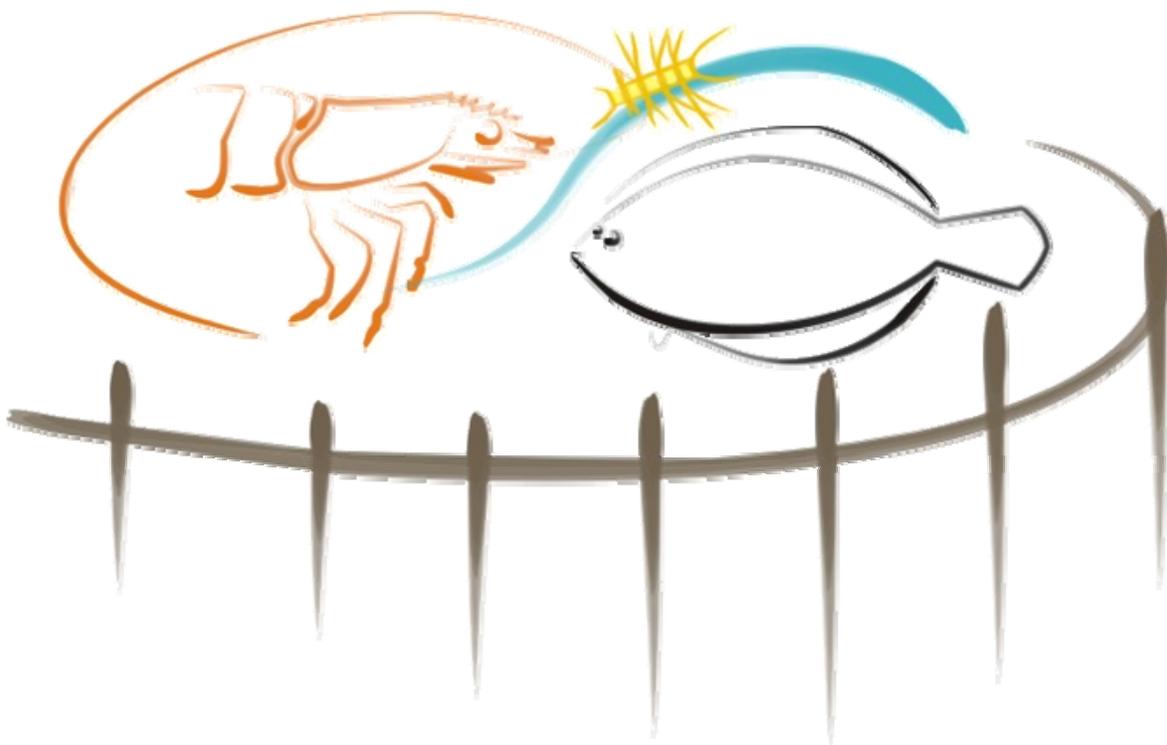




**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**



**ANÁLISE DA QUALIDADE NUTRICIONAL DO
BIOFILME**

CAROLINE FERNANDES DA SILVA

**FURG
RIO GRANDE – RS
2006**

Fundação Universidade Federal do Rio Grande
Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura

Análise da Qualidade Nutricional do Biofilme

Caroline Fernandes da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Aqüicultura da Fundação Universidade Federal do Rio Grande.

Orientador: Prof. Dr. Paulo César Abreu

Rio Grande – RS – Brasil
Agosto, 2006

SUMÁRIO

1. Introdução	9
2. Objetivos	13
3. Material e Métodos	14
3.1 Local de Estudo	14
3.2 Desenho Experimental	14
3.3 Peso Seco, Clorofila <i>a</i>, Lipídio e Proteína	15
3.4 Caracterização da Comunidade de Microorganismos	16
3.5 Fatores Abióticos da Água	17
3.6 Análise Estatística	18
4. Resultados	19
4.1 Qualidade da Água	19
4.2 Abundância dos Microorganismos no Biofilme	20
4.3 Composição Bioquímica do Biofilme	32
4.4 Correlações	35
4.5 Biomassa do Biofilme	36
5. Discussão	39
6. Conclusão	49
Referências Bibliografia	51
Apêndices	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Número médio de bactérias em divisão por cm^2 e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).	18
Figura 2 - Número médio de bactérias livres cocóides por cm^2 e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).	19
Figura 3 - Número médio de bactérias livres filamentososa por cm^2 e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).	20
Figura 4 - Número médio de bactérias aderida por cm^2 e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).	21
Figura 5 - Número médio de cianobactérias unicelulares por cm^2 e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).	22
Figura 6 - Número médio de cianobactérias filamentososa por cm^2 e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).	22
Figura 7 - Número médio de flagelados por cm^2 e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).	23
Figura 8 - Número médio de diatomáceas cêntricas unicelulares por cm^2 e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).	24
Figura 9 - Número médio de diatomáceas cêntricas em cadeia por cm^2 e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).	25
Figura 10 - Número médio de diatomáceas penadas menores que $50 \mu\text{m}$. cm^{-2} e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).	26
Figura 11 - Número médio de diatomáceas penadas maiores que $50 \mu\text{m}$. cm^{-2} e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).	27
Figura 12 - Número médio de nematódeos maiores que $200 \mu\text{m}$. cm^{-2} e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).	28
Figura 13 - Número médio de nematódeos menores que $200 \mu\text{m}$. cm^{-2} e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).	29
Figura 14 – Concentração do conteúdo protéico do biofilme durante o período experimental, 30 dias, em mg.cm^{-2} .	30
Figura 15 – Porcentagem de proteína do biofilme durante o período experimental, 30 dias, em base seca.	31
Figura 16 – Concentração de lipídio do biofilme durante o período experimental, 30 dias, em mg.cm^{-2} .	32
Figura 17 – Conteúdo médio de clorofila <i>a</i> e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).	34
Figura 18 – Conteúdo médio de peso seco e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores médios dos parâmetros físico-químicos dos cercados e do ponto controle	17
Tabela 2 - Correlação entre os microorganismos e o conteúdo protéico e lipídico, apresenta os valores do coeficiente de Pearson, r.	33

*Aos meus pais, que
sempre tornaram
realidade os meus sonhos.
Ao Neto, luz na minha
vida, paz no meu coração.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o Dr. Paulo Abreu, pela orientação, paciência, carinho e contribuição à minha formação profissional e pessoal.

Aos Prof^o Dr. José Montserrat e Prof^a Dr^a Laura Geracitano, pelos ensinamentos e atenção dedicados durante a realização deste trabalho.

Ao Eduardo Ballester MSc., pelos ensinamentos em aqüicultura, pelo apoio, pela amizade, tua ajuda foi fundamental para o andamento do experimento.

Ao pessoal do Laboratório de Ecologia de Fitoplâncton e Microorganismos Marinhos:

Paulo, Clarisse, Virgínia, Marli, Bia, Valnei, Carlos, Giuli, Márcio, Simone, Lucélia, Lisandra, Maria Luisa, Lissandra, Eduardo.

Ao pessoal da EMA, professores e funcionários, que me auxiliaram na realização dos experimentos: Eduardo, Sr. Hermes, Santa Casa, Prof^o Ronaldo, Sandro.

Aos meus queridos amigos que encheram de cor e alegria a minha passagem por Rio Grande: Andréia, Lisi, Simone, Mauren, Diana, Li, Cinthia, Carioca, Regis, Japa, Thais, Charles, Sumozinho, Dariano, Lu.

A minha irmãzinha Déia que tornou a minha estada em Rio Grande inesquecível!

As minhas amigas do coração Lisi, Simone, Mauren, Li, e Diana, obrigado por esquentarem o meu coração nos tempos frios!

As minhas eternas amigas Fran e Helo, não tenho palavras... Obrigada por estarem comigo nessa caminhada!

Helozinha tua ajuda como sempre foi fundamental... Amiga muito obrigada!

A minha família, que fez este sonho se tornar realidade. Pai, mãe, mano, este trabalho também é de vocês! Muito obrigada pelo carinho eterno!

Ao Neto, por todo incentivo, paciência, carinho, amor! Nosso amor é minha fonte de inspiração!

E acima de tudo a Deus, por permitir que eu faça a minha parte!

RESUMO

SILVA, Caroline Fernandes da. **Análise da Qualidade Nutricional do Biofilme**. 2006. 61 p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura, Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, 2006.

O biofilme é definido como uma comunidade de microorganismos associados a uma matriz orgânica, que se forma naturalmente em qualquer superfície sólida em contato com água. A matriz orgânica apresenta na sua composição polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos, entre outros polímeros. Na aqüicultura, o biofilme tem sido utilizado para gerar aumento da produtividade do sistema e da taxa de sobrevivência. Essas melhorias no sistema de cultivo podem ser atribuídas à presença dos microorganismos no biofilme, cuja composição bioquímica fornece macro e micronutrientes que favorecem o crescimento dos organismos cultivados. A fim de verificar essas hipóteses, este trabalho objetivou analisar a qualidade nutricional do biofilme em três estratos diferentes da coluna da água, em diferentes fases de sua formação, e comparar estas informações com a composição da comunidade de microorganismos. O experimento foi realizado na enseada Saco do Justino, na região estuarina da Lagoa dos Patos, RS, Brasil, no verão de 2005. Para propiciar a fixação do biofilme, foram utilizados três cercados com seis telas de polietileno (tela tipo mosqueteiro), possuindo cada uma 1,2 m², com uma abertura de malha de 1 mm, dispostas verticalmente e fixadas em bambu (material flutuante). A cada cinco dias foram coletadas amostras do biofilme nos três estratos, superfície (40 cm do fundo), meio (20 cm do fundo) e fundo (5 cm do fundo), para verificar a concentração de clorofila *a*, peso seco, caracterização dos microorganismos, concentração protéica e lipídica. Paralelamente, foi realizado o monitoramento da qualidade da água. A concentração de clorofila *a* variou entre 0,14 a 3,49 µg.cm⁻² em 30 dias de experimento, não sendo encontradas diferenças significativas entre os estratos. O valor de peso seco variou de 4 a 24 mg.cm⁻², e também não foram encontradas diferenças significativas entre os estratos. Nosso estudo sugere a verificação da maturidade do biofilme por meio da análise paralela de clorofila *a* e peso seco, pois essas medidas abrangem todos os microorganismos que compõem o biofilme, fotossintetizantes ou não. Os microorganismos do biofilme alcançaram densidades médias que variaram entre: 91.10⁶ a 302.10⁶ cels.cm⁻² de bactérias, 22.10⁶ a 89.10⁶ cels.cm⁻² de cianobactérias, 4.10⁴ a 76.10⁴ cels.cm⁻² de diatomáceas cêntricas, 1.10⁴ a 26.10⁴ cels.cm⁻² de diatomáceas penadas, 3.10⁶ a 15.10⁶ cels.cm⁻² de flagelados e 13 a 2468 cels.cm⁻² de nematódeos. Os valores de proteína variaram de 0,3 a 2,7 mg.cm⁻², e lipídio entre 8,2 a 105 de mg.cm⁻². Ao converter os valores de proteína para porcentagem registramos um conteúdo protéico máximo de aproximadamente 26% em base seca. Ao analisar as correlações entre microorganismos e composição bioquímica verificamos que o aporte de lipídios presente no biofilme deveu-se, principalmente, aos nematódeos e as diatomáceas cêntricas. Enquanto que a variação da concentração de proteína esteve correlacionada com bactérias filamentosas, bactérias aderidas e principalmente diatomáceas cêntricas unicelulares. Essas informações permitirão um melhor manuseio do biofilme no sentido de se incrementar a oferta de lipídio e proteína a organismos cultivados.

Palavras-chave: Biofilme, Proteína, Lipídio, Microorganismos.

ABSTRACT

Biofilm is defined as a community of microorganisms associated to an organic matrix, which grows up naturally in any submersed surface. The organic matrix presents in its composition polysaccharides, proteins, nucleic acids, among other polymers. In aquaculture, biofilm has been used to increase the productivity of the system and the survival rate. These improvements in the culture system can be attributed to the biochemical composition of biofilm, i.e., the macro and micronutrients provided by microorganisms that favor the growth of the cultivated organisms. To test this hypothesis, this work aimed to analyze the nutritional quality of biofilm, in the absence of shrimp, in three different depths of the water column in different phases of the biofilm formation, and relate it to the microbial community composition of the biofilm. The experiment was carried out in net pens at the Saco do Justino embayment, in the estuary of the Patos Lagoon, RS, Brazil, in the summer of 2005. To propitiate the setting of biofilm, in each net pen six polyethylene nets have been used. These nets present a 1,2 m² area and an opening of mesh of 1mm. They were set vertically and fixed in bamboos for floating. Every 5 days samples of biofilm were collected at the three water depths, surface (40 cm from the bottom), middle (20 cm from the bottom) and bottom (5 cm from the bottom), in order to verify the concentration of chlorophyll-a, dry weight, protein and lipid concentration and to characterize the microorganisms. Simultaneously, the monitoring of the water quality was carried out. Chlorophyll-a varied between 0,14 µg.cm⁻² and 3,49 µg.cm⁻² in 30 days of experiment, without any significant difference among the depths. The biofilm dry weight varied from 4 mg.cm⁻² to 24 mg.cm⁻². Also with no significant difference among depths. Our study suggested that the verification of the biofilm maturity should be carried by the analysis of both chlorophyll-a and the biofilm dry weight, for these measures comprise all the microorganisms that compose the biofilm, photosynthesizing, or not. The microorganism in the biofilm showed the following abundances: bacteria: 91.10⁶ - 302.10⁶ cels.cm⁻²; cyanobacteria: 22.10⁶ - 89.10⁶ cels.cm⁻²; centric diatoms: 4.10⁴ - 76.10⁴ cels.cm⁻²; pennate diatoms: 1.10⁴ - 26.10⁴ cels.cm⁻²; flagellates: 3.10⁶ - 15.10⁶ cels.cm⁻² and nematodes: 13 - 2468 cels.cm⁻² de nematodeos. The protein concentration varied between 0,3 and 2,7 mg.cm⁻², and lipids from 8,2 to 105 de mg.cm⁻². When we convert the protein concentration into percent of biofilm dry weight, the highest value, 26%, was observed at the beginning of the experiment. The correlation between the microorganisms and the biofilm biochemical composition indicates that nematodes and centric diatoms are the main source of lipids in the biofilm, while protein was positively related to the presence of filamentous and attached bacteria, but mainly to centric diatoms. This information will allow a better use of biofilm in order to increase the offer of lipids and proteins to the cultivated organisms.

1. INTRODUÇÃO

O cultivo de camarão marinho teve início na Ásia onde, por muitos séculos, os fazendeiros construíam viveiros visando à entrada das larvas pela ação das marés (ROCHA & MAIA, 1998). O cultivo, tal qual é conhecido hoje no início do século XXI, surgiu em 1930. Atualmente, o Oriente é responsável por 83,37 % da produção mundial, sendo o sudoeste da Ásia o principal centro produtor de camarões. No Ocidente, o Brasil alcançou a posição de líder no mercado em 2003, com uma produção de 90.190 toneladas de camarão por ano, superando o Equador e o México, que tradicionalmente ocupavam o primeiro e segundo lugar, respectivamente (ABCC, 2004). O crescimento da produção e da produtividade dos cultivos de organismos aquáticos deve-se, principalmente, ao avanço tecnológico do setor. Entretanto, é certo que o desenvolvimento de técnicas de baixo custo e baixo impacto ambiental aumentaria a produtividade dos sistemas de cultivo.

Nos sistemas de cultivos atuais, os custos com alimentação artificial alcançam de 50 a 60 % do custo total da produção (MRIDULA *et al.*, 2003), sendo que apenas 15 a 30 % do alimento fornecido é convertido em biomassa dos organismos cultivados (GROSS *et al.*, 2000). Segundo Anderson *et al.* (1987), o alimento natural é responsável por 53 a 77 % do carbono assimilado pelo camarão *Litopenaeus vannamei*. Considerando esses aspectos, destaca-se a necessidade do desenvolvimento de técnicas de produção de alimento natural, reduzindo a dependência por alimentos artificiais e barateando os custos de produção.

A importância dos microorganismos na transferência da matéria orgânica e de energia para níveis tróficos superiores, nos quais o carbono orgânico dissolvido (COD) se torna disponível por meio da atividade bacteriana, foi demonstrada por Pomeroy (1974) e Azam *et al.* (1983). Bactérias absorvem o COD, se multiplicam e são consumidas por nanoflagelados e pequenos ciliados (protozooplâncton) que, por sua vez, se tornam uma importante fonte de alimento para organismos bentônicos e planctônicos. A importância das bactérias e do protozooplâncton como fontes de alimento vem da sua composição bioquímica, representando uma reserva significativa de nutrientes essenciais, como ácidos graxos poliinsaturados, esteróides e aminoácidos, fundamentais para o crescimento de peixes e crustáceos (STOECKER & CAPUZZO, 1990). Por exemplo, sabe-se que os microorganismos de vida livre podem representar uma importante fonte de alimento para

larvas de *Farfantepenaeus paulensis*, que apresentaram um alto consumo de ciliados presentes na coluna de água (THOMPSON *et al.*, 1999). Outros estudos mostraram a importância das bactérias e do protozooplâncton para o crescimento do meio fauna, que serão posteriormente consumidas por camarões peneídeos, aumentando, assim, a taxa de sobrevivência e o crescimento destes (ALLAN *et al.*, 1995).

O biofilme é definido como uma comunidade de microorganismos associados a uma matriz orgânica de origem microbiana e se forma naturalmente em qualquer superfície em contato com água. A matriz orgânica apresenta na sua composição polissacarídeos, proteínas, ácidos nucléicos, entre outros polímeros (DAVEY e O'TOOLE, 2000). Segundo Whal (1989), o biofilme se forma seguindo um padrão de colonização no qual podem ser distinguidas quatro fases:

- Adsorção de compostos químicos dissolvidos, i.e. macromoléculas, às superfícies por processos físicos espontâneos;
- Colonização bacteriana, após colonizarem o substrato as bactérias começam a produzir substâncias extra poliméricas (EPS) que serve de proteção contra predadores, resistência à radiação, a desidratação, entre outros fatores;
- Colonização por eucariontes unicelulares;
- Colonização por eucariontes multicelulares.

