	1,0	1,5	
	1,0	1,0	1,0		1,0	1,0	1,0		1,0	1,0	1,0		1,0	1,5	1,0		1,0	1,0	1,0	
	1,0	1,0	1,0		1,0	1,0	1,0		1,0	1,0	1,0		1,0	1,5	1,0		1,0	1,0	1,5	
	1,0	1,0	1,0		1,0	1,0	1,0		1,0	1,0	1,0		1,0	1,0	1,0		1,0	1,0	1,5	
	1,0	1,0	1,0		1,0	1,0	1,0		1,0	1,0	1,0		1,0	1,0	1,0		1,0	1,0	1,0	
13-Out	2,0	2,0	2,5	Média					3,0	3,5	3,0	Média	2,0	2,5	2,0	Média	3,0	2,5	2,5	Média
	2,0	2,5	2,0	<b>2,20</b>					3,5	3,5	3,0	<b>3,18</b>	2,5	2,5	2,0	<b>2,25</b>	3,0	3,0	3,0	<b>2,83</b>
	2,5	2,5	2,0	SD					3,0	3,0	3,5	SD	2,5	2,0	2,5	SD	3,0	3,0	3,0	SD
	2,0	2,0	2,0	0,25					3,0	3,0	3,5	0,25	2,0	2,5	2,5	0,25	3,0	3,0	3,0	0,27
	2,5	2,0	2,0						3,0	3,0	3,5		2,0	2,5	2,5		2,5	3,0	2,5	
	2,0	2,5	2,0						3,0	3,0	3,5		2,0	2,5	2,5		3,0	3,0	3,0	
	2,0	2,0	2,5						3,0	3,0	3,5		2,0	2,0	2,0		3,0	2,5	3,0	
	2,0	2,0	2,5						3,0	3,0	3,0		2,0	2,5	2,0		3,0	2,5	3,0	
	2,0	2,5	2,5						3,0	3,5	3,0		2,0	2,5	2,5		2,5	3,0	2,5	
	2,0	2,5	2,5						3,0	3,5	3,5		2,0	2,0	2,5		2,0	3,0	3,0	
16-Out	3,0	3,0	3,0	Média					3,0	3,5	3,5	Média	4,0	2,0	4,0	Média	3,0	2,5	2,5	Média
	2,5	3,0	4,0	<b>2,82</b>					4,5	3,0	3,0	<b>3,50</b>	3,0	4,0	3,0	<b>3,15</b>	2,5	3,0	2,5	<b>2,72</b>
	3,0	2,5	2,5	SD					3,0	3,5	4,0	SD	4,0	3,0	2,0	SD	3,0	3,0	2,5	SD
	3,0	3,0	2,0	0,58					3,5	3,5	4,0	0,45	3,0	3,5	3,0	0,56	3,0	2,5	2,0	0,36
	3,0	4,0	3,0						4,0	3,5	4,5		3,0	3,0	3,0		2,5	2,5	2,5	
	2,0	3,0	2,0						3,5	3,5	3,5		3,0	3,0	3,0		3,0	2,5	2,0	
	3,0	3,0	3,0						3,0	4,0	3,0		4,0	3,0	3,0		3,0	2,5	2,5	
	2,0	3,0	3,0						3,0	3,0	3,5		4,0	4,0	3,0		3,5	3,0	2,5	
	3,0	3,0	2,0						4,0	4,0	3,5		3,0	3,0	2,5		3,0	3,0	2,5	
	4,0	2,0	2,0						3,0	3,0	3,5		3,0	3,0	2,5		3,0	3,5	2,5	