O biofilme tem importância em várias atividades humanas, tais como a purificação de efluentes em estações de tratamento de água, em bioprocessos como a fermentação, aplicações farmacêuticas por meio da utilização de metabólitos secundários, na aquicultura, entre inúmeras outras aplicações.

Na aquicultura, o biofilme traz benefícios como o aumento da sobrevivência e do crescimento, além da melhora da sanidade dos organismos cultiváveis, a melhoria da qualidade da água do cultivo e da distribuição espacial dos animais, diminui a taxa de conversão alimentar, entre outros. Em geral, o biofilme promove o aumento da produtividade do sistema de cultivo (AZIM *et al.*, 2001 e 2004; MRIDULA *et al.*, 2003; BALLESTER, 2003). Além disso, o biofilme também pode trazer vantagens diretas pelo seu uso, devido a sua composição em macro e micronutrientes que ficam disponíveis para os organismos cultivados, quando é consumido (AZIM *et al.*, 2002, 2003a, 2003b). O biofilme tem sido amplamente utilizado como suplemento alimentar, resultando em uma maior

produtividade do sistema de cultivo, ou seja, maior sobrevivência e crescimento dos organismos cultivados (ABREU *et al.*, 1998; HUCHETTE *et al.*, 2000; AZIM *et al.*, 2001 e 2003; THOMPSON *et al.*, 2002; KESHAVANANTH *et al.*, 2002 e 2004).

Azim *et al.* (2001) observaram que o biofilme sozinho suporta uma produção de peixes de aproximadamente 5000 kg ha⁻¹ ano⁻¹. O biofilme possibilita o aumento da produção primária e a disponibilidade de alimentos para peixes nos sistemas de cultivo, otimizando assim sua dieta protéica e energética (KESHAVANANTH *et al.*, 2004). Mridula *et al.* (2003) atribuíram o aumento da atividade enzimática de *Labeo fimbriatus* aos nutrientes derivados do biofilme.

Segundo estudos realizados por Thompson *et al.* (2002), o biofilme maduro apresenta aproximadamente 5 µg.cm⁻² de clorofila *a* e é composto por: diatomáceas penadas (*Amphora*, *Campylopyxis*, *Navícula*, *Sinedra*, *Hantzschia* e *Cylindrotheca*; 9.10⁴cel.mg⁻¹), cianobactérias filamentosas (*Oscillatoria* e *Spirulina*; 2.10⁵cel.mg⁻¹), bactérias (máximo 1,48.10⁷.mg⁻¹), flagelados (máximo 1,08.10³.mg⁻¹) e ciliados (máximo 3,51.10².mg⁻¹). Durante esse estudo, os autores verificaram que o biofilme apresentava, em média, um conteúdo protéico de 6% do peso úmido. Apesar desse baixo nível protéico, os autores sugerem que os microorganismos presentes no biofilme podem ser uma importante fonte de nutrientes essenciais, isto é, ácidos graxos poliinsaturados, esteróides, aminoácidos, vitaminas e carotenóides.

Outros estudos encontraram valores protéicos mais elevados para o biofilme. Azim *et al.* (2002) analisaram a qualidade nutricional do biofilme em três substratos diferentes, sendo o bambu o substrato que apresentou a melhor qualidade nutricional (19,6 kJ g⁻¹ de energia, 38,3 % de proteína, 7,3 % de lipídio, 46,4 % de carboidrato, 8 % de residual, valores referentes a peso seco livre de cinzas). Em outro experimento, os níveis de cinzas (12-68 %) e proteína (22-26 %) sugerem que a variação existente ocorre devido aos níveis de fertilização e predação (AZIM *et al.*, 2001).

Huchette *et al.* (2000) sugerem que estudos futuros analisem a composição nutricional, o valor energético e a digestibilidade do biofilme. Tendo como base essas sugestões, este trabalho objetivou analisar a qualidade nutricional do biofilme em cercados utilizados para a produção do camarão-rosa *F. paulensis*. A análise da qualidade nutricional do biofilme foi desenvolvida em conjunto com a identificação e quantificação dos

microorganismos em diversas fases de formação do biofilme, para que se pudesse identificar quais microorganismos contribuem para a disponibilização de lipídios e proteínas, entre outros, para o camarão cultivado. Tais informações permitirão entender melhor a ecologia dos microorganismos presentes no biofilme, permitindo manusear sua formação de forma a aumentar a produtividade do sistema, com redução dos custos especialmente na alimentação do camarão-rosa *F. paulensis*.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral:

Analisar a qualidade nutricional do biofilme em cercados durante diferentes fases de sua formação e em diferentes estratos da coluna da água.

2.2. Específicos:

1. Determinar os níveis de clorofila *a*, peso seco, proteínas e lipídios do biofilme em diferentes profundidades da coluna da água (superfície, meio e fundo) em diferentes fases da sua formação.
2. Quantificar e caracterizar os diferentes grupos de microorganismos, relacionando a sua predominância no biofilme com as diferentes variáveis analisadas no item 1.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de Estudo

O experimento foi realizado no Laboratório de Aquicultura Continental - LAC da FURG localizado no Saco do Justino. A enseada Saco do Justino, localizada na região estuarina da Lagoa dos Patos, município de Rio Grande, no Rio Grande do Sul, possui aproximadamente 2 km de diâmetro e 250 ha de superfície (MARCHIORI *et al.*, 1982).

Segundo Marchiori *et al.* (1982), esse local apresenta características ideais para o cultivo de peixes e crustáceos, tais como:

- águas rasas com profundidade máxima de 1,5 m em sua parte central;
- fundo constituído principalmente por sedimento arenoso e arenoso-lodoso;
- pH alcalino com valores médios em torno de 8;
- oxigênio dissolvido próximo ao ponto de saturação;
- alta concentração de nutrientes;
- elevada produção primária e secundária.

3.2. Desenho Experimental

O experimento foi realizado em cercados de tela de poliéster revestidos de PVC com uma abertura de malha de 1,5 mm, altura de 1,5 m e área de fundo de 2 m². Para propiciar a fixação do biofilme, foram utilizadas três cercados contendo seis telas de polietileno (tela tipo de mosqueteiro) com 1,2 m² cada, com uma abertura de malha de 1 mm, dispostas verticalmente, sendo fixadas em varas de bambu. A área total do substrato vertical por cercado foi de 14,4 m².

As coletas foram feitas a cada cinco dias, durante um período de 30 dias. Em cada coleta, foi retirada uma tela de cada cercado, a qual foi analisada em diferentes profundidades, quais sejam: superfície (40 cm do fundo), meio (20 cm do fundo) e fundo (5 cm do fundo).

O período experimental transcorreu de 15 de fevereiro a 17 de março de 2005. O tempo de duração do experimento foi baseado no trabalho de Thompson *et al.* (2002), onde os autores determinaram o tempo de maturidade do biofilme de aproximadamente 15 dias.

Ressalta-se que o biofilme foi mantido na ausência de camarão, evitando assim a predação dos camarões sobre o mesmo.

3.3. Peso Seco, Clorofila *a*, Lipídio e Proteína

Para avaliar a qualidade nutricional do biofilme, foi realizada a análise do conteúdo protéico e lipídico, além de peso seco das amostras coletadas em diferentes fases de formação e em diferentes estratos.

O peso seco foi determinado por meio de secagem de pedaços de tela com biofilme por aproximadamente 24 horas, até alcançar peso constante, em estufa a 60 °C, segundo as normas da AOAC (2000). O peso seco do biofilme foi obtido pela subtração do peso final da tela com biofilme, menos o peso inicial da tela sem biofilme.

Para determinar o conteúdo de proteínas e lipídios, pedaços de telas, entre 12 e 40cm², foram colocados em frascos de vidro contendo de 15 a 23 ml de água destilada com adição de cloreto de sódio, até alcançar a mesma salinidade do ambiente (salinidade média 28). Para a extração do biofilme, pedaços de tela foram agitados manualmente e sonificados quatro vezes por 20 segundos, intercalando tempo igual de descanso para evitar o aquecimento da amostra. Utilizou-se um aparelho de ultra-som (Ultrasonic Homogenizer 4710 Series, ColeParmer Instrument Co.) a uma amplitude de 20 khz. Após esse procedimento, as telas foram retiradas e a solução armazenada a -20°C para análise *a posteriori* (THOMPSON *et al.*, 2002).

A análise de proteínas foi realizada de acordo com o método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). O corante usado, coomassie azul brilhante, detecta quantidades mínimas de proteína, formando um complexo corado com a albumina e outras globulinas, reagindo integralmente com todas as proteínas da amostra. A quantidade de proteína foi determinada por meio de leitura em espectrofotômetro de absorvância a 550nm (Apêndice III).

Para transformar os valores do conteúdo protéico para porcentagem, o valor do conteúdo protéico (mg.cm⁻²) foi multiplicado por 100 e dividido pelo valor de peso seco (mg.cm⁻²).

Os lipídios totais foram extraídos seguindo o método de Folch *et al.* (1957), sendo homogeneizados em solução de clorofórmio-metanol (3:1) e determinados usando o

método sulfofosfovanilina, descrito por Frings e Dunn (1970). O método sulfofosfovanilina consiste na hidrólise ácida da amostra seguida de uma reação com vanilina. A solução na presença de lipídio resulta em cor rosa quantificada por espectrofotometria (espectrofotômetro digital B 342 II Micronal) a 540 nm (Apêndice III).

Ambos os métodos de análise de proteína e lipídio, Bradford e Sulfofosfovanilina expressam os resultados em mg/dl. Como o biofilme está aderido a uma superfície e não livre em uma solução, os resultados foram posteriormente convertidos para mg/cm². Para isso primeiro converteram-se os valores de mg/dl para mg/ml, multiplicando por 100. Depois esses valores foram multiplicados pelo volume total da solução e por fim divididos pela área total do biofilme utilizado na solução. Assim obteve-se o resultado em mg/cm².

Estes dois métodos foram empregados, pois conseguem determinar a presença de lipídio e proteína mesmo tendo-se pouca quantidade de material, como é característico do biofilme nos primeiros dias de sua formação.

Para avaliar os níveis de clorofila *a* do biofilme foram amostrados fragmentos de 2cm² de tela dos três estratos. Estes foram colocados em 10ml de acetona 90% (Merck[®] PA) e armazenados por 24 horas no escuro, a -18 °C. Após esse período, as concentrações de clorofila *a* foram determinadas por meio de um fluorímetro (Turner D700) calibrado com clorofila *a* pura da Sigma.

3.4. Caracterização da Comunidade de Microorganismos

Para a contagem de bactérias, cianobactérias, flagelados, diatomáceas e nematódeos, foram retirados fragmentos de 2 cm² de tela dos estratos da superfície, do meio e do fundo. As amostras foram fixadas em solução de formol 4 %. Para retirar e homogeneizar o biofilme aderido aos fragmentos das panagens, as amostras foram sonificadas utilizando um aparelho de ultra-som (Ultrasonic Homogenizer 4710 Series, ColeParmer Instrument Co.) a uma amplitude de 20 khz, três vezes por 10 a 15 segundos, intercalando tempo igual de descanso para evitar o aquecimento da amostra.

Para contagem de bactérias, cianobactérias e flagelados subamostras de 1ml foram filtradas em membrana de policarbonato (Nucleopore com 0,2 µm de poro e 25 nm de diâmetro) previamente escurecidos com *Irlang black* e corados com Laranja de Acredina 1 % na concentração final de 1µg.ml⁻¹ (HOBBIE *et al.* 1977). Os filtros foram observados em

microscópio de epifluorescência Zeiss Axioplan, equipado com um conjunto de filtros de luz 487703 (BP365/11; FT 395; LP 397) com magnificação final de 1000x. Em cada lâmina foram contadas bactérias, cianobactérias e flagelados em 30 campos escolhidos aleatoriamente.

Para caracterização e contagem de diatomáceas e nematódeos, subamostras que variaram de 1 a 0,1 ml foram levadas à câmara de sedimentação, na qual permaneceram por, no mínimo, 2 horas para posterior contagem, utilizando microscópio invertido Zeiss Axiovert equipado com contraste de fase (UTERMÖHL, 1958). Na contagem de diatomáceas, foram computados 30 campos por câmara, escolhidos aleatoriamente. Na contagem de nematódeos, por sua vez, foram contados os organismos de toda a câmara.

Os microorganismos foram divididos nos seguintes grupos: bactéria em divisão, bactéria livre cocóide, bactéria livre filamentosa, bactéria aderida, cianobactérias unicelulares, cianobactérias filamentosas, flagelados, diatomáceas cêntricas unicelulares, diatomáceas cêntricas em cadeia, diatomáceas penadas menores que 50 μm , diatomáceas penadas maiores que 50 μm , nematódeos maiores que 200 μm e nematódeos menores que 200 μm .

3.5. Fatores Abióticos da Água

Nos dias de coleta, foram monitorados a temperatura (termômetro de mercúrio), a salinidade da água (refratômetro ótico), o pH com pHmetro (Handylab 2BND Schott), a transparência da água com disco de *Secchi*, o oxigênio dissolvido (Metler Toledo MO 128), a amônia (UNESCO, 1983), o nitrito (BENSCHNEIDER & ROBINSON, 1952). Para análise destes parâmetros amostras de água foram tomadas dentro dos cercados e no ponto controle, cerca de 20 metros dos mesmos.

3.6. Análise Estatística

Após a verificação do cumprimento das premissas necessárias, utilizou-se a análise de variância para verificar possíveis diferenças significativas entre as médias da concentração de clorofila *a*, peso seco, proteína e lipídio, além da contagem de bactérias, cianobactérias, flagelados, diatomáceas e nematódeos, nos diferentes estratos e ao longo do tempo. Sendo registradas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias, usou-se o

teste de Tukey na análise *a posteriori*. Nas análises estatísticas, foi utilizado o *software* Bio Estat 4.0 (AYRES *et al.*, 2005).

As análises de correlação foram feitas considerando os microorganismos como variáveis independentes e proteínas e lipídios como variáveis dependentes. Dessa forma, procurou-se determinar quais microorganismos eram responsáveis pela produção de proteína e lipídio analisada no biofilme. Para essa análise, utilizou-se o teste de Correlação de Pearson (AYRES *et al.*, 2005).

4. RESULTADOS

Nos resultados serão descritos os parâmetros físico-químicos da água, a abundância dos microorganismos no biofilme, a composição bioquímica do biofilme (proteína e lipídio), a correlação entre composição bioquímica e microorganismos que compõe o biofilme e biomassa do biofilme (clorifila *a* e peso seco).

Nenhum dos parâmetros analisados apresentou diferença estatística entre os estratos nem entre as fases de formação do biofilme, com exceção do grupo nematódeo que apresentou diferença estatística entre as fases de formação do biofilme iniciais e finais.

4.1. Qualidade da água

Durante os 30 dias de experimento, as variáveis físico-químicas mostraram pouca variação, não apresentando diferença significativa entre o ponto controle e os cercados. Os valores médios dos cercados e do ponto controle estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Valores médios dos parâmetros físico-químicos dos cercados e do ponto controle.

Tempo (dias)	NO ₂ (mg.l ⁻¹)	NH ₄ (mg.l ⁻¹)	PO ₄ (mg.l ⁻¹)	Temperatura (°C)	OD (mg.l ⁻¹)	pH	Salinidade	Transparência da Água
5	0,01	0,07	0,10	27	6,82	8,49	28	0,8
10	0,01	0,04	0,1	28	7,01	8,58	27	0,7
15	0,01	0,05	0,1	29	6,45	8,44	29	0,8 (total)
20	0,01	0,08	0,05	29	8,77	8,35	29	1 (total)
25	0,01	0,05	0,05	27	9,53	8,57	28	1 (total)
30	0,01	0,04	0,1	29	7,9	8,41	29	0,9 (total)
Média	0,01	0,06	0,08	28	7,7	8,47	28	0,9
Média Controle	0,01	0,05	0,06	28	8,2	8,5	28	0,9

4.2. Abundância de Microorganismos no Biofilme

As bactérias em divisão alcançaram a menor densidade no início do experimento na superfície, no meio e no fundo, com, respectivamente, $50.10^6 (\pm 6.10^6)$, $48.10^6 (\pm 2.10^6)$ e $39.10^6 (\pm 7.10^6)$ cels.cm⁻². Por outro lado, as maiores densidades foram atingidas em dias variados, nos estratos da superfície e do fundo no 20º dia, com $223.10^6 (\pm 35.10^6)$ e 107.10^6 cels.cm⁻², respectivamente, e no estrato do meio, no 25º dia, com $246.10^6 (\pm 41.10^6)$ cel.cm⁻² (Figura 1).

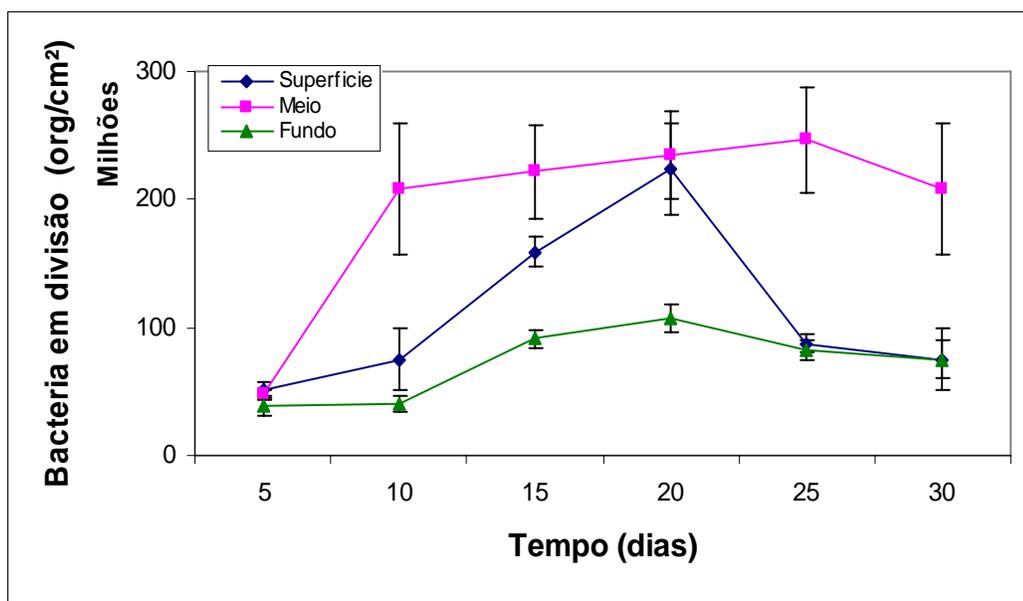


Figura 1 – Número médio de bactérias em divisão por cm² e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).

As bactérias livres cocóides no estrato da superfície e do meio variaram pouco até o 20º dia, quando chegaram ao menor valor $2.10^6 (\pm 9.10^5)$ e $12.10^6 (\pm 14.10^6)$ cels.cm⁻². No 25º dia, os estratos da superfície e do meio alcançaram os maiores valores, com $49.10^6 (\pm 9.10^6)$ e $38.10^6 (\pm 2.10^6)$ cels.cm⁻², respectivamente. Os valores referentes ao fundo apresentaram o comportamento oposto, atingindo o menor valor no início do experimento, no 5º dia, com $39.10^6 (\pm 7.10^6)$ cels.cm⁻², e o maior valor no 20º dia, com $107.10^6 (\pm 10.10^6)$ cels.cm⁻² (Figura 2).

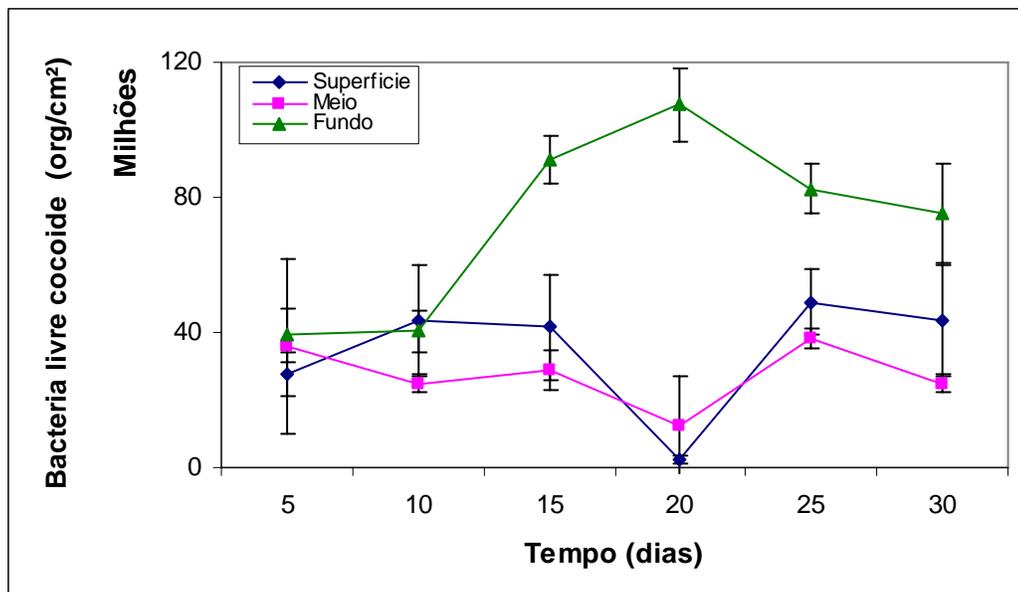


Figura 2 – Número médio de bactérias livres cocoides por cm^2 e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).

As bactérias heterotróficas filamentosas variaram muito durante o período experimental (Figura 3). No estrato da superfície, o valor mínimo foi alcançado no 20º dia, com $1 \cdot 10^6 (\pm 1 \cdot 10^6)$ tricomas. cm^{-2} , e o maior valor, no 25º dia, com $19 \cdot 10^6 (\pm 4 \cdot 10^6)$ tric. cm^{-2} . No estrato do meio, o menor valor referente ao 10º dia é igual a $4 \cdot 10^6 (\pm 2 \cdot 10^6)$ tric. cm^{-2} , e o maior valor - 25º dia- é igual a $17 \cdot 10^6 (\pm 6 \cdot 10^6)$ tric. cm^{-2} . No estrato do fundo, o menor valor referente ao no início do experimento, no 5º dia, é igual a $23 \cdot 10^6 (\pm 2 \cdot 10^6)$ tric. cm^{-2} , e o maior valor - 30º dia - é igual a $19 \cdot 10^6 (\pm 2 \cdot 10^6)$ tric. cm^{-2} .

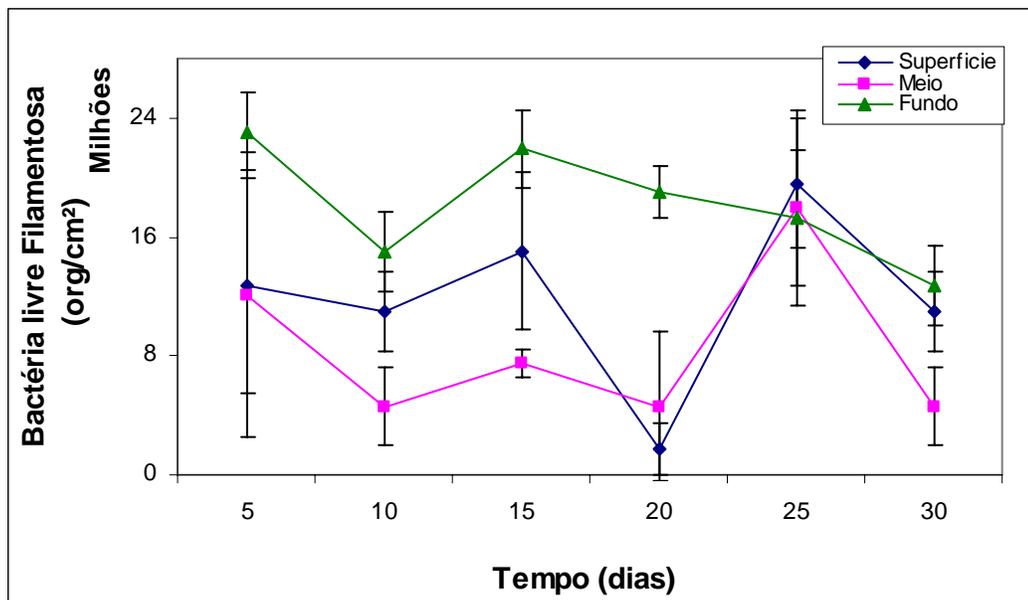


Figura 3 – Número médio de bactérias livres filamentosas por cm^2 e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).

As bactérias aderidas, por outro lado, não apresentaram muita variação durante o período experimental (Figura 4). O menor valor foi alcançado no início do experimento em todos os estratos – superfície, meio e fundo – com, respectivamente, $399 (\pm 4)$, $417 (\pm 21)$ e $385 (\pm 44)$ cel.cm^{-2} . No estrato da superfície, o maior valor - 15^o dia- com $595 (\pm 9)$ cel.cm^{-2} . No estrato do meio e fundo, o maior valor - 25^o dia- com $643 (\pm 66)$ e $518 (\pm 14)$ cel.cm^{-2} , respectivamente.

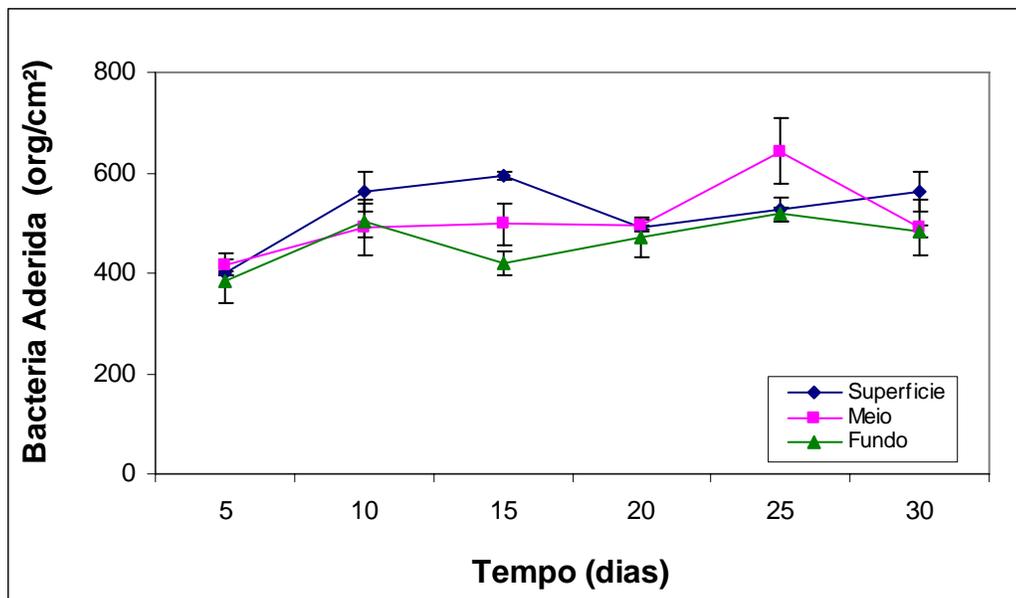


Figura 4 – Número médio de bactérias aderidas por cm² e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).

As cianobactérias unicelulares no estrato do meio e fundo apresentaram a mesma tendência (Figura 5), alcançando o maior valor no 20^o dia, com, respectivamente, 79.10^6 ($\pm 23.10^6$) e 51.10^6 ($\pm 8.10^6$) cel.cm⁻². Já o menor valor foi atingido em tempos diferentes: no estrato do meio, no 25^o dia, com 45.10^6 ($\pm 10.10^6$) cel.cm⁻², e no estrato do fundo, no 10^o dia, com 22.10^6 ($\pm 7.10^6$) cel.cm⁻². No estrato da superfície, o maior valor - 25^o dia- com 57.10^6 ($\pm 7.10^6$) cel.cm⁻², e o menor valor - 20^o dia- com 34.10^6 ($\pm 2.10^6$) cel.cm⁻².

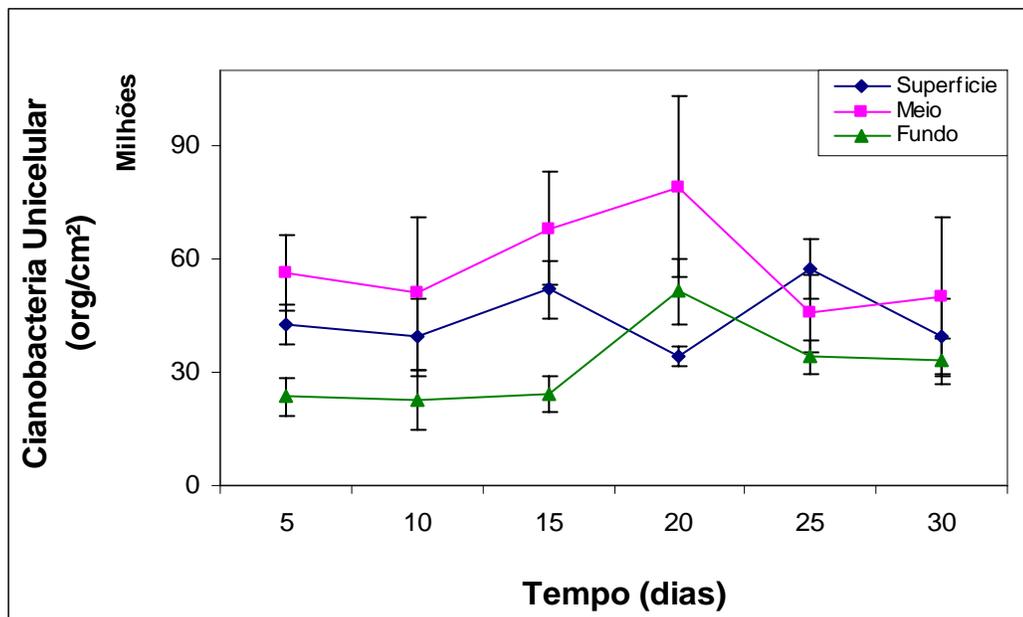


Figura 5 – Número médio de cianobactérias unicelular por cm^2 e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).

As cianobactérias filamentosas apresentaram a mesma tendência no estrato do meio e fundo (Figura 6). No estrato da superfície, o menor valor foi alcançado no 20º dia, com $1.10^6 (\pm 1.10^6)$ cel. cm^{-2} , e o maior, no 30º dia, com $22.10^6 (\pm 33.10^6)$ cel. cm^{-2} . No estrato do meio, o menor valor foi atingido no 25º dia, com $2.10^6 (\pm 9.10^5)$ cel. cm^{-2} , e o maior, no início do experimento, no 5º dia, com $18.10^6 (\pm 10.10^6)$ cel. cm^{-2} . No estrato do fundo, o menor valor - 25º dia- com $5.10^6 (\pm 1.10^6)$ cel. cm^{-2} , e o maior - 20º dia- com $24.10^6 (\pm 6.10^6)$ cel. cm^{-2} .

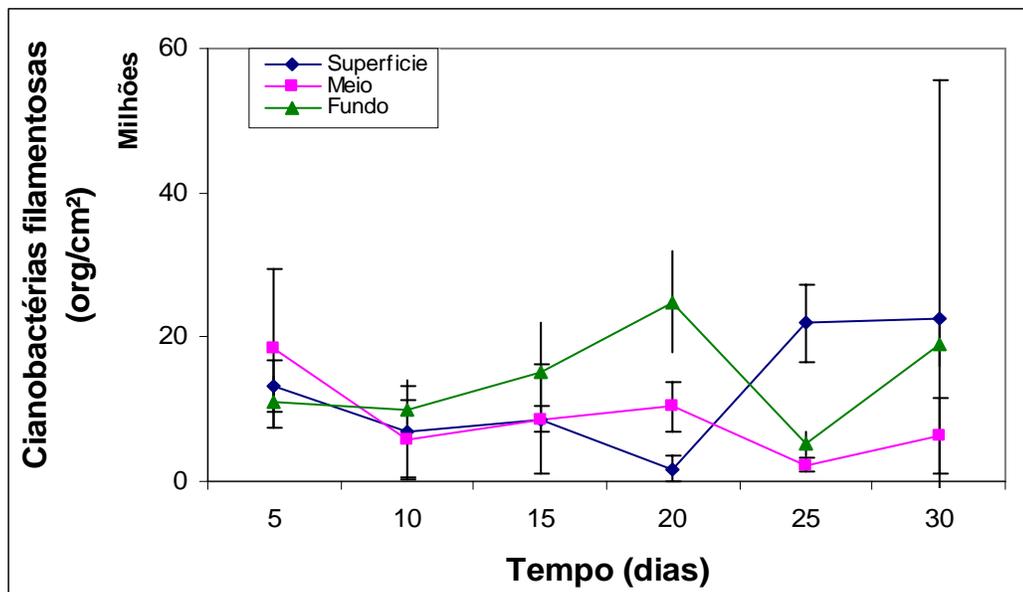


Figura 6 – Número médio de cianobactérias filamentosas por cm^2 e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).

Os flagelados apresentaram um comportamento variado durante o período experimental (Figura 7). No estrato da superfície, o menor valor foi alcançado no 5º e no 20º dia, com o mesmo valor médio de $10 \cdot 10^6 (\pm 1 \cdot 10^6)$ cel. cm^{-2} , e o maior valor foi alcançado no 10º e no 30º dia, também com o mesmo valor médio de $15 \cdot 10^6 (\pm 1 \cdot 10^6)$ cel. cm^{-2} . No estrato do meio, o menor valor - 15º dia- com $3 \cdot 10^6 (\pm 1 \cdot 10^6)$ cel. cm^{-2} , e o maior valor - 30º dia- com $12 \cdot 10^6 (\pm 1 \cdot 10^6)$ cel. cm^{-2} . No estrato do fundo, o menor valor foi atingido no 10º e no 15º dia, com $3 \cdot 10^6 (\pm 1 \cdot 10^6)$ cel. cm^{-2} , e o maior valor, no 20º e no 30º dia, com $10 \cdot 10^6 (\pm 1 \cdot 10^6)$ cel. cm^{-2} .

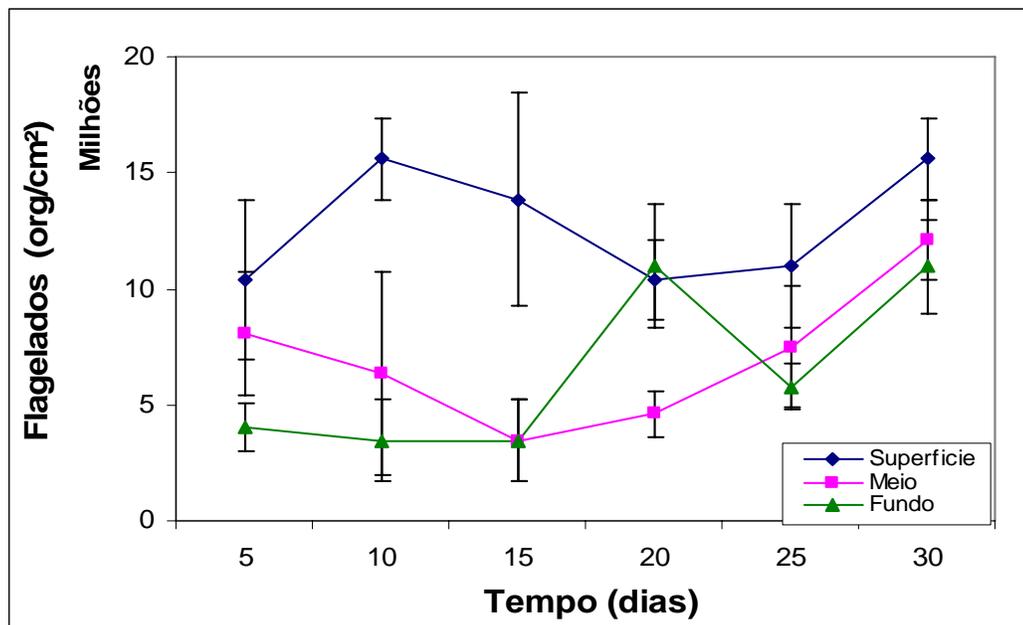


Figura 7 – Número médio de flagelados por cm^2 e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).