**Tabela VII** - Valores do comprimento total (em mm), obtidos durante o primeiro ensaio com *Artemia sp.* (cont.).

Medições dos indivíduos amostrados	Meio de crescimento de bact. Halo.			Água destilada a 35‰	Inóculo inicial de Tetraselmis suecica (OD660nm aprox. 1,000)			Bact. Halo. (OD660nm aprox. 1,000)			Tetraselmis suecica (OD660nm aprox. 1,000)					
20-Out	4,0	4,5	4,5	Média	3,0	3,0	3,0	Média	3,5	3,5	3,5	Média	4,5	4,5	4,5	Média
	4,5	4,0	4,0	<b>4,25</b>	3,0	3,5	3,5	<b>3,22</b>	3,0	3,5	3,0	<b>3,37</b>	4,0	4,0	4,0	<b>4,37</b>
	4,5	4,0	4,0	SD	3,5	3,0	3,0	SD	3,5	3,5	4,0	SD	4,0	4,5	4,5	SD
	4,0	4,5	4,0	0,29	3,0	3,0	3,0	0,25	3,0	3,0	3,5	0,29	4,5	4,5	4,5	0,35
	4,5	5,0	4,0		3,0	3,5	3,0		3,0	3,0	3,5		4,0	5,0	4,5	
	4,0	4,5	4,0		3,0	3,0	3,5		3,0	3,5	3,5		4,0	4,5	4,5	
	4,0	4,0	4,5		3,0	3,5	3,5		3,0	3,5	3,5		4,0	4,5	4,0	
	4,5	4,5	4,0		3,0	3,5	3,0		3,5	3,5	3,5		3,5	5,0	4,5	
	4,5	4,0	4,5		3,5	3,5	3,5		3,0	4,0	3,5		5,0	4,5	4,5	
	4,0	4,0	4,5		3,5	3,5	3,0		3,0	3,5	3,5		4,5	4,0	4,5	
23-Out	4,0	4,0	4,0	Média	3,0	3,0	3,0	Média					6,0	6,0	6,0	Média
	4,5	4,0	4,5	<b>4,05</b>	3,0	3,5	3,0	<b>3,05</b>					6,0	6,0	6,0	<b>6,00</b>
	4,0	4,0	4,0	SD	3,0	3,0	3,0	SD					6,0	6,0	6,0	SD
	4,0	4,0	4,0	0,15	3,0	3,0	3,0	0,15					6,0	6,0	6,0	0,23
	4,0	4,0	4,0		3,5	3,0	3,0						6,0	6,0	6,0	
	4,0	4,0	4,0		3,5	3,0	3,0						6,0	5,5	6,0	
	4,0	4,0	4,0		3,0	3,0	3,0						6,5	6,0	6,0	
	4,0	4,0	4,0		3,0	3,0	3,0						6,0	6,5	6,5	
	4,5	4,0	4,0		3,0	3,0	3,0						6,0	5,5	6,0	
	4,0	4,0	4,0		3,0	3,0	3,0						6,0	5,5	6,0	

**Tabela VIII** - Valores obtidos durante o segundo ensaio de sobrevivência com *Artemia sp.*

Amostragens de 1mL de náuplios eclodidos

17	Média
20	<b>20,80</b>
22	SD
18	4,08
25	
10-Nov	
30	
18	
17	
20	
21	

Amostragens de 20mL para determinar o número de indivíduos em cada frasco

DATA	Meio de crescimento de bact. Halo.			Água destilada a 35%			Inóculo inicial de Tetraselmis suecica (OD <sub>660nm</sub> aprox. 1,000)			Bact. Halo. (OD <sub>660nm</sub> aprox. 1,000)			Tetraselmis suecica (OD <sub>660nm</sub> aprox. 1,000)			2,5mL de Bact. Halo. + 2,5mL Tetraselmis suecica								
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	D1	D2	D3	E1	E2	E3	F1	F2	F3						
13-Nov	1	1	1	Média	1	0	0	Média	4	4	4	Média	1	1	1	Média	2	2	3	Média	2	1	1	Média
	1	1	1	<b>0,97</b>	1	1	0	<b>0,33</b>	2	3	4	<b>3,33</b>	1	1	1	<b>0,97</b>	2	2	2	<b>2,33</b>	2	2	2	<b>1,33</b>
	1	1	1	SD	0	0	0	SD	4	3	4	SD	1	1	1	SD	2	2	2	SD	1	1	1	SD
	1	1	1	0,18	0	0	1	0,48	4	4	3	0,61	0	1	1	0,18	2	2	2	0,48	1	2	2	0,48
	1	1	1		0	0	1		3	3	3		1	1	1		3	2	2		1	1	1	
	1	1	1		0	0	1		3	3	3		1	1	1		3	3	2		1	1	1	
	1	1	1		0	0	1		4	3	3		1	1	1		3	3	2		1	1	1	
	1	1	1		0	0	0		4	3	3		1	1	1		3	3	2		1	1	2	
	1	1	1		0	1	1		4	3	2		1	1	1		2	3	2		1	1	2	
	0	1	1		0	1	0		3	3	4		1	1	1		2	3	2		2	1	2	
17-Nov	0	0	1	Média	0	0	0	Média	2	2	2	Média	0	1	0	Média	3	2	3	Média	1	1	0	Média
	0	0	0	<b>0,33</b>	0	0	0	<b>0,00</b>	2	1	2	<b>1,67</b>	0	1	0	<b>0,33</b>	2	2	2	<b>2,07</b>	1	0	1	<b>0,67</b>
	0	0	0	SD	0	0	0	SD	1	2	2	SD	0	1	1	SD	2	2	2	SD	1	0	1	SD
	0	1	1	0,48	0	0	0	0,00	1	2	1	0,48	0	1	1	0,48	2	2	2	0,25	1	0	1	0,48
	1	0	0		0	0	0		2	2	2		0	1	1		2	2	2		1	0	1	
	0	1	0		0	0	0		1	1	2		0	1	1		2	2	2		1	0	1	
	0	0	1		0	0	0		1	1	2		0	0	0		2	2	2		0	1	1	
	1	1	0		0	0	0		2	1	2		0	0	0		2	2	2		0	1	1	
	0	1	0		0	0	0		1	2	2		0	0	0		2	2	2		0	1	1	
	0	0	1		0	0	0		2	2	2		0	0	0		2	2	2		0	1	1	

**Tabela VIII** - Valores obtidos durante o segundo ensaio de sobrevivência com *Artemia sp.* (cont.).

Amostragens de 20mL para determinar o número de indivíduos em cada frasco

	Meio de crescimento de bact. Halo.			Água destilada a 35‰			Inóculo inicial de Tetraselmis suecica (OD <sub>660nm</sub> aprox. 1,000)			Bact. Halo. (OD <sub>660nm</sub> aprox. 1,000)			Tetraselmis suecica (OD <sub>660nm</sub> aprox. 1,000)			2,5mL de Bact. Halo. + 2,5mL Tetraselmis suecica		
DATA	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	D1	D2	D3	E1	E2	E3	F1	F2	F3
20-Nov	0	0	1 Média	0	0	0 Média	1	2	1 Média	0	1	0 Média	2	1	1 Média	1	0	0 Média
	1	1	0 <b>0,33</b>	0	0	0 <b>0,00</b>	1	1	1 <b>1,33</b>	0	1	0 <b>0,33</b>	1	2	1 <b>1,33</b>	0	0	0 <b>0,33</b>
	0	1	0 SD	0	0	0 SD	2	2	1 SD	0	1	1 SD	1	2	2 SD	0	0	1 SD
	0	1	0 0,48	0	0	0 0,00	1	1	2 0,48	0	0	0 0,48	1	2	2 0,48	1	0	1 0,48
	0	1	0	0	0	0	2	2	1	1	0	0	2	2	2	1	1	0
	0	0	1	0	0	0	1	2	2	1	0	0	2	1	1	0	0	0
	0	0	0	0	0	0	1	2	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0
	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1
	1	0	0	0	0	0	1	2	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0
24-Nov	0	0	1 Média				1	1	1 Média	0	0	0 Média	1	1	0 Média	0	0	0 Média
	0	1	0 <b>0,33</b>				1	1	1 <b>0,97</b>	0	0	0 <b>0,00</b>	0	1	1 <b>0,67</b>	0	0	0 <b>0,00</b>
	0	1	0 SD				1	1	1 SD	0	0	0 SD	1	1	1 SD	0	0	0 SD
	0	0	0 0,48				0	1	1 0,18	0	0	0 0,00	1	1	0 0,48	0	0	0 0,00
	1	0	1				1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0
	1	0	1				1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
	0	0	1				1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
	0	0	1				1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0
	0	0	1				1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	0	0	0				1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0