As diatomáceas cêntricas unicelulares apresentaram uma tendência variada (Figura 8). No estrato da superfície, o menor valor foi alcançado no 15^o dia, com 75472 (± 9076) cel.cm^{-2} , e o maior valor - 20^o dia, com 284050 (± 25153) cel.cm^{-2} . No estrato do meio, o maior - 10^o dia, com 280162 (± 29177) cel.cm^{-2} , e o menor valor - 25^o dia, com 43454 (± 7141) cel.cm^{-2} . No estrato do fundo, o menor valor - 15^o dia, com 12236 (± 1547) cel.cm^{-2} , e o maior valor - 25^o dia, com 118926 cel.cm^{-2} .

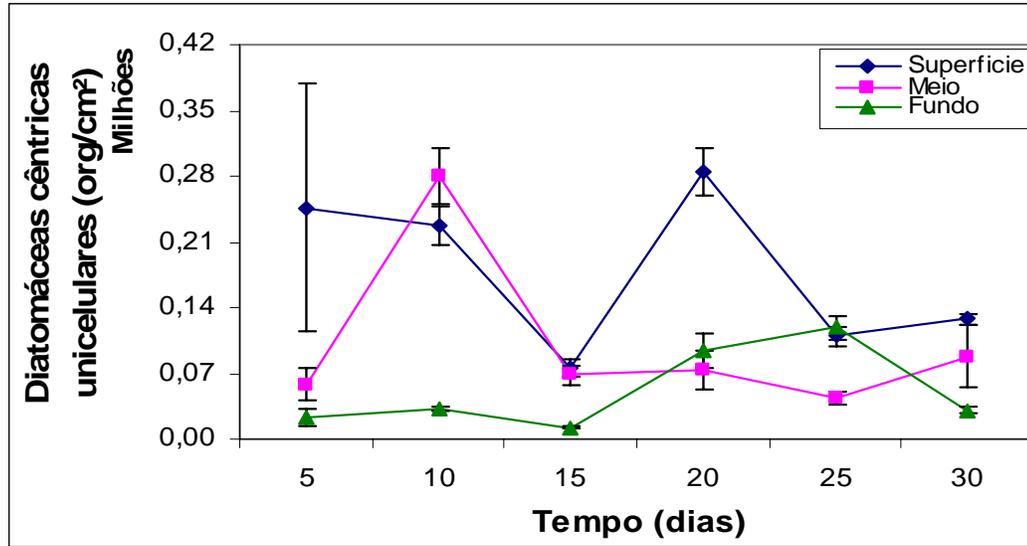


Figura 8 – Número médio de diatomáceas centricas unicelular por cm² e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).

O número médio de diatomáceas cêntricas em cadeia (*Melosira* sp.) apresentou uma tendência variada (Figura 9). No estrato da superfície, o maior valor foi alcançado no 10^o dia, com 532.793 (± 56270) cel.cm⁻², e diminuiu continuamente até atingir o menor valor no 30^o dia, com 207.206 (± 2744) cel.cm⁻². No estrato do meio, o maior valor - 20^o dia, com 411.667 (± 0) cel.cm⁻², e o menor valor - 25^o, com 85.764 (± 15721) cel.cm⁻². No estrato do fundo, o menor valor - 10^o dia, com 17.382 (± 8822) cel.cm⁻², e o maior valor - 25^o dia, com 263.010 cel.cm⁻².

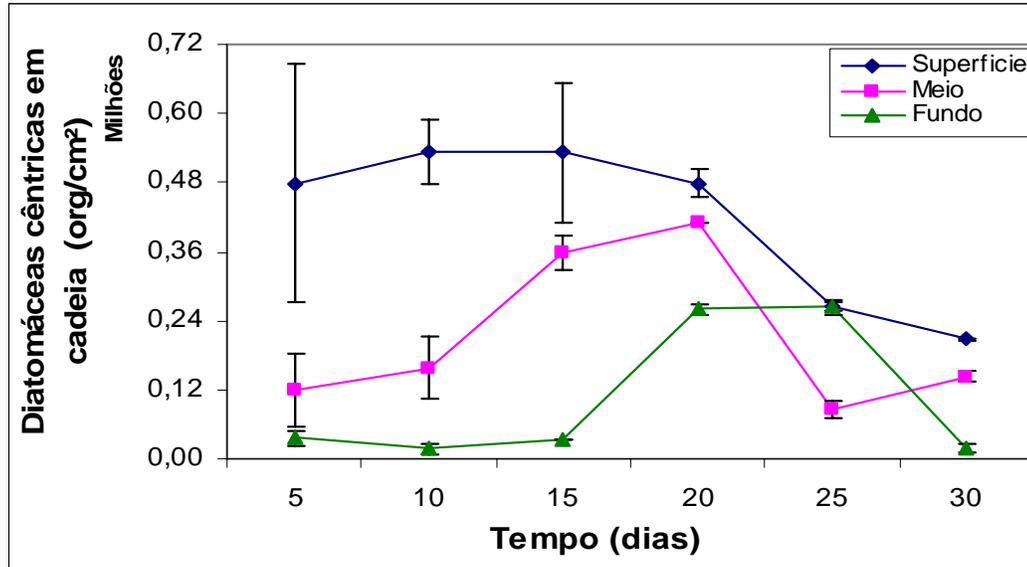


Figura 9 – Número médio de diatomáceas cêntricas, *Melosira sp.*, por cm^2 e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).

As diatomáceas penadas menores que $50\mu\text{m}$ no estrato da superfície apresentaram o maior valor no 10^o dia, com $154.691 (\pm 59658) \text{ cel.cm}^{-2}$, e o menor valor no 25^o dia, com $41.167 (\pm 6861) \text{ cel.cm}^{-2}$. No estrato do meio, o maior valor também foi alcançado no 10^o dia, com $171.528 (\pm 12369) \text{ cel.cm}^{-2}$, e o valor mínimo foi atingido no 20^o e no 30^o dia, com o mesmo valor de $2.744 (\pm 1372) \text{ cel.cm}^{-2}$. No estrato do fundo, o maior valor - 5^o dia, com $29.160 (\pm 5146) \text{ cel.cm}^{-2}$, e o menor - 15^o dia, com $686 (\pm 343) \text{ cel.cm}^{-2}$, e tornou a aumentar variando pouco (Figura 10).

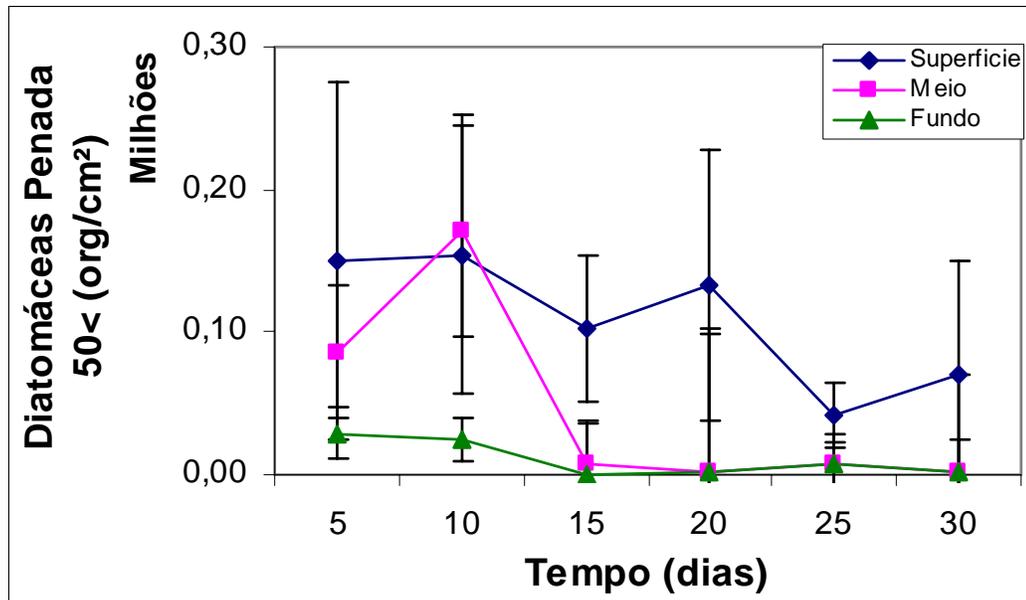


Figura 10 – Número médio de diatomáceas penada menores 50µm por cm² e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).

As diatomáceas penadas maiores que 50µm apresentaram grande variação na sua abundância ao longo do experimento (Figura 11). No estrato da superfície, atingiram o maior valor no início do experimento, no 5^o dia, com 116.639 (± 56474) cels.cm⁻², e o menor valor, no 10^o dia, com 67.435 (± 27696) cels.cm⁻². Em contrapartida, no estrato do meio e do fundo, o menor valor foi alcançado no início do experimento, com 42.310 (± 4317) e 13.150 (± 1981) cels.cm⁻² e o maior valor, no 20^o dia, com 193.941 (± 48171) e 212.237 (± 81070) cels.cm⁻², respectivamente.

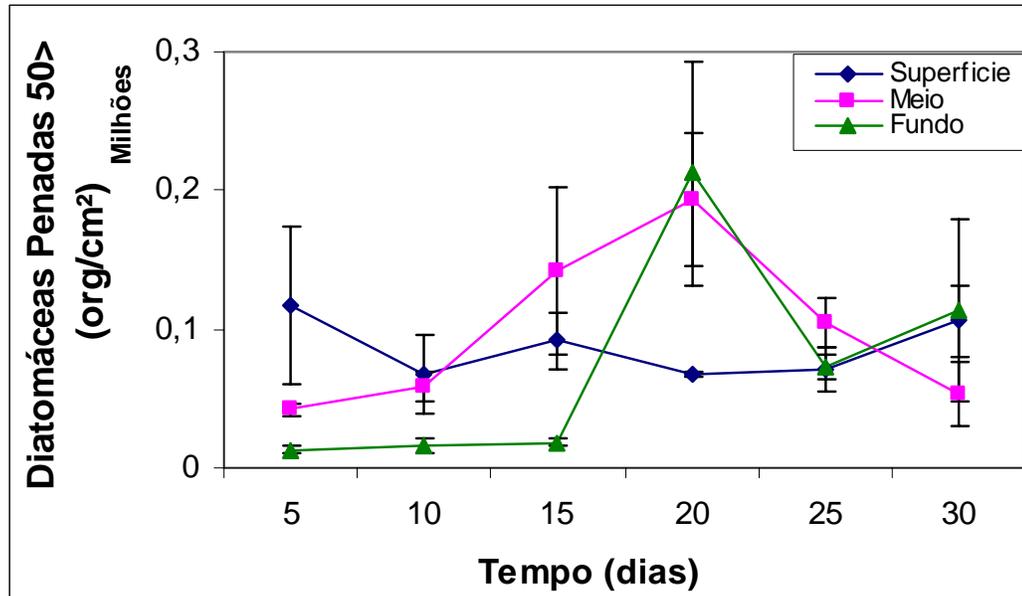


Figura 11 – Número médio de diatomáceas penadas maiores que 50 μm por cm^2 e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).

Os nematódeos maiores que 200 μm apresentaram a mesma tendência no estrato da superfície e do fundo, em que o maior valor foi atingido no 25^o dia, com 1.365 (± 114) e 665 (± 106) cels. cm^{-2} . No estrato do meio, o maior valor - 20^o dia, com 599 (± 46) cels. cm^{-2} . Em todos os estratos, o menor valor foi encontrado no início do experimento, no 5^o dia, com 24 (± 3), 7 (± 4) e 17 (± 2) cels. cm^{-2} , respectivamente superfície, meio e fundo (Figura 12). Os nematódeos maiores que 200 μm não apresentaram diferenças significativa entre os estratos. Mas os dias 5, 10 e 15 apresentaram diferença significativa em relação aos dias 20, 25 e 30. Sendo os maiores valores médios encontrados nas fases finais de formação do biofilme.

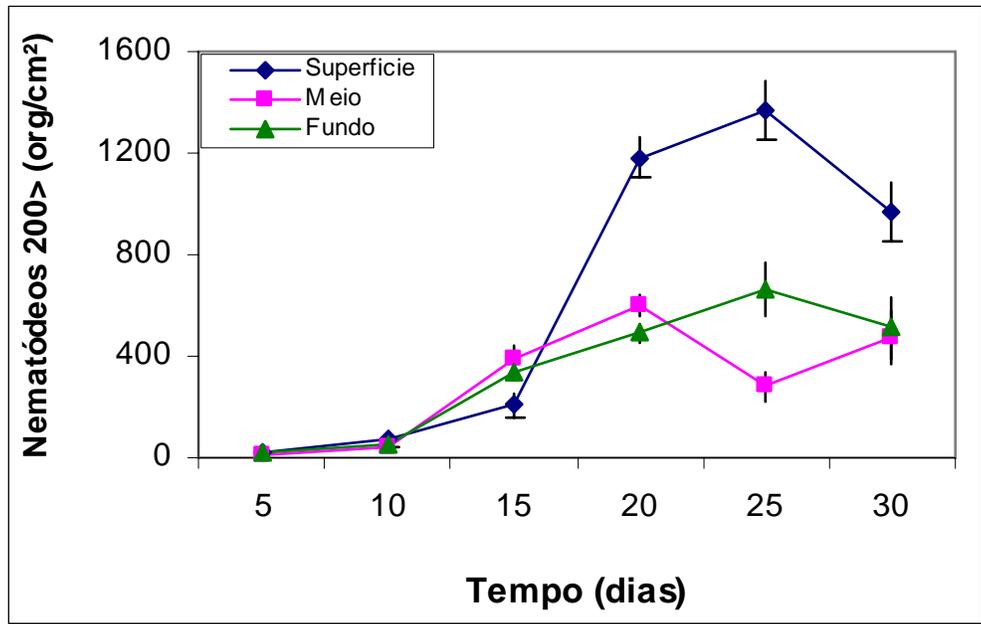


Figura 12 – Número médio de nematódeos maiores que 200 μm por cm^2 e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).

Seguindo o mesmo padrão dos nematódeos maiores que 200 μm , os nematódeos menores que 200 μm apresentaram a mesma tendência no estrato da superfície e do fundo quando alcançaram o maior valor, no 25^o dia, com 1.103 (± 205) e 376 (± 55) cels.cm^{-2} . No estrato do meio, o maior valor foi encontrado no 15^o dia, com 543 (± 40) cels.cm^{-2} . Em todos os estratos, o menor valor foi alcançado no início do experimento, no 5^o dia, com 25 (± 8), 6 (± 2) e 6 (± 2) cel.cm^{-2} , respectivamente para superfície, meio e fundo (Figura 13). Os nematódeos menores que 200 μm não apresentaram diferenças significativas entre os estratos. Mas os dias 5, 10 e 15 apresentaram diferenças significativa em comparação com os dias 20, 25 e 30. Sendo os maiores valores médios encontrados nas fases finais de formação do biofilme, o mesmo padrão foi observado nos nematódeos maiores que 200 μm .

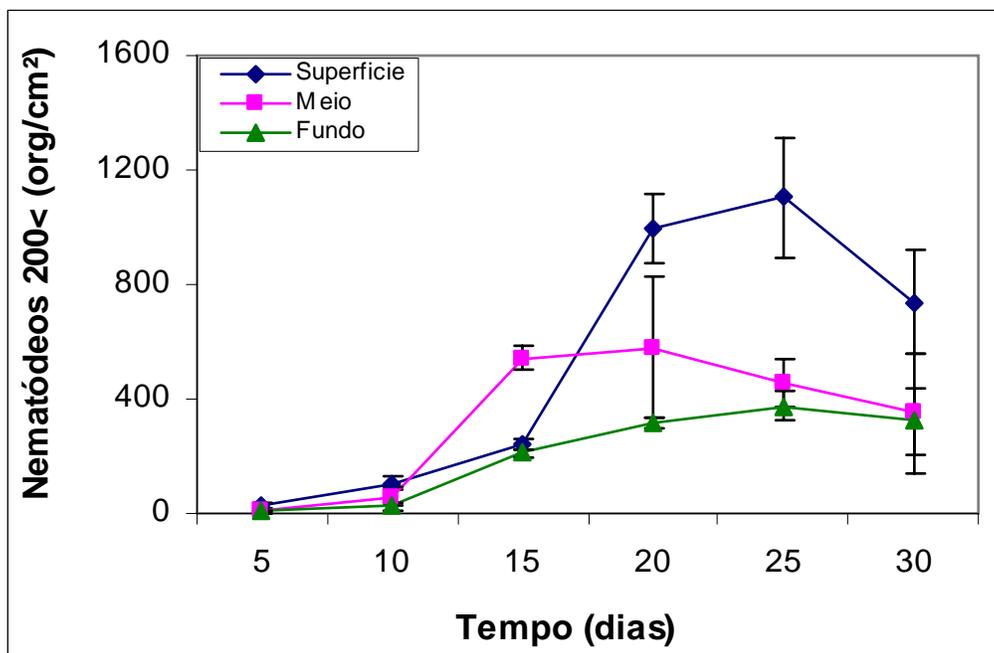


Figura 13 – Número médio de nematódeos menores que 200 μm por cm^2 e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).

4.3. Composição Bioquímica do Biofilme

4.3.1 Proteína:

O conteúdo protéico do biofilme apresentou grande variação ao longo do período experimental, mas não apresentou diferença estatisticamente significativa nem ao longo do tempo nem entre os estratos. O estrato da superfície alcançou o menor valor no 15^o dia, com $0,47 (\pm 0,45) \text{ mg.cm}^{-2}$, e o maior valor, no 20^o dia, com $1,65 (\pm 0,84) \text{ mg.cm}^{-2}$. O estrato do meio atingiu o menor valor no 15^o dia, com $0,30 (\pm 0,29) \text{ mg.cm}^{-2}$, e o maior valor, no 25^o dia, com $2,7 (\pm 1,11) \text{ mg.cm}^{-2}$. O estrato do fundo chegou ao menor valor no início do experimento, no 5^o dia, com $0,36 (\pm 0,2) \text{ mg.cm}^{-2}$, e o maior valor, no 25^o dia, com $1,81 (\pm 0,86) \text{ mg.cm}^{-2}$ (Figura 14).