**Tabela IX** - Valores resumo das amostragens relativas ao primeiro ensaio de sobrevivência com *Artemia sp.*.

<b>Dietas Alimentares (5mL/dia)</b>		<b>Número <i>Artemia</i> por frasco (2L)</b>				
Meio de crescimento de bact. Halo.	Média	<b>208</b>	<b>97</b>	<b>33</b>	<b>33</b>	<b>33</b>
	SD corr	41	18	48	48	48
Água destilada a 35‰	Média	<b>208</b>	<b>33</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
	SD corr	41	48	0	0	0
Inóculo inicial de Tetraselmis suecica (OD <sub>660nm</sub> aprox. 1,000)	Média	<b>208</b>	<b>333</b>	<b>167</b>	<b>133</b>	<b>97</b>
	SD corr	41	61	48	48	18
Bact. Halo. (OD <sub>660nm</sub> aprox. 1,000)	Média	<b>208</b>	<b>97</b>	<b>33</b>	<b>33</b>	<b>0</b>
	SD corr	41	18	48	48	0
Tetraselmis suecica (OD <sub>660nm</sub> aprox. 1,000)	Média	<b>208</b>	<b>233</b>	<b>207</b>	<b>133</b>	<b>67</b>
	SD corr	41	48	25	48	48
2,5mL de Bact. Halo. + 2,5mL Tetraselmis suecica	Média	<b>208</b>	<b>133</b>	<b>67</b>	<b>33</b>	<b>0</b>
	SD corr	41	48	48	48	0
<b>DATA:</b>		10-Nov	13-Nov	17-Nov	20-Nov	24-Nov

**Tabela X** - Valores do comprimento total (em mm), obtidos durante o segundo ensaio com *Artemia sp.*.

Medições dos náuplios inoculados em cada frasco

	0,559 0,707	Média
	0,725 0,943	<b>0,820</b>
	0,958 0,767	SD
	0,757 0,749	0,134
10-Nov	0,785 0,907	
	0,680 1,105	
	0,818 0,882	
	1,009 0,923	
	0,626 0,770	
	0,907 0,831	