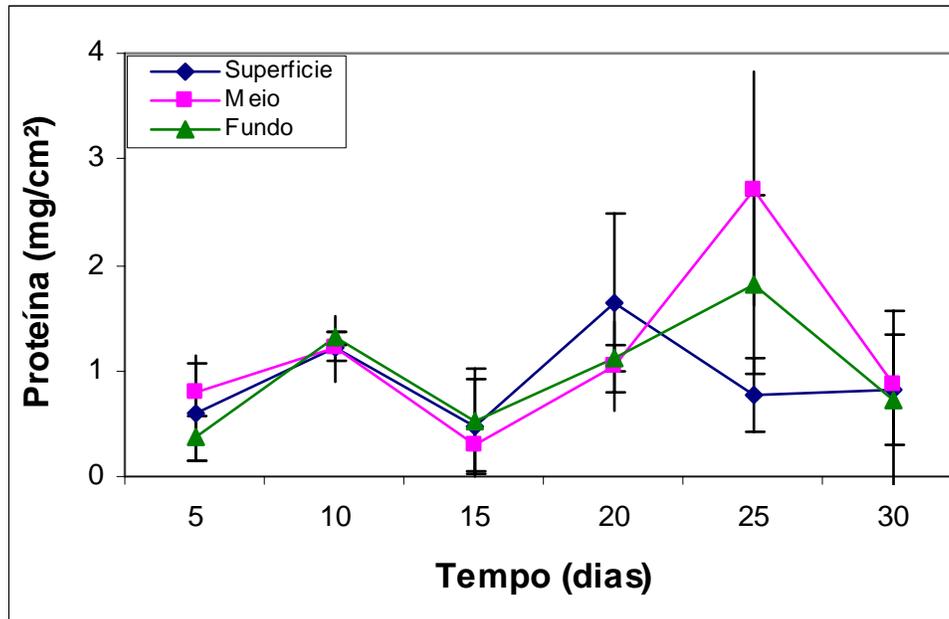


Figura 14 – Concentração do conteúdo protéico do biofilme durante o período experimental, 30 dias.

Ao transformar os valores do conteúdo protéico para porcentagem, encontramos o maior valor de proteína no 10^o dia nos estratos do fundo e meio, respectivamente com 6,4 e 6,6 %, como pode ser observado na Figura 15. O menor valor foi encontrado no 30^o dia para o estrato do meio, com 0,9%, e no 5^o e no 30^o dia, com 2,2 e 2,3% no estrato do fundo. O estrato da superfície manteve durante o período experimental valores mais próximos, variando de 0,8 %, no 15^o dia, a 3,2% no 20^o dia.

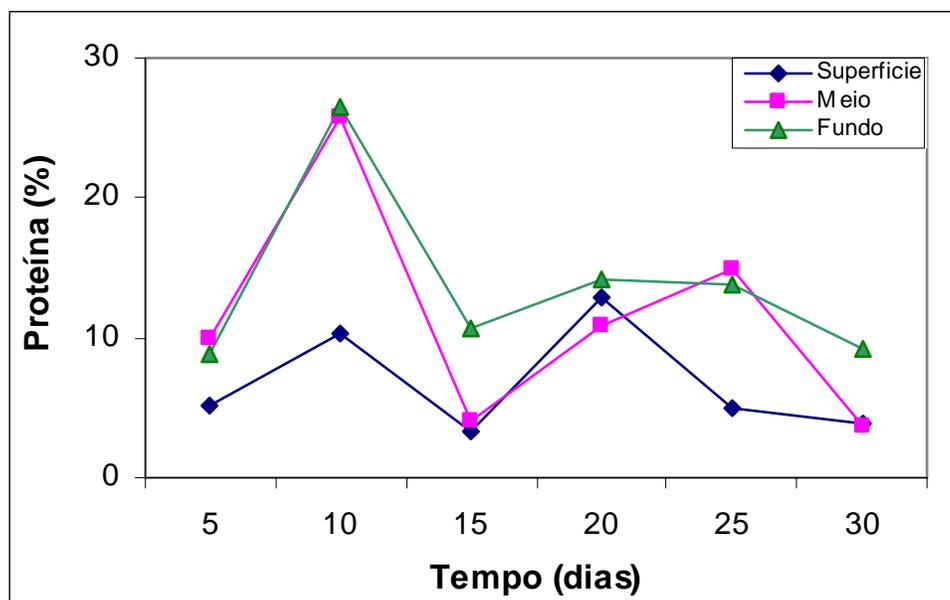


Figura 15 – Porcentagem do conteúdo protéico do biofilme durante o período experimental, 30 dias, em base seca.

4.3.2. Lipídio:

Observa-se que, de maneira geral, o conteúdo lipídico aumentou gradualmente nos três estratos (Figura 16). O estrato da superfície e do meio apresentaram a mesma tendência, alcançando, respectivamente, o menor valor no 10^o dia, com 40 (\pm 5) e 23 (\pm 4) mg.cm⁻², e o maior valor no 30^o dia, com 105 (\pm 3) e 97 (\pm 4) mg.cm⁻². O estrato do fundo encontrou o menor valor no 5^o dia, ou seja, no início do experimento, com 8 (\pm 5) mg.cm⁻², e o maior valor no 25^o dia, com 54 (\pm 6) mg.cm⁻².

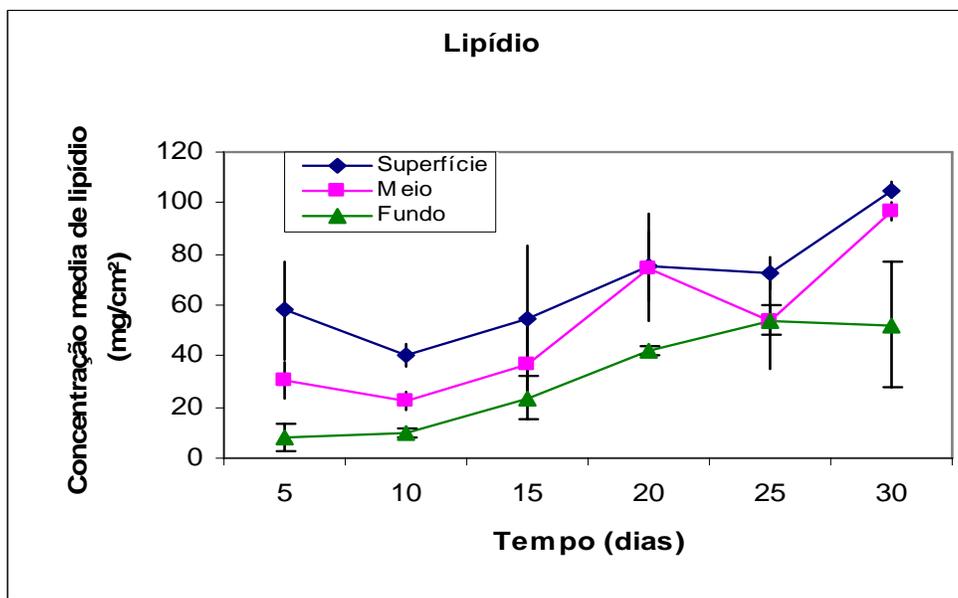


Figura 16 – Concentração de lipídio no biofilme durante o período experimental, 30 dias.

4.4. Correlações

De acordo com os valores de correlação apresentados na Tabela 2, verifica-se que as medidas de proteínas apresentaram correlação mais altas e positivas com diatomáceas cêntricas unicelulares na superfície e no fundo ($r = 0,71$ e $0,80$) e com bactérias aderidas, nos estratos do meio e fundo, com $r = 0,84$ e $0,88$, respectivamente. Outros organismos apresentaram uma correlação não tão alta, tais como, bactéria livre filamentosa ($r = 0,69$), no estrato do meio, e diatomáceas cêntricas em cadeia ($r = 0,66$) no estrato do fundo. As concentrações de lipídios apresentaram correlação positiva alta nos três estratos com nematódeos maiores que $200 \mu\text{m}$ ($r = 0,70$, $0,80$ e $0,97$), bem como, com nematódeos menores que $200 \mu\text{m}$ ($r = 0,65$, $0,52$ e $0,97$). Também apresentou uma correlação positiva, mas não tão alta, no estrato do fundo, com bactérias em divisão ($r = 0,69$), bactérias livres cocóides ($r = 0,69$), cianobactérias unicelulares ($r = 0,64$), flagelados ($r = 0,72$), diatomáceas cêntricas unicelulares ($r = 0,65$) e diatomáceas penadas maiores que $50 \mu\text{m}$ ($r = 0,66$).

Tabela 2 - Correlação entre os microorganismos e o conteúdo protéico e lipídico, (coeficiente de Pearson, *r*).

	Superfície		Meio		Fundo	
	Proteína	Lipídio	Proteína	Lipídio	Proteína	Lipídio
Bactéria em Divisão	0,26	0,44	0,34	0,37	0,18	0,69
Bactéria Livre Cocóide	-0,65	-0,05	0,38	-0,42	0,18	0,69
Bactéria Livre Filamentosa	-0,8	-0,13	0,69	-0,25	-0,46	-0,48
Bactéria Aderida	-0,05	0,05	0,84	0,17	0,88	0,58
Cianobactéria Unicelular	-0,7	-0,14	-0,53	0,1	0,31	0,64
Cianobactéria Filamentosa	-0,57	0,57	-0,57	-0,25	-0,37	0,23
Flagelados	-0,1	0,03	0,17	0,52	0,07	0,72
Nematódeos Maiores que 200 µm	0,35	0,70	-0,09	0,80	0,49	0,97
Nematódeos Menores que 200 µm	0,37	0,65	0,08	0,52	0,43	0,97
Diatomácea Cêntrica Unicelular	0,71	-0,23	-0,08	-0,4	0,80	0,65
Diatomácea Cêntrica em Cadeia	0,16	-0,84	-0,52	0,13	0,66	0,59
Diatomáceas Penadas Menores que 50 µm	0,35	-0,63	-0,06	-0,69	-0,13	-0,77
Diatomáceas Penadas Maiores que 50 µm	-0,65	0,28	-0,03	0,22	0,23	0,66

4.5. Biomassa do Biofilme

Como pode ser observado na Figura 17, o conteúdo médio de clorofila *a* apresentou a mesma tendência – crescente – em todos os estratos. Em todos os estratos, os maiores valores foram alcançados no 30º dia com 2,3 ($\pm 0,82$), 2,45 ($\pm 0,39$) e 3,49 ($\pm 4,47$) mg.cm⁻² para superfície, meio e fundo, respectivamente. Já o valor mínimo difere nos estratos: a superfície o alcançou no 10º dia, com 0,56 ($\pm 0,09$) mg.cm⁻², e o meio e o fundo o atingiram no início do experimento, com 0,43 ($\pm 0,06$) e 0,14 ($\pm 0,07$) mg.cm⁻². A concentração de clorofila *a* não apresentou diferenças significativa entre os estratos nem entre os tempos, com exceção do tempo 30, o qual se mostrou significativamente diferente dos outros.

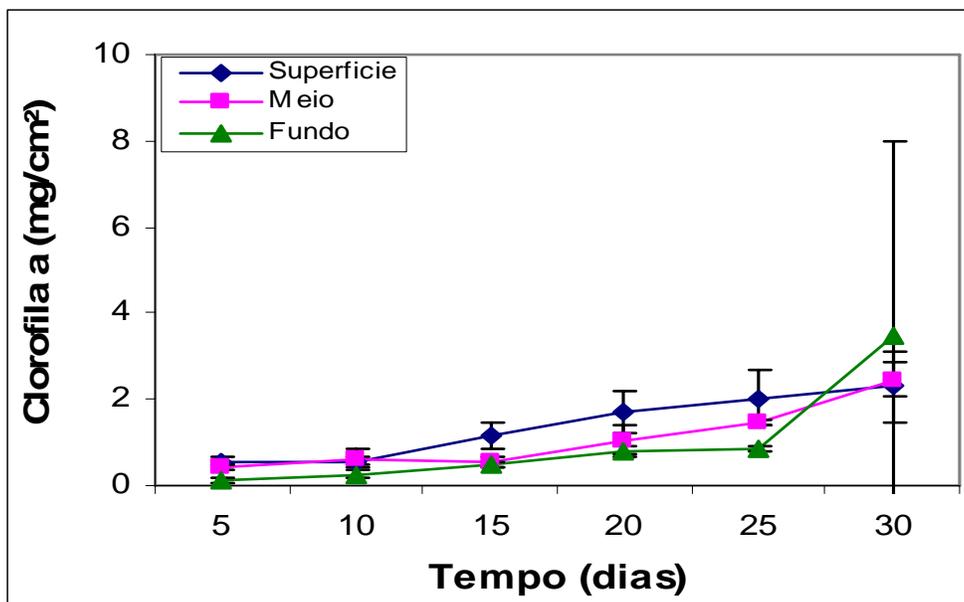


Figura 17 – Conteúdo médio de clorofila *a* e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).

Como pode ser observado na Figura 18, o conteúdo médio de peso seco apresenta uma tendência parecida no estrato da superfície e do meio, isto é, crescente. No estrato da superfície, o menor valor foi encontrado no 5^o e no 10^o dia de experimento, com 12 (± 4) mg.cm^{-2} . O menor valor no estrato do meio foi atingido no 10^o dia, com 5 (± 1) mg.cm^{-2} . Em ambos os estratos – superfície e meio – o maior valor foi alcançado no 30^o dia, com 21 (± 14) e 24 (± 4) mg.cm^{-2} . No estrato do fundo, o menor valor foi observado no início do experimento, no 5^o dia, com 4 (± 2) mg.cm^{-2} , e o maior valor, no 25^o dia, com 13 (± 3) mg.cm^{-2} .

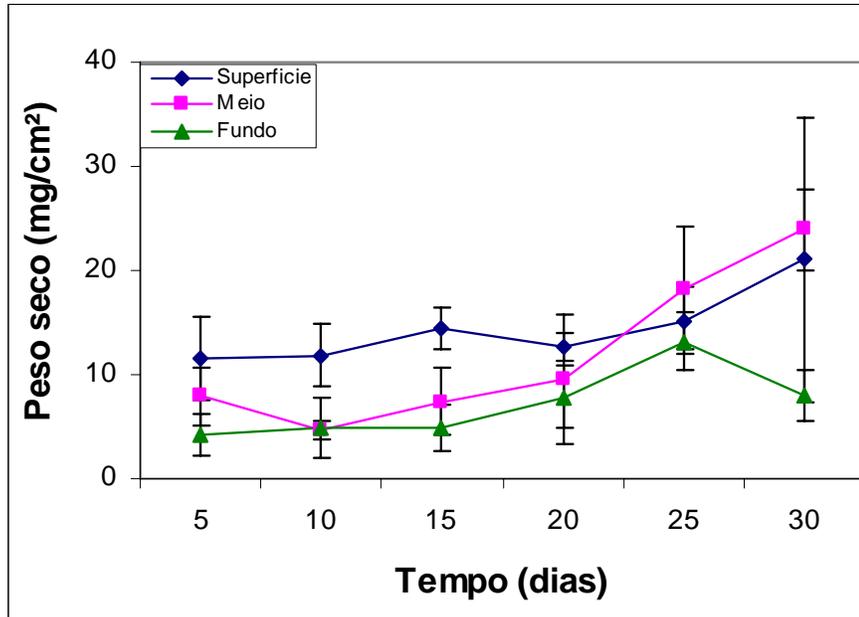


Figura 18 – Conteúdo médio de peso seco e desvio padrão nas diferentes profundidades durante o período experimental (30 dias).

5. DISCUSSÃO

O biofilme vem sendo cada vez mais utilizado na aqüicultura, com conseqüente aumento na produtividade do sistema, ou seja, maior sobrevivência e crescimento dos organismos cultivados (HUCHETTE *et al.*, 2000; BRADVOLD e BROWDY, 2001; MRIDULA *et al.*, 2003; AZIM *et al.*, 2001, 2002, 2003b e 2004; KESHAVANATH *et al.*, 2004.). Esse fato se explica, pois o biofilme auxilia na manutenção da qualidade da água, devido à presença de bactérias nitrificantes e microalgas, além de fornecer nutrientes essenciais aos organismos cultivados. Por exemplo, Thompson *et al.* (2002) encontraram diferenças significativas entre o crescimento de juvenis de *F. paulensis* cultivados em tanques na presença e na ausência de biofilme. Neste mesmo trabalho, a análise do conteúdo estomacal de *F. paulensis* indicou que esta espécie consome ativamente o biofilme de forma não seletiva. Já Ballester *et al.* (2003) demonstrou a influência positiva do biofilme sobre o crescimento de juvenis de *F. paulensis*, em gaiolas, na fase de berçário. Esse autor sugeriu que o biofilme representa uma fonte suplementar de alimento, estando disponível 24 horas, sem afetar a qualidade de água. Outros autores (Langis *et al.*, 1988; Stoner e Zimmerman, 1988; Bartlett *et al.*, 1993; e Santos, 2003) também demonstraram a importância do biofilme como complemento alimentar.

Comprovando a importância do alimento natural nos cultivos, Anderson *et al.* (1987) estimaram que este é responsável por 65% do carbono assimilado por *Litopenaeus vannamei*. Segundo os autores, esses resultados se devem parcialmente à presença de alimento natural na forma de biofilme, o qual estaria funcionando como um complemento alimentar.

Porém, a influência do substrato artificial como promotor no crescimento no cultivo de camarão pode variar de acordo com a espécie ou ontogenia. Ballester (2003) detectou influência positiva do substrato artificial no crescimento de *F. paulensis* durante a fase de berçário. Domingos (2003), cultivando *L. vannamei* em viveiros, não registrou diferença no crescimento dos camarões, mas relatou sobrevivências significativamente maiores nos tratamentos com substrato artificial em relação aos tratamentos sem substratos. Em contrapartida, Kumlu *et al.* (2001) verificaram que o incremento de substrato artificial influenciou negativamente o crescimento e a sobrevivência de *Metapenaeus monoceros*

durante a fase de berçário. Preto *et al.* (2004) não encontraram diferenças significativas na sobrevivência e no crescimento de *F. paulensis* cultivados em gaiolas durante a fase de berçário, com a adição de substrato artificial. Similarmente, Pissetti (2005) mostrou que o uso de substrato artificial para fixação de biofilme, com o intuito de aumentar a disponibilidade de alimento natural aos camarões *F. paulensis*, não afetou significativamente a taxa de sobrevivência, crescimento e conversão alimentar (TCA) dos camarões. Apesar disso, Pissetti (2005) observou que um incremento na taxa de crescimento dos camarões entre a 9ª e 10ª semana, concomitante com a diminuição do peso seco de biofilme neste mesmo período. Análises posteriores demonstraram a existência de grande abundância de nematódeos (mais de 300 mil nematódeos. cm⁻²) no mesmo período (Ballester, comunicação pessoal). Tal fato sugere que o consumo de nematódeos por *F. paulensis* fez com que estes camarões crescessem de maneira mais acelerada do que em outros períodos do estudo.

Os microorganismos presentes no biofilme demonstraram ser uma fonte alimentar também para outras espécies de organismos cultivados. Por exemplo, segundo Umesh *et al.* (1999), o biofilme é responsável pelo aumento em 50% do crescimento de peixes *Labeo rohita*, *Cyprinus carpio*, *Oreochromis mossambicus*, além de melhorar a qualidade da água dos cultivos pela diminuição da amônia. Já Azim *et al.* (2001a) observaram um aumento de 77% no crescimento de *Labeo rohita* cultivados em tanques com substratos artificiais, quando comparados àqueles cultivados em tanques desprovidos de substrato. O mesmo experimento foi realizado com *Labeo gonius*, mas não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos. Os autores relacionaram essas diferenças no hábito alimentar entre duas espécies, pois enquanto *L. rohita* regularmente era observado alimentando-se de biofilme, *L. gonius* não o consumia.

Outra característica relacionada ao biofilme e já citada nesse trabalho, é a manutenção da qualidade da água. Langis *et al.* (1988), trabalhando com o crustáceo *Daphnia magna*, sugeriram que o biofilme formado em substratos artificiais pode ser mais importante em sistemas intensivos de cultivos, uma vez que a concentração de metabólitos nesses sistemas é elevada. Nos sistemas intensivos de cultivo de camarões, o biofilme formado nos substratos artificiais melhora a qualidade da água, especialmente pela redução nas concentrações de amônia e nitrito. Thompson *et al.* (2002) relacionaram a melhoria na

qualidade de água em tanques de larvicultura de *F. paulensis* com a redução de amônia devido à absorção deste elemento nitrogenado por diatomáceas e cianobactérias presentes no biofilme. Entretanto, Oliveira (2004) demonstrou que a redução dos níveis de amônia em tanques de cultivo de *F. paulensis* está relacionado à presença de bactérias nitrificantes e desnitrificantes. Esta autora utilizando o método “Fluorescent in situ hybridization – FISH” possibilitando relacionar a presença de bactérias do grupo β e γ -proteobactérias com a variação da amônia, enquanto que as α -proteobactéria foram relacionadas com a variação de nitrito. Além destes fatores citados anteriormente, pode-se dizer que a presença do substrato artificial pode reduzir o estresse dos camarões devido a melhor distribuição espacial dos animais (BRATVOLD e BROWDY, 2001).

As células bacterianas sésseis encontradas no biofilme apresentam algumas vantagens sobre as células bacterianas planctônicas, principalmente no que diz respeito à proteção contra agentes agressivos. Essa característica é dada pela matriz orgânica, que oferece também resistência a desinfetantes, antibióticos, radiação UV (ELASRI e MILLER, 1999), desidratação, predadores, choque osmótico, alterações de pH e, por fim, ao seqüestro de cátions, metais e toxinas.

Em culturas de células planctônicas, o transporte de soluto do meio líquido para cada célula é um processo relativamente rápido, não constituindo um passo limitante quanto aos bioprocessos celulares. O mesmo não ocorre no biofilme, em que o ambiente denso se torna um fator limitante à transferência homogênea de nutrientes para todas as células. A transferência de nutrientes ocorre por meio de difusão pelos canais existentes no biofilme, num processo muito mais lento (DE BEER *et al.*, 1994). A limitação no transporte de nutrientes cria um gradiente de soluto, dando condições para a formação de micronichos.

Na maioria das vezes, o biofilme não é formado por apenas uma espécie, mas sim, por um consórcio de microorganismos. A variação na composição das espécies que compõem o biofilme está relacionada a fatores ambientais, tais como, nutrientes, pH, temperatura e oxigênio dissolvido. No presente estudo, os grupos de maior predominância no biofilme foram: bactérias, cianobactérias, diatomáceas cêntricas e penadas, flagelados e nematódeos. Nenhum desses grupos apresentou diferença significativa entre os estratos. O grupo dos nematódeos foi o único que apresentou diferença significativa entre o início e o fim do experimento, se mostrando mais abundante nas fases finais do trabalho.

Em estudos no mesmo local, Preto (2005) registrou aproximadamente 7.10^3 cels.cm⁻² de diatomáceas cêntricas, 36.10^3 cels. cm⁻² de diatomáceas penadas grandes e 47.10^3 cels.cm⁻² de diatomáceas penadas pequenas. Os valores encontrados por Preto (2005) são menores do que aqueles encontrados no presente estudo (4.10^4 - 76.10^4 cels.cm⁻² de diatomáceas cêntricas, 1.10^4 - 26.10^4 cels.cm⁻² de diatomáceas penadas), porém, ressalta-se que na presente investigação não houve a presença de camarões. Dessa forma, pode-se atribuir os menores valores encontrados por Preto (2005) ao consumo dos microorganismos presentes no biofilme pelos camarões. Por outro lado, Ballester (2003) encontrou o número máximo de bactérias (5.10^6 cels.cm⁻²), diatomáceas penadas (103.10^6 cels.cm⁻²), diatomáceas cêntricas (20.10^6 cels.cm⁻²), cianobactérias (14.10^5 cels.cm⁻²), ciliados (14.10^5 cels.cm⁻²) e nematódeos (9.10^5 cels.cm⁻²). Esses valores são superiores ao número dos mesmos organismos encontrados neste estudo (4.10^4 - 76.10^4 cels.cm⁻² de diatomáceas cêntricas e 13 - 2468 cels.cm⁻² de nematódeos). Neste caso, a hipótese de predação não explicaria as baixas densidades observadas no presente trabalho, visto que não havia camarões em nossos cercados junto com biofilme. Destaca-se, ainda, uma quantidade muito maior de bactérias aderidas no presente trabalho do que no trabalho de Ballester (2003). É provável que estas diferenças sejam devidas à ação de outros fatores ambientais, tais como, disponibilidade de nutrientes, temperatura e salinidade, que atuam diretamente na composição dos microorganismos no biofilme.

Experimentos anteriores realizados no mesmo local deste estudo (BALLESTER, 2003; SANTOS, 2003; PISSETTI, 2005; PRETO, 2005) apresentam valores máximos de clorofila *a* distintos. Ballester (2003) registrou no primeiro experimento valores máximos de clorofila *a* iguais a $9,34 \mu\text{g.cm}^{-2}$, em 28 dias, no segundo experimento o valor médio de clorofila *a* foi de $2,9 \mu\text{g.cm}^{-2}$, em 45 dias, e no terceiro experimento o valor máximo foi de $2,95 \mu\text{g.cm}^{-2}$, em 45 dias. Santos (2003) encontrou valores máximos próximos a $4 \mu\text{g.cm}^{-2}$, em 30 dias de experimento. Pissetti (2005) registrou valores máximos próximos a $13 \mu\text{g.cm}^{-2}$, em 30 dias de experimento. Neste estudo, o valor máximo de clorofila *a* encontrado foi $3,49 \mu\text{g.cm}^{-2}$ em 30 dias de experimento no estrato do fundo, não sendo encontrada diferença significativa entre os estratos. Como se pode observar, os valores de clorofila *a* em uma mesma região flutuam bastante, demonstrando a grande influência do ambiente

sobre a concentração de clorofila *a*, provavelmente devido à comunidade de microalgas que compõem o biofilme em diferentes épocas do ano.

Como visto anteriormente, a comunidade de microorganismos é muito variável, alterando diretamente a concentração de clorofila *a*, quando há uma diminuição de organismos autotróficos e mixotróficos, produtores desse pigmento. Abreu (1992) observou grande variabilidade temporal de clorofila *a* na coluna da água devido à temperatura e a eventos que causam ressuspensão de material no estuário da Lagoa dos Patos, mostrando assim a influência dos fatores ambientais sobre a concentração de clorofila *a* na coluna da água. Partindo desse contexto, os resultados deste estudo corroboram com as conclusões de Pissetti (2005), que sugere a verificação simultânea de clorofila *a* e peso seco, usando ambos os parâmetros para medir a maturidade do biofilme abrangendo, assim, todo o espectro de organismos constituintes do biofilme.

Thompson *et al.* (2002) sugeriram que o grau de maturidade do biofilme pode ser medido pela concentração de clorofila *a*. De acordo com esses autores, o biofilme pode ser considerado maduro (máxima absorção de amônia) quando apresenta uma concentração de $5\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ de clorofila *a*. Porém, considera-se que esta premissa não é válida visto que na sua composição o biofilme não apresenta apenas organismos autotróficos, os quais contém clorofila *a*, mas também organismos heterotróficos e material inerte (ou seja, polímeros e metabólitos). Por esses motivos, sugere-se que o peso seco do biofilme seja considerado juntamente com a concentração de clorofila *a* de modo a fornecer uma idéia mais precisa do grau de maturidade do biofilme, da mesma forma como sugerido por Pissetti (2004).

A relação entre a presença de biofilme e maiores taxas de crescimento e sobrevivência, vinculadas à diminuição da conversão alimentar, deve-se às qualidades nutricionais atribuídas ao biofilme, devido à presença de micro e macronutrientes (e.g. vitaminas, ácidos graxos poliinsaturados, esteróis, aminoácidos, carotenóides) (LANGIS *et al.*, 1988; THOMPSON *et al.*, 2002). Tendo em vista esses elementos, Thompson *et al.* (2002) e Santos (2003), consideram que o biofilme é um ótimo complemento alimentar.

Abreu *et al.* (1998), trabalhando com larvas de *F. paulensis* e aplicando novos conceitos relacionados com a ecologia e microorganismos aquáticos, observaram que os microorganismos presentes no biofilme representam uma fonte substancial de nitrogênio e

fósforo para os camarões cultivados, além de apresentarem na sua composição nutrientes essenciais como ácidos graxos poliinsaturados, esteróis e aminoácidos.

Mridula *et al.* (2003) reportaram valores mais altos de RNA, DNA e da razão RNA/DNA em peixes cultivados em tanques providos de substratos extras em relação aos controles e relacionam esse fato ao aumento da síntese de proteínas nos peixes cultivados sob a presença de maiores quantidades de biofilme. Nesse mesmo estudo os autores encontraram maior atividade das proteases, lipases e amilases nos peixes cultivados nos tanques providos de substratos, o que indicaria uma maior contribuição em termos de proteínas, lipídios e carboidratos presentes no biofilme. Os peixes cultivados nos tanques com substratos extras tiveram um crescimento de 34 a 46% maior em relação aos controles. Da mesma forma, foi determinada uma sobrevivência significativamente maior dos peixes cultivados nos tanques com maior quantidade de biofilme disponível. Confirmando os resultados de Mridula *et al.* (2003) quanto à atividade das proteases, Avnimelech (2000) observou que a presença de microorganismos nos tanques de cultivos aumenta a eficiência da conversão protéica de 20–25 % para cerca de 45 %, pois estes convertem o nitrogênio inorgânico presente na água e os disponibilizam na forma de proteína microbiana que se ingerida pelos organismos cultivados pode economizar o alimento fornecido.

Os resultados encontrados no presente estudo indicaram que os valores médios de proteína variaram entre 0,3 - 2,7 mg.cm⁻², não apresentando diferença significativa entre os estratos e nem ao longo do período experimental. Ao converter os valores para porcentagem, em base seca, registramos que o conteúdo protéico variou entre 3,3 e 26,5% do biofilme. Estes resultados são semelhantes aos de Santos (2003) e Azim *et al.* (2001b e 2002). Santos (2003), analisando a composição proximal do biofilme formado no mesmo local do presente estudo, encontrou 14,7% de proteína, 3,7% de lipídio, 61,2% de carboidrato e 20,4% de cinzas, em base seca. Azim *et al.* (2001b), que registraram níveis de cinzas entre 12-68% e proteína, entre 22-26%, sugerem que a variação existente poderia ser atribuída aos níveis de fertilização e predação sobre o biofilme. Em estudo posterior, Azim *et al.* (2002) encontraram valores protéicos mais elevados para o biofilme. Ao analisar a qualidade nutricional do biofilme, em três substratos diferentes, o bambu foi o substrato que apresentou a melhor qualidade nutricional (19,6 kJ.g⁻¹ de energia, 38,3% de proteína, 7,3% de lipídio, 46,4% de carboidrato, 8 % residual, valores referentes a peso seco livre de

cinzas). Em outro estudo, Azim *et al.* (2003), analisando a composição proximal do biofilme formado em lâminas de vidro antes e após ser consumido por carpas (*Cyprinus carpio carpio*), encontraram valores mais baixos após a predação (65% de cinzas, 13% de proteína, 1,2% de lipídio e $6,2\text{kJ}\cdot\text{g}^{-1}$, em base seca.), sendo que os valores anteriores à predação eram iguais a 55% de cinzas, 17% de proteína, 1,6% de lipídio, $8,5\text{kJ}\cdot\text{g}^{-1}$. No mesmo estudo, os autores sugerem que a composição proximal do biofilme depende da sua composição taxonômica.

Já Thompson *et al.* (2002), ao analisar o biofilme desenvolvido em tanques com *F. paulensis* na fase de berçário, determinaram que cerca de 6% do biofilme é composto por proteína (base úmida). Midrula *et al.* (2003) analisaram a composição proximal do biofilme formado no bagaço de cana e em bloco de palha no cultivo de carpa (*Labeo fimbriatus*) e encontraram valores próximos aos de Thompson *et al.* (2002). No bagaço de cana os valores encontrados foram 9 % proteína, 0,3 % lipídio, 22 % cinzas e 29 % fibra, e no bloco de palha 8 % proteína, 0,8 % lipídio, 17 % cinzas e 26 % fibra.

Considerando a comunidade que compõe o biofilme como um dos fatores que pode influenciar a composição bioquímica do mesmo, gerando assim uma grande variabilidade de resultados, os microorganismos que apresentaram uma alta correlação com a concentração de proteínas foram bactérias aderidas e diatomáceas cêntricas unicelulares. Estes resultados concordam com os trabalhos de Brown *et al.* (1997), Otoshi *et al.* (2001) e Martinez-Frenández *et al.* (2006), os quais, ao analisar a composição bioquímica de diatomáceas e bactérias, encontraram uma concentração elevada de proteína.

As maiores concentrações de porcentagem de proteínas ocorreram nas fases iniciais de formação do biofilme, diferentemente do valor absoluto de proteína, que aumentou ao final do experimento. Tal fato indica que o biofilme pode ter uma importância maior como fonte complementar de proteína especialmente nas primeiras fases de sua formação, quando dominam organismos autotróficos como diatomáceas e cianobactérias.

Martinez-Frenández *et al.* (2006), analisando a composição nutricional de sete microalgas, encontraram uma alta concentração de proteína (43 - 63 % peso seco) e lipídios (10 -30 % peso seco). Brown *et al.* (1997), em seus estudos com microalgas, encontraram valores menores para proteína (30 - 40%) e lipídio (10 - 20%). Otoshi *et al.* (2001) determinaram que é possível utilizar uma ração com menor nível protéico na fase de

berçário de *L. vannamei* quando utilizaram água proveniente de viveiros, rica em alimento natural, como bactérias e microalgas.

Ballester (2003) também observou um aumento significativo no número de diatomáceas penadas no tratamento em que havia camarões e biofilme nas gaiolas em relação ao tratamento no qual não havia camarões, mas apenas biofilme. O inverso aconteceu em relação às diatomáceas cêntricas, ou seja, no tratamento em que não havia camarões, foi observado um aumento significativo desse tipo de diatomáceas em relação às do tipo penadas. Da mesma forma (2003), Preto (2005) encontrou diferença significativa nas densidades de diatomáceas cêntricas, sendo que as maiores densidades destas foram encontradas nos tratamentos com menores densidades de camarões. Estes dois autores consideraram que existe uma preferência de diatomáceas grandes (cêntricas ou penadas) por *F. paulensis* ao consumir biofilme.

O conteúdo lipídico em nosso estudo variou de 8,26 a 105 mg.cm². Não foi possível converter estes valores em porcentagem em base seca, pois o peso de lipídio medido superou àquele de peso seco. Como citamos anteriormente, é possível que esta discrepância se dê devido à diferença dos métodos empregados para determinar estes dois fatores (gravimetria x colorimetria). Porém, neste caso, temos ainda que considerar a hipótese de que a matriz orgânica que compõe o biofilme pode adsorver compostos ricos em gordura circundantes no meio aumentando, assim, seu peso em comparação com o peso seco do biofilme. De acordo com Ballester (2003), é possível que a matriz orgânica do biofilme possa adsorver os nutrientes lixiviados da ração e, assim, mantê-los disponíveis para os organismos cultivados. O material adsorvido pode variar muito a composição bioquímica do biofilme, principalmente quando ele está inserido em um sistema aberto.

Apesar da impossibilidade de se estabelecer a relação porcentagem do lipídio para o biofilme (base seca), foi possível relacionar satisfatoriamente os resultados de concentração de lipídio com determinados grupos de microorganismos presentes no biofilme. Os microorganismos que apresentaram uma alta correlação com lipídios foram os nematódeos, outros microorganismos como: bactérias em divisão, bactérias livres cocóides, cianobactérias unicelulares, flagelados, diatomáceas cêntricas unicelulares e diatomáceas penadas maiores que 50 µm, apresentam uma correlação não tão alta com a concentração lipídios.