Medições dos indivíduos amostrados	Meio de crescimento de bact. Halo.			Água destilada a 35‰			Inóculo inicial de Tetraselmis suecica (OD <sub>660nm</sub> aprox. 1,000)			Bact. Halo. (OD <sub>660nm</sub> aprox. 1,000)						
	A1	A2	A3	B1	B2	B3	C1	C2	C3	D1	D2	D3				
17-Nov	0,770	0,781	0,776	Média	0,000	0,000	0,000	Média	0,734	0,713	0,767	Média	0,740	0,729	0,717	Média
	0,740	0,775	0,789	<b>0,776</b>	0,000	0,000	0,000	<b>0,000</b>	0,758	0,734	0,762	<b>0,747</b>	0,730	0,714	0,712	<b>0,729</b>
	0,765	0,774	0,759	SD	0,000	0,000	0,000	SD	0,745	0,732	0,774	SD	0,725	0,742	0,711	SD
	0,780	0,754	0,785	0,013	0,000	0,000	0,000	0,000	0,725	0,725	0,735	0,017	0,714	0,710	0,707	0,018
	0,771	0,781	0,754		0,000	0,000	0,000		0,735	0,738	0,742		0,765	0,723	0,709	
	0,768	0,784	0,765		0,000	0,000	0,000		0,758	0,745	0,711		0,725	0,765	0,705	
	0,785	0,795	0,759		0,000	0,000	0,000		0,759	0,759	0,759		0,762	0,729	0,712	
	0,775	0,784	0,785		0,000	0,000	0,000		0,761	0,736	0,758		0,724	0,719	0,750	
	0,778	0,786	0,789		0,000	0,000	0,000		0,770	0,751	0,769		0,721	0,726	0,756	
	0,782	0,784	0,795		0,000	0,000	0,000		0,764	0,754	0,750		0,736	0,720	0,760	
24-Nov	1,312	1,331	1,321	Média	0,000	0,000	0,000	Média	1,436	1,542	1,555	Média	0,000	0,000	0,000	Média
	1,205	1,450	1,205	<b>1,321</b>	0,000	0,000	0,000	<b>0,000</b>	1,501	1,432	1,545	<b>1,511</b>	0,000	0,000	0,000	<b>0,000</b>
	1,335	1,260	1,208	SD	0,000	0,000	0,000	SD	1,320	1,526	1,548	SD	0,000	0,000	0,000	SD
	1,250	1,350	1,212	0,106	0,000	0,000	0,000	0,000	1,355	1,352	1,562	0,089	0,000	0,000	0,000	0,000
	1,405	1,320	1,240		0,000	0,000	0,000		1,525	1,362	1,563		0,000	0,000	0,000	
	1,305	1,340	1,303		0,000	0,000	0,000		1,590	1,640	1,526		0,000	0,000	0,000	
	1,360	1,210	1,209		0,000	0,000	0,000		1,601	1,502	1,524		0,000	0,000	0,000	
	1,259	1,500	1,263		0,000	0,000	0,000		1,540	1,509	1,521		0,000	0,000	0,000	
	1,590	1,260	1,324		0,000	0,000	0,000		1,605	1,511	1,602		0,000	0,000	0,000	
	1,620	1,355	1,335		0,000	0,000	0,000		1,360	1,512	1,668		0,000	0,000	0,000	

**Tabela X** - Valores do comprimento total (em mm), obtidos durante o segundo ensaio com *Artemia sp.* (cont.).

Medições dos indivíduos amostrados	Tetraselmis suecica (OD <sub>660nm</sub> aprox. 1,000)			2,5mL de Bact. Halo. + 2,5mL Tetraselmis suecica			
	E1	E2	E3	F1	F2	F3	
17-Nov	0,791	0,931	0,859 Média	0,821	0,791	0,798 Média	
	0,798	0,906	0,907	<b>0,872</b>	0,821	0,780	<b>0,806</b>
	0,825	0,842	0,911 SD	0,825	0,771	0,805 SD	
	0,841	0,910	0,870	0,040	0,831	0,803	0,845
	0,865	0,932	0,890		0,801	0,805	0,823
	0,902	0,865	0,850		0,820	0,804	0,801
	0,862	0,892	0,821		0,841	0,709	0,865
	0,842	0,891	0,860		0,821	0,735	0,843
	0,821	0,862	0,856		0,874	0,805	0,774
	0,947	0,901	0,905		0,835	0,815	0,705
24-Nov	1,762	1,767	1,770 Média	0,000	0,000	0,000 Média	
	1,785	1,774	1,752	<b>1,766</b>	0,000	0,000	<b>0,000</b>
	1,805	1,779	1,852 SD	0,000	0,000	0,000 SD	
	1,656	1,760	1,805	0,073	0,000	0,000	0,000
	1,556	1,752	1,806		0,000	0,000	0,000
	1,851	1,603	1,804		0,000	0,000	0,000
	1,758	1,785	1,812		0,000	0,000	0,000
	1,658	1,794	1,815		0,000	0,000	0,000
	1,653	1,808	1,835		0,000	0,000	0,000
	1,745	1,805	1,864		0,000	0,000	0,000