Como citado anteriormente, a presença de nematódeos gerou maiores taxas de crescimento dos camarões *F. paulensis* em cercados (Pissetti, 2005). Entretanto, não se obteve na literatura nenhum trabalho que apresente a composição lipídica de nematódeos. Tal fato demonstra a necessidade de maiores estudos sobre este organismo, especialmente porque existe a possibilidade de cultivá-los e oferecê-los como alimentos, como se faz hoje em dia com *Artemia*.

Com relação às diatomáceas, Shamsudin (1994) observou que o conteúdo lipídico destas microalgas é de 3 - 5 vezes maior que a concentração de clorofila a. Esse autor detectou ainda um aumento de ácidos graxos, C18 e C20, com o tempo de cultivo e a presença de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), necessários ao crescimento e sobrevivência às larvas de camarões. Shamsudin (1994) também analisou a quantidade de lipídios, clorofila, feopigmentos e cinzas em duas diatomáceas (*Chaetoceros calcitrans* e *Chaetoceros malaysia*) usadas no cultivo de camarões marinhos.

As cianobactérias e bactérias também são ricas em ácidos graxos poliinsaturados, além de carotenóides, substâncias importantes para o desenvolvimento dos crustáceos e que não podem ser sintetizadas por eles (Kumarly *et al.* 1989, Meyers e Latscha, 1997).

O método que é tradicionalmente utilizado para determinação de proteínas é o método de Kjeldahl (AOAC, 2000). Geralmente os lipídios são extraídos em éter, após hidrólise ácida (AOAC, 2000). Dentre os autores que trabalham com biofilme, alguns fizeram uso dessas metodologias em suas análises para determinar proteínas e extrair lipídios: Azim *et al.* (2001b, 2002 e 2003), Thompson *et al.* (2002), Santos (2003), Mridula *et al.* (2003). Entretanto, estes métodos necessitam uma quantidade significativa de material (no mínimo 1 g) para que se possa determinar com precisão estes parâmetros.

No presente estudo, as proteínas foram determinadas por meio do método de Bradford e os lipídios foram extraídos pelo método proposto por Folch *et al.* (1957) e determinados usando o método sulfofosfovanilina, descrito por Frings e Dunn (1970). Esses métodos foram escolhidos devido à pequena quantidade de amostra disponível, especialmente nos primeiros dias de formação do biofilme. Os mesmos apresentam uma alta sensibilidade que permite a determinação de pequenas quantidades de proteína e lipídio. Esses métodos de análise já foram utilizados por outros autores. Por exemplo, Gordon *et al.* (2006) e Martinez-Fernández *et al.* (2006) extraíram lipídios totais utilizando

o método de proposto por Folch *et al.* (1957). Já Wilson (2002) utilizou um *kit* de análise da SigmaTM (*micro BCA testing*) para a determinação de proteínas totais tanto do material particulado (< 125 µm), como de algas, usando como padrão albumina de soro bovino.

O maior problema na utilização dessas metodologias é a dificuldade de comparação de nossos resultados com outros encontrados na literatura, onde lipídios e proteínas foram determinados com os métodos tradicionais. Entretanto, o maior mérito do presente estudo é que se conseguiu determinar, desde os primeiros momentos da formação do biofilme, a contribuição dos microorganismos para a disponibilidade de proteínas e lipídios no mesmo, os quais podem ser consumidos pelos organismos cultivados.

6. CONCLUSÕES

Este estudo objetivou analisar a qualidade nutricional do biofilme durante diferentes fases de sua formação e em diferentes estratos da coluna da água. Para isso, determinaram-se os níveis de clorofila *a*, peso seco, proteína e lipídio do biofilme nas respectivas condições. Nenhum dos parâmetros estudados apresentou diferença significativa entre os estratos, possivelmente porque o local do estudo apresentava pouca profundidade, sendo encontrado transparência total da água em vários dias de coleta.

Concluiu-se que o parâmetro clorofila *a* não deve ser usado como único indicativo de formação e/ou maturidade do biofilme, sugerindo assim, a verificação paralela de clorofila *a* e peso seco, o que abrangeria todo espectro de microorganismos.

De acordo com estes resultados, o biofilme apresentou baixa variação nos níveis protéicos e lipídicos, tanto que não foram encontradas diferenças significativas entre as fases de formação do biofilme. Devido aos níveis de lipídios ultrapassarem o valor de peso seco do biofilme, duas hipóteses foram formuladas para tentar explicar este fato: 1) as metodologias utilizadas para medir o peso seco e a concentração de lipídio têm fundamentos diferentes (gravimetria x colorimetria), o que pode ter gerado as diferenças observadas, e 2) a matriz orgânica que compõe o biofilme pode estar adsorvendo compostos ricos em gordura livres no meio aumentando assim seu peso em relação ao peso seco do biofilme. De qualquer forma, os resultados permitem concluir que os nematódeos são os principais fornecedores de lipídio no biofilme, sendo que outros microorganismos como bactérias, cianobactérias e diatomáceas também podem ter uma grande importância como fontes de lipídio.

Com relação ao conteúdo de proteína, destaca-se o fato de que houve uma alta concentração de proteína, cerca de 26%, no começo da formação do biofilme, indicando que o biofilme pode ser usado como um complemento alimentar de alta concentração protéica, especialmente nas primeiras fases de sua formação. Os principais microorganismos que contribuíram com o aporte de proteína foram bactérias e, principalmente, diatomáceas cêntricas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o objetivo de colaborar com a elaboração de estudos posteriores com enfoque em biofilme, algumas questões são propostas:

- Adaptar o método de determinação de lipídio para amostras de biofilme;
- Identificar os micronutrientes, tais como vitaminas e minerais, presentes no biofilme;
- Testar a capacidade de o biofilme adsorver compostos orgânicos e inorgânicos;
- Verificar a capacidade de o biofilme neutralizar patógenos, presentes no meio;
- Realizar um estudo econômico da utilização do biofilme na aquicultura, quanto à redução de custos na produção final do cultivo, com vantagens do uso indireto do biofilme como alternativa para o aumento de sobrevivência, melhoria da sanidade dos animais e da qualidade da água, bem como a diminuição de custos com ração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABCC. Associação Brasileira de criadores de Camarão. 2004. Disponível em: <<http://www.abccam.br>> Acesso em: 13 outubro 2004. Alemanha
- ABREU, P.C., 1992. Phytoplankton production and microbial food web on the Patos Lagoon estuary, southern Brazil. Tese de Doutorado. Faculdade de Universität Bremen, Alemanha. 100 pp.
- ABREU, PC, THOMPSON, FL, WASIELESKY, W, CAVALLI, RO. 1998. New perspectives in the use of microorganisms in shrimp culture: food source, water quality and diseases control. *Anais do Aquacultura Brasil'98*. Recife, Pernambuco. Nov. 2-6, p. 703-709.
- ALLAN, GF, MORIARTY, DJW, MAGUIRE, GB. 1995. Effects of pond preparation and feeding rate on production of *Penaeus monodon* Fabricius, water quality, bacteria and benthos in model farming ponds. *Aquaculture*, 130: 329-349,
- ANDERSON, RK, PARKER, PL, LAWRENCE, A. 1987. A $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ tracer study of the utilization of presented feed by a commercially important shrimp *Penaeus vannamei* in a pond growout system. *Journal of the World Aquaculture Society*. 18:148 - 155.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 2000. Official Methods of Analysis of AOAC, 16 ed., Patricia Cunniff (editora), Washington, DC, 1141 pp.
- AYRES, M. AYRES, M.Jr., AYRES, D.L., SANTOS, A.S. 2005. Bio Estat 4.0: Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas. Belém, Pará.
- AVNIMELECH, Y. 2000. Protein utilization in aquaculture systems. International Conference of AQUACULTURE 2000, Nice, France, May 2 – 6, 2000. 41p.
- AZAM, F, FENCHEL, T, FIELD, JG, GRAY, JS, MEYER-REIL, LA, THINGSTANG, F. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology Progress Search*. 10: 257-263.
- AZIM, ME, WAHAD, MA, VAN DAN, AA, BEVERIDGE, MCM, VERDEGEM, MCJ. 2001a. The potential of periphyton-base culture of two Indian major carps, rohu *Labeo rohita* (Hamilton) and gonia *Labeo gonius* (Linnaeus). *Aquaculture Research*, 32: 209 – 216.

- AZIM, ME, WAHAD, MA, VAN DAN, AA, BEVERIDGE, MCM, MILSTEIN, A, VERDEGEM, MCJ. 2001b. Optimization of fertilization rate for maximizing periphyton production on artificial substrates and the implications for periphyton-base aquaculture. *Aquaculture Research*, 32: 749-760.
- AZIM, M.E., WAHAD, M.A., VERDEGEM, M.C.J., VAN DAN, A.A., VAN ROOIJ, J.M., BEVERIDGE, M.C.M. 2002. The effects of artificial substrates on freshwater pond productivity and water quality and the implications for periphyton-base aquaculture. *Aquatic Living Resour*, 15: 231 - 241.
- AZIM, M.E., VERDEGEM, M.C.J., MANTINGH, I., VAN DAN, A.A., BEVERIDGE, M.C.M. 2003 a. Ingestion and utilization of periphyton grow on artificial substrates by Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture Research*, 34: 85 - 92.
- AZIM, M.E., VERDEGEM, M.C.J., SINGH, M., VAN DAN, A.A, BEVERIDGE, M.C.M. 2003 b. The effects of periphyton substrate and fish stocking density on water quality, phytoplankton, periphyton and fish growth. *Aquaculture Research*, 34: 685 - 695.
- AZIM, M.E., WAHAB, M.A., BISWAS, P.K., ASAEDA, T., FUJINO, T., VERDEGEM, M.C.J. 2004. The effects of periphyton substrate density on production in freshwater polyculture ponds. *Aquaculture*, 232: 441 – 453.
- BALLESTER, E.L.C., 2003. Influência do biofilme na sobrevivência e no crescimento de juvenis do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* cultivados em sistema de berçário no estuário da Lagoa dos Patos. Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande. 90 pp.
- BALLESTER, E.L.C.; WASIELESKY, W.Jr.; CAVALLI, R.O.; SANTOS, M.H.; ABREU, P.C. 2003. Influência do biofilme no crescimento do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* em sistema de berçário. *Atlântica*, Rio Grande, 25 (2): 117 – 122, 2003.
- BARTLETT, P., HODGSON, A., BONILLA,P. 1993. Growth of *Penaeus vannamei* without feed in cages of plastic netting placed in ponds. Book of Abstracts of the World Aquaculture'93, May 26 – 28, 1993, Torremolinos, Espanha. European Aquaculture Society. Special publication, 19, pp. 111.
- BENDSCHNEIDER, K, ROBINSON, RJ. 1952. A new spectrophotometric method for determination of nitrite in sea water. *Journal Marine Research*, 11: 87-96.

- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- BRATVOLD, D., BROWDY, C.L., 2001. Effects of sand sediment and vertical surfaces (AquaMats™) on production, water quality and microbial ecology in an intensive *Litopenaeus vannamei* culture system. *Aquaculture* 195, 81 - 94.
- BROWN, M. R., JEFFREY, S. W., VOLKMAN, J. K. & DUNSTAN, G. A. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquac.*, 151: 315-331.
- DAVEY, M.E., O'TOOLE, G.A. 2000. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64: 847- 867.
- DE BEER, D., STOODLEY, P., ROE, F. LEWADOWSKI, Z. 1994. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotech Bioeng*, 43: 1131-1138.
- DOMINGOS J.A.S., 2003. Efeito do uso de diferentes quantidades de substratos artificiais na engorda do camarão marinho *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), em um sistema de cultivo semi-intensivo. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina. 37 pp.
- ELASRI, M. & MILLER, R.V. 1999. Study of the response of a biofilm bacterial community to UV radiation. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (5): 2025-2031.
- FOLCH, J., LEES, M., STANLEY, G.H.S. 1957. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226: 497-503.
- FRINGS, C.S., DUNN, R.T., 1970. A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfophospho-vanillin reaction. *Am. J. Clin. Path.* 53, 89–91.
- GORDON, N., NEORI, A., SHPIGEL, M., LEE, J., HARPAZ, S. 2006. Effect of diatom diets on growths and survival of abalone *Haliotis discos hannai* postlarvae. *Aquaculture*, 252: 225-233.
- GROSS, A., BOYD, C.E, WOOD, C.W. 2000. Nitrogen transformations and balance in channel catfish ponds. *Aquacultural Engineering*. 24: 1 – 14.
- HOBBIE, J.E. DALEY, R.J. JASPER, S. 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *App. And Environ. Microb.*, 3: 1225-1228.

- HUCHETTE, S.M.H., BEVERIDGE, M.C.M., BAIRD, D.J., IRELAND, M. 2000. The impacts of grazing by tilapias (*Oreochromis niloticus* L.) on periphyton communities growing on artificial substrate in cages. *Aquaculture*, 186: 45-60.
- JEFFREY, S.W., HUMPHREY, G.F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemical Physiology Pflanzen*, 167: 191-194.
- KESHAVANATH, P., GANGADHAR, B., RAMESH, T.J., VAN DAM, A.A., BEVERIDGE, M.C.M., VERDEGEM, M.C.J. 2002. The effect of periphyton and supplemental feeding on the production of indigenous carps *Tor khedee* and *Labeo fimbriatus*. *Aquaculture*, 213: 207-218.
- KESHAVANATH, P., GANGADHAR, B., RAMESH, T.J., VAN DAM, A.A., BEVERIDGE, M.C.M., VERDEGEM, M.C.J. 2004. Effects of bamboo substrate and supplemental feeding on growth and production of hybrid red tilapia fingerlings. *Aquaculture*, 235: 303-314.
- KUMARLY, K., DA JONES, A.B., EAST, J. 1989. Comparative analysis of the growth and survival of *Penaeus monodon* (Fabricius) larvae, from protozoa I to postlarvae I, on live feeds, artificial diets and combinations of both. *Aquaculture*, 81: 27-45.
- KUMLU, M., EROLDGAN, O.T., SAGLAMTIMUR, B., 2001. The effects of salinity and added substrates on growth and survival of *Metapenaeus monoceros* (Decapoda: Penaeidae) post-larvae. *Aquaculture* 196, 177 - 188.
- LANGIS, R., PROULX, D., NOÛE, J., COUTURE, P., 1988. Effects of a bacterial biofilm on intensive *Daphnia* culture. *Aquacultural Engineering* 7, 21 - 38.
- MARCHIORI, M.A., DOLCI, D.B., ALVES, T. 1982. Observations of some ecological parameters to assess the suitability to aquaculture of an estuarine inlet in the Patos Lagoon, Rio Grande, Brazil. *Simpósio Internacional sobre utilização de ecossistemas costeiros: planejamento, poluição e produtividade*, Rio Grande, RS. pp 70.
- MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, E., ACOSTA-SALMÓN, H., SOUTHGATE, P.C. 2006. The nutritional value of seven species of tropical microalgae for black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera*, L.) larvae. *Aquaculture*, in press.

- MEYERS, S. P. & LATSCHA, T. 1997. Carotenoids. In: D'Abramo, L.R., Conklin, D. E., Akiyama, D. M. Crustacean Nutrition - Advances in World Aquaculture, vol. 6. The World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana, 164-193 pp.
- MRIDULA, R.M., MANISSERY, J.K., KESHAVANATH, P., SHANKAR, K.M., NANDEESHA, M.C., RAJESH, K.M. 2003. Water quality, biofilm production and growth of fringe-lipped carp (*Labeo fimbriatus*) in tanks provided with two solid substrates. *Bioresource Technology*, 87: 263-267.
- O'BRIEN, C. J. 1994. Ontogenetic changes in the diet of juvenile brown tiger prawns *Penaeus esculentus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 112: 195-200.
- OLIVEIRA, S. S. 2004. Caracterização do consórcio de bactérias nitrificantes pelo método fish (fluorescent *in situ* hybridization) no biofilme e água de sistemas de cultivo do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*. Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande. 60 pp.
- OTOSHI, C.A., MONTGOMERY, A.D., LOOK, A.M., MOSS, S.M. 2001. Effects of diet and water source on nursery production of pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *J. World. Aquac. Soc.*, 32 (2): 243 – 249.
- PISSETTI, T.L. 2005. Efeito da densidade de estocagem e do substrato artificial no cultivo do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez – Farfante, 1967) em cercados. Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande. 57 pp.
- POMEROY, LR. 1974. The Ocean's food web, a changing paradigm. *BioScience*, 24: 499 - 504.
- PRETO, A.L., PISSETTI, T.L., CAVALCANTI, A.M., CAVALLI, R.O., WASIELESKY, W., POERSCH, L.H., 2004. Uso de telas de polietileno para fixação de biofilme no cultivo do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* em berçário conduzido em gaiolas. Livro de Resumos do Aquaciência 2004, 24 – 28 de maio de 2004. Vitória, Espírito Santo. pp. 398.
- PRETO, A.L. 2005. Efeito da densidade de estocagem e do biofilme sobre o desempenho do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* cultivado em gaiolas nas fases de berçário e de produção de iscas vivas. Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande. 53 pp.

- ROCHA, I.P., MAIA, E.P. 1998. Desenvolvimento tecnológico e perspectivas de crescimento da carcinicultura marinha brasileira. *Anais do Aquacultura Brasil'98*. Recife – PE, 1: 213-235.
- SANTOS, M. H. S. 2003. Alimentação do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Pérez Farfante, 1967) (Decapoda-Penaeidae) Cultivado. Tese de Doutorado em Oceanografia Biológica, FURG, Rio Grande, RS, 229p.
- SHAMSUDIN, L. 1994. Lipid fatty acid composition of selected diatom species used in Malaysia aquaculture as live food for penaeid larvae. 13th International Diatom Symposium, 63-69.
- STOECKER, D.K., CAPUZZO, J.M. 1990. Predation on protozoa: its importance to zooplankton. *J. Plankton Research*, 12: 891-908.
- STONER, A.W. & R. J. ZIMMERMAN. 1988. Food pathways associated with penaeidae shrimps in a mangrove-fringed estuary. *Fish. Bull.* 86(3):543-551.
- THOMPSON, F.L., ABREU, P.C., CAVALLI, R.O. 1999. The use of microorganisms as food source for *Penaeus paulensis* larvae. *Aquaculture*, 174: 139-153.
- THOMPSON, F.L., ABREU, P.C., WASIELESKY, W. 2002. Importance of biofilm for water quality and nourishment in intensive shrimp culture. *Aquaculture*, 203: 263-278.
- UMESH, N.R., SHANKAR, K.M., MOHAN, C.V. 1999. Enhancing growth of common carp, rohu and Mozambique tilapia through plant substrate: the role of bacterial biofilm. *Aquaculture International*, 7: 251 – 260.
- UNESCO. 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Intergovernmental Oceanographic Commission. Manual and Guides, 12.
- UTERMÖHL, H. 1958. Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton Methodik. *Int. Ver. Theor. Angew. Limnologie*, 9: 1-38.
- WHAL, M. 1989. Marine epibiosis I. Fouling and antifouling: some basic aspects. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 58: 175 – 189.
- WILSON, S. 2002. Nutritional value of detritus and algae in blenny territories on the Great Barrier Reef. *J. of Experimental Marine Biology and Ecology*, 271: 155-169.

APÊNDICE I

Densidade dos Microorganismos

Densidade de diatomáceas cêntricas unicelulares e filamentosas no estrato da superfície, durante o período experimental.

Superfície	Diatomáceas Cêntrica Unicelular			Diatomáceas Cêntrica Filamentosa			
	Tempo	cel/cm ²	Média	DP	cel/cm ²	Média	DP
	5	271014	245857	132169	548890	479135	206300
	5	363639			641515		
	5	102917			247000		
	10	236872	227702	20276	561958	532793	56270
	10	241773			568493		
	10	204461			467928		
	15	85764	75472	9076	617501	531737	122783
	15	72042			586626		
	15	68611			391084		
	20	289539	284050	25153	495373	479364	25389
	20	306006			492628		
	20	256606			450089		
	25	109778	109778	10292	257292	265297	8633
	25	99486			274445		
	25	120070			264153		
	30	131734	127617	4948	209950	207206	2744
	30	122128			204461		
	30	128989			207206		

Densidade de diatomáceas cêntricas unicelulares e filamentosas no estrato do meio e do fundo, durante o período experimental.

Meio	Diatomáceas Cêntrica Unicelular			Diatomáceas Cêntrica Filamentosa		
	Tempo	cel/cm ²	Média	DP	cel/cm ²	Média
5	60035	58320	18072	54889	119498	64325
	75472			183535		
	39451			120070		
10	308750	280162	29177	212695	157806	54889
	250431			102917		
	281306			157806		
15	68611	68611	10292	391084	357922	28770
	58320			343056		
	78903			339625		
20	96056	73185	20961	411667	411667	0
	68611			411667		
	54889			411667		
25	41167	43454	7141	82333	85764	15721
	51458			72042		
	37736			102917		
30	102917	87822	33528	139967	142711	8570
	49400			152317		
	111150			135850		

Fundo	Diatomácea Cêntrica Unicelular			Diatomácea Cêntrica Filamentosa		
	Tempo	cel/cm ²	Média	DP	cel/cm ²	Média
5	32590	23671	9476	51458	36821	12695
	13722			28817		
	24700			30189		
10	30189	31561	2377	27444	17382	8822
	30189			10978		
	34306			13722		
15	10635	12236	1547	33619	33505	863
	12350			34306		
	13722			32590		
20	74100	94226	18273	247000	259350	10717
	98800			266211		
	109778			264839		
25	113208	118926	12988	253861	263010	12988
	109778			277875		
	133792			257292		
30	31561	30646	2857	16467	19669	6769
	27444			15094		
	32933			27444		

Dados de diatomáceas penadas maior e menor que 50 µm no estrato da superfície, do meio e do fundo, durante o período experimental.

Superfície	Diatomácea Penada menor 50 µm			Diatomácea Penada maior 50 µm		
Tempo	org/cm ²	Média	DP	org/cm ²	Média	DP
5	137222	149801	40928	181820	116639	56474
5	195542			85764		
5	116639			82333		
10	132322	154691	59658	86581	67435	27696
10	109451			80046		
10	222300			35678		
15	116639	102917	13722	96056	91482	20961
15	102917			68611		
15	89195			109778		
20	144084	132648	11671	69983	67696	2096
20	120756			65867		
20	133106			67239		
25	48028	41167	6861	54889	70898	15469
25	34306			72042		
25	41167			85764		
30	80961	69526	11671	118011	105661	26288
30	57633			75472		
30	69983			123500		

Meio	Diatomácea Penada menor 50 µm			Diatomácea Penada maior 50 µm		
Tempo	org/cm ²	Média	DP	org/cm ²	Média	DP
5	75472	86336	13323	42882	42310	4317
5	101202			46313		
5	82333			37736		
10	161236	171528	12369	58320	58320	10292
10	168097			48028		
10	185250			68611		
15	3431	6861	3431	185250	141796	61015
15	6861			168097		
15	10292			72042		
20	1372	2744	1372	226417	193941	48171
20	2744			216811		
20	4117			138595		
25	3431	6861	3431	123500	104060	17604
25	6861			99486		
25	10292			89195		
30	1372	2744	1372	31561	53517	22673
30	2744			52145		
30	4117			76845		

Fundo	Diatomácea Penada menor 50 um			Diatomácea Penada maior 50 um			
	Tempo	org/cm ²	Média	DP	org/cm ²	Média	DP
	5	34306	29160	5146	15438	13150	1981
	5	24014			12007		
	5	29160			12007		
	10	13722	24700	10360	10978	16467	4948
	10	34306			20583		
	10	26072			17839		
	15	343	686	343	18182	18411	2068
	15	686			20583		
	15	1029			16467		
	20	1372	2744	1372	190739	212237	81070
	20	2744			144084		
	20	4117			301889		
	25	3431	6861	3431	82333	73185	8633
	25	6861			72042		
	25	10292			65181		
	30	1372	2744	1372	161922	113895	65105
	30	2744			139967		
	30	4117			39794		

Densidades de nematódeos maior e menor que 200 µm no estrato da superfície, do meio e do fundo, durante o período experimental.

Tempo	Superfície Nematódeo maior 200 um			Nematódeo menor 200 um		
	cel/cm ²	Média	DP	cel/cm ²	Média	DP
5	24	24	3	16	25	8
5	26			29		
5	21			32		
10	84	74	28	126	105	21
10	95			84		
10	42			105		
15	242	207	44	242	242	21
15	221			263		
15	158			221		
20	1113	1183	80	945	994	123
20	1271			1134		
20	1166			903		
25	1496	1365	114	1339	1103	205
25	1313			971		
25	1286			998		
30	840	970	118	767	739	180
30	1071			903		
30	998			546		

Meio	Nematódeo Maior 200 um			Nematódeo menor 200 um		
Tempo	cel/cm ²	Média	DP	cel/cm ²	Média	DP
5	3	7	4	8	6	2
5	11			5		
5	8			5		
10	32	42	11	32	60	32
10	42			53		
10	53			95		
15	389	385	58	588	543	40
15	441			525		
15	326			515		
20	546	599	46	798	581	245
20	630			315		
20	620			630		
25	263	280	55	368	455	80
25	236			473		
25	341			525		
30	599	476	106	567	350	210
30	420			336		
30	410			147		

Fundo	Nematódeo maior 200 um			Nematódeo menor 200 um		
Tempo	cel/cm ²	Média	DP	cel/cm ²	Média	DP
5	11	11	3	5	6	2
5	13			5		
5	8			8		
10	32	32	21	11	25	16
10	53			21		
10	11			42		
15	95	123	32	221	210	11
15	116			200		
15	158			210		
20	158	179	21	315	315	21
20	200			336		
20	179			294		
25	341	289	53	420	376	55
25	289			394		
25	236			315		
30	221	189	64	189	322	119
30	116			357		
30	231			420		

Densidade de Bactéria, Cianobactéria e Flagelados no estrato da superfície, do meio e do fundo, durante o período experimental.

Superfície

Tempo (dias)	Bactéria Divisão	Bactéria Livre	Bactéria Livre Filamentosa	Bactéria Aderida	Cianobactéria Unicelular	Cianobactéria Filamentosa	Flagelado
5	46757250	25976250	6927000	396	41562000	12122250	10390500
5	58879500	22512750	10390500	403	38098500	17317500	6927000
5	46757250	34635000	20781000	398	48489000	10390500	13854000
10	95246250	51952500	8658750	524	38098500	13854000	17317500
10	81392250	24244500	10390500	565	50220750	1731750	15585750
10	48489000	53684250	13854000	602	29439750	5195250	13854000
15	169711500	46757250	20781000	585	55416000	17317500	10390500
15	147198750	24244500	10390500	597	57147750	3463500	19049250
15	161052750	53684250	13854000	602	43293750	5195250	12122250
20	244176750	1731750	0	495	31171500	0	12122250
20	181833750	3463500	3463500	487	34635000	1731750	8658750
20	244176750	1731750	1731750	488	36366750	3463500	10390500
25	84855750	53684250	19049250	552	55416000	27708000	10390500
25	83124000	38098500	15585750	522	50220750	20781000	13854000
25	95246250	55416000	24244500	507	65806500	17317500	8658750
30	95246250	51952500	8658750	524	38098500	60611250	17317500
30	81392250	24244500	10390500	565	50220750	1731750	15585750
30	48489000	53684250	13854000	602	29439750	5195250	13854000

Meio

Tempo (dias)	Bactéria Divisão	Bactéria Livre	Bactéria Livre Filamentosa	Bactéria Aderida	Cianobactéria Unicelular	Cianobactéria Filamentosa	Flagelado
5	51952500	34635000	10390500	402	45025500	31171500	8658750
5	46757250	62343000	22512750	409	62343000	12122250	5195250
5	46757250	10390500	3463500	441	62343000	12122250	10390500
10	247640250	24244500	1731750	523	39830250	3463500	1731750
10	226859250	27708000	5195250	525	38098500	1731750	10390500
10	150662250	22512750	5195250	429	74465250	12122250	6927000
15	230322750	29439750	6927000	515	84855750	10390500	3463500
15	252835500	34635000	8658750	525	55416000	8658750	5195250
15	181833750	22512750	6927000	452	64074750	6927000	1731750
20	244176750	3463500	1731750	498	96978000	13854000	5195250
20	263226000	29439750	10390500	480	51952500	6927000	3463500
20	197419500	3463500	1731750	506	88319250	10390500	5195250
25	277080000	36366750	10390500	709	41562000	1731750	6927000
25	263226000	41562000	20781000	642	38098500	1731750	5195250
25	199151250	36366750	22512750	577	57147750	3463500	10390500
30	247640250	24244500	1731750	523	38098500	1731750	13854000
30	226859250	27708000	5195250	525	38098500	5195250	12122250
30	150662250	22512750	6927000	429	74465250	12122250	10390500

Fundo

Tempo (dias)	Bactéria Divisão	Bactéria Livre	Bactéria Livre Filamentosa	Bactéria Aderida	Cianobactéria Unicelular	Cianobactéria Filamentosa	Flagelado
5	46757250	41562000	25976250	423	29439750	13854000	5195250
5	31171500	34635000	22512750	338	20781000	12122250	3463500
5	39830250	25976250	20781000	394	20781000	6927000	3463500
10	46757250	45025500	17317500	533	29439750	13854000	5195250
10	34635000	12122250	12122250	466	24244500	10390500	1731750
10	39830250	25976250	15585750	510	13854000	5195250	3463500
15	98709750	39830250	19049250	398	29439750	13854000	3463500
15	84855750	39830250	24244500	417	20781000	22512750	5195250
15	90051000	48489000	22512750	443	22512750	8658750	1731750
20	116027250	45025500	20781000	451	50220750	25976250	10390500
20	110832000	51952500	19049250	448	43293750	17317500	8658750
20	95246250	48489000	17317500	515	60611250	31171500	13854000
25	88319250	17317500	13854000	517	29439750	3463500	6927000
25	84855750	24244500	22512750	505	38098500	5195250	5195250
25	74465250	27708000	15585750	533	34635000	6927000	5195250
30	91782750	17317500	12122250	498	25976250	15585750	8658750
30	69270000	25976250	10390500	475	36366750	20781000	12122250
30	64074750	24244500	15585750	480	36366750	20781000	12122250

APÊNDICE II

Concentração de Lipídio e Proteína

Concentração de lipídio no estrato da superfície, do meio e do fundo, durante o período experimental.

Tempo	Superfície	MD	DP	Meio	MD	DP	Fundo	MD	DP
5	38,7	57,8	19,3	38,5	30,5	7,2	14,2	8,3	5,2
5	57,5			24,5			4,6		
5	77,3			28,5			6,0		
10	35,3	40,4	4,6	20,3	22,7	3,6	7,7	9,6	1,9
10	41,8			26,8			11,5		
10	44,1			21,1			9,6		
15	87,3	55,0	28,0	55,0	37,0	15,6	33,2	23,6	8,6
15	39,7			29,0			16,8		
15	38,1			27,0			20,7		
20	62,1	75,1	13,3	52,2	74,7	20,8	41,4	42,1	1,9
20	74,7			93,3			40,7		
20	88,7			78,5			44,3		
25	67,2	72,7	6,3	51,0	53,7	18,6	57,0	54,2	5,8
25	71,4			36,5			47,5		
25	79,5			73,5			58,0		
30	105,0	105,0	3,0	101,3	97,0	3,7	75,8	52,1	24,7
30	102,0			94,5			26,5		
30	108,0			95,3			54,0		

Concentração de proteína no estrato da superfície, do meio e do fundo, durante o período experimental.

Tempo	Superfície	MD	DP	Meio	MD	DP	Fundo	MD	DP
5	1,12	0,60	0,46	1,14	0,79	0,36	0,58	0,36	0,20
5	0,27			0,80			0,34		
5	0,40			0,42			0,17		
10	1,11	1,23	0,15	1,25	1,21	0,31	1,26	1,32	0,06
10	1,18			0,87			1,31		
10	1,39			1,49			1,38		
15	0,93	0,47	0,45	0,04	0,30	0,29	1,10	0,53	0,49
15	0,47			0,22			0,26		
15	0,02			0,62			0,24		
20	0,91	1,65	0,84	0,70	1,05	0,42	1,23	1,11	0,12
20	1,46			1,52			0,98		
20	2,57			0,92			1,11		
25	0,59	0,76	0,35	2,79	2,72	1,11	2,69	1,81	0,86
25	0,53			1,57			1,76		
25	1,16			3,80			0,98		
30	0,63	0,83	0,53	1,32	0,87	0,40	1,67	0,73	0,83
30	0,42			0,76			0,13		
30	1,42			0,55			0,40		

APÊNDICE III

Protocolo para Dosagem de Lipídios em Biofilme

Método Sulfofosfovanilina

Os lipídios totais foram extraídos através do método de Folch *et al* (1957), sendo homogeneizado em solução de clorofórmio–metanol (3:1) e determinados por uso do método sulfofosfovanilina, com os resultados expressos em mg/dl de peso úmido. O método sulfofosfovanilina, descrito por Frings e Dunn (1970), consiste na hidrólise ácida da amostra seguida de uma reação com vanilina. A solução na presença de lipídio resulta em cor rosa, quantificada por espectrofotometria (espectrofotômetro digital B 342 II Micronal) a 540nm.

Preparo das Amostras

O material ‘fresco’, i.e. sem ser congelado, deve ser *sonificado* (ultra-som) em água destilada na mesma salinidade do ambiente. Esta solução deve ser separada em pequenas alíquotas de 2 – 4ml e congeladas a aproximadamente -20°C.

Análise

Uma alíquota deve ser descongelada e homogeneizada (vortex).

Faça uma solução de 3 amostra:1 solução extração. A solução de extração é composta por, 2 cloroformio:1 etanol.

Homogeneíze a solução e a centrifugue por 5 minutos a 1000 giros e retire 20µl da fase do meio, amostra.

	Ácido Sulfurico	Padrão	Amostra
Branco (B)	2020	-	-
Padrão (P)	2000	20	-
Amostra (A)	2000	-	20

Homogeneizar novamente e deixar em Banho-Maria a 100°C por 10 minutos. Esfriar em água corrente. Acrescentar 5ml de reagente de cor. Homogeneizar e ler as absorbâncias das amostras em espectrofotometro a 540nm.

Resultado

Proteína (mg/dl) = (amostra/ padrão)* 1000

Protocolo para Dosagem de Proteína em Biofilme

Método Bradford

Preparo das Amostras

O material 'fresco', i.e. sem ser congelado, deve ser *sonificado* (ultra-som) em água destilada na mesma salinidade do ambiente. Esta solução deve ser separada em pequenas alíquotas de 2 – 4 ml e congeladas a aproximadamente -20 °C.

Análise

Uma alíquota deve ser descongelada e homogeneizada (vortex).

Em seguida retire uma alíquota de 1400 µl e centrifugue o material por 5 minutos a 5000 giros a -7 °C, este procedimento é feito para separar a solução em 2 fases. Ressalta-se que serão trabalhados as duas fases, o sobrenadante e o pellet, o valor dos dois vai ser somado no final. Adota-se esse procedimento para tentar diminuir a influência da turbidez da amostra.

O sobrenadante é retirado e condicionado em um *ependorf*. O pellet é ressuspendido em tampão fosfato (800 µl) e homogeneizado (vortex).

Foi utilizado mais de um controle:

Para observar se há interferência da turbidez da amostra, foi utilizado um branco da amostra. Este valor era posteriormente descontado do valor da amostra.

E o segundo controle é a utilização do padrão junto com a amostra e o reagente, assim este valor tem que ser o aproximado à soma do valor do padrão e do valor da amostra.

	Reagente	Água	Padrão	Amostra
Branco (B)	800	100	-	-
Padrão (P)	800	50	50	-
Amostra (A)	800	50	-	50
Branco da Amostra (BA)	-	850	-	50
Amostra + Padrão (RAP)	800	-	50	50

Por fim as absorbâncias das soluções são lidas em espectrofotômetro a 540 nm .

Resultado

Amostra = RA – BA (valor da absorbância)

Proteína (mg/dl) = (amostra – branco) * fator

Fator = 10/ (padrão – branco)