

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**DESEMPENHO DE *Ankistrodesmus gracilis*  
(REISCH) KORSIKOV (CHLOROPHYTA)  
CULTIVADA EM TRÊS MEIOS DE CULTURA EM  
LABORATÓRIO**

**Alexandra M. Donadon Lusser Segali**

Jaboticabal, São Paulo  
2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**DESEMPENHO DE *Ankistrodesmus gracilis*  
(REISCH) KORSIKOV (CHLOROPHYTA)  
CULTIVADA EM TRÊS MEIOS DE CULTURA EM  
LABORATÓRIO**

**Mestranda: Alexandra M. Donadon Lusser Segali**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Lúcia Helena Sipaúba Tavares**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, São Paulo  
2014

S454d Segali, Alexandra Maria Donadon Lusser  
Desempenho de *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov  
(Chlorophyta) cultivada em três meios de cultura em laboratório /  
Alexandra Maria Donadon Lusser Segali. -- Jaboticabal, 2014  
ix, 48 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de  
Aquicultura, 2014  
Orientadora: Lucia Helena Sipaúba Tavares  
Banca examinadora: Claudinei da Cruz; Maria Stela Maioli Castilho

Nol  
Bibliografia

1. *Ankistrodesmus gracilis*. 2. Microalga-crescimento. 3. Meios  
alternativos. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura

CDU 582.263.1

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

**DEDICO**

A minha amada mãe que sempre soube me compreender e dar alento nos momentos de aflição. Que bom mãe poder ter contado com você em todos os momentos, te amo.

Ao meu marido David pela sua grande paciência e por estar sempre ao meu lado me dando incentivo na caminhada.

As minhas filhas Laís e Nicole que souberam compreender muito bem os momentos em que às vezes tive que me ausentar do papel de Mãe.

E a Deus por estar sempre ao meu lado em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

A minha orientadora Profa. Dra. Lúcia Helena Sipaúba Tavares, pela amizade, confiança, paciência e principalmente incentivo.

Aos amigos Flávia Almeida Berchielli Moraes e Bruno Scardoeli Truzzi pela ajuda nas análises de laboratório do cultivo de algas sem a qual seria impossível a realização deste trabalho.

A minha Diretora Isabel de Fátima Donadon Ziviani e a minha Supervisora de Seção Renata Poli Verardino Capalbo pelo apoio e amizade que ajudaram na finalização deste mestrado.

Ao CAUNESP por disponibilizar suas instalações para que fosse possível a realização do experimento.

Aos amigos que conquistei ao longo deste período, e aos que me ajudaram neste experimento: Bruno, Ciça, Érica, Fernanda B., Fernanda L., Flávia, Iara, Rodrigo e Samuel.

Ao amigo Rodrigo Ney Millan por toda a sua ajuda durante a realização das análises estatísticas.

A minha mãe Aparecida, meu marido David e as minhas filhas Laís e Nicole pela paciência que tiveram estes anos de estudo.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram neste trabalho.

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
RESUMIO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1 – INTRODUÇÃO.....	1
2 – REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 – Importância da microalga na Aquicultura .....	4
2.2 - O uso de microalgas como fonte energética.....	7
2.3 – Descrição da espécie <i>Ankistrodesmus gracilis</i> .....	8
2.4 – Fatores que influenciam no crescimento e desenvolvimento algal.....	10
3 – MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 – Descrição do local de estudo.....	15
3.2 – Cultura algal.....	16
3.3 – Meios de cultura.....	17
3.4 – Delineamento experimental.....	19
3.5 – Variáveis do meio.....	21
3.6 – Determinação do crescimento.....	21
3.7 – Características algais.....	22
3.8 – Composição bioquímica.....	23
3.9 – Pigmentos.....	23
3.10 - Análise estatística.....	24
4 – RESULTADO E DISCUÇÃO.....	25
4.1 – Variáveis do meio.....	25
4.2. Variáveis Biológicas e Bioquímicas.....	32
5 – CONCLUSÃO.....	38
6 – REFERÊNCIAS.....	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – Microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i> : em colônia (A) e isolada (B).....	9
<b>FIGURA 2</b> - (A) Vista externa do Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton, (B) sala de cultivo em larga escala e (C) cepário onde são estocadas as algas.....	15
<b>FIGURA 3</b> - Sistema de iluminação artificial composto por lâmpadas fluorescentes e prateleiras de estrutura vazada (A) e filtros interno de ar (B).....	16
<b>FIGURA 4</b> – Meios de cultura utilizados no experimento, onde (A) meio CHU <sub>12</sub> , (B) meio NPK e (C) meio de Macrófita associado ao NPK.....	17
<b>FIGURA 5</b> - <i>Eichhornia crassipes</i> (aguapé) em processo de secagem (A), obtenção do pó de macrófita já moído e triturado (B), macrófita sendo fervida (C) e filtrada (D).....	19
<b>FIGURA 6</b> – Montagem do experimento: adição de vitamina do complexo B (A), adição do meio de cultura (B), adição da alga (C), experimento montado (D).....	20
<b>FIGURA 7</b> - Diagrama esquemático do cultivo em “Batch” da microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i> nos volumes de 2-L e 13-L, em que: (A) frascos, (B) galões.....	21
<b>FIGURA 8</b> - Biomassa algal após a centrifugação (A) e biomassa liofilizada para posterior análise bioquímica (B).....	23
<b>FIGURA 9</b> - Variação da temperatura e pH em relação aos meios de cultura CHU <sub>12</sub> , NPK e macrófita com NPK (M + NPK).....	26
<b>FIGURA 10</b> - Variação da concentração de oxigênio dissolvido e condutividade elétrica em relação aos meios de cultura CHU <sub>12</sub> , NPK e M + NPK.....	27
<b>FIGURA 11</b> - Variação da concentração de compostos nitrogenados (amônia, nitrato e nitrito) em relação aos meios de cultura CHU <sub>12</sub> , NPK e M+ NPK.....	29
<b>FIGURA 12</b> - Variação das concentrações de fósforo e ortofosfato em relação aos meios de cultura CHU <sub>12</sub> , NPK e M+ NPK.....	31
<b>FIGURA 13</b> - Variação da clorofila-a em relação aos meios de cultura CHU <sub>12</sub> , NPK e M+ NPK.....	31

<b>FIGURA 14</b> – Curva de crescimento da microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i> durante o período experimental em relação aos meios de cultura CHU <sub>12</sub> , NPK e M+ NPK.....	33
<b>FIGURA 15</b> – Variação da proteína e lipídio em relação aos meios de cultura CHU <sub>12</sub> , NPK e M+ NPK.....	37



## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 – Composição dos nutrientes nos diferentes meios de cultura NPK, CHU <sub>12</sub> , e Macrófita + NPK.....	18
TABELA 2 – Taxa de crescimento e tempo de duplicação da microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i> durante o período experimental em relação aos meios de cultura CHU <sub>12</sub> , NPK e M+ NPK.....	33
TABELA 3 – Valores médios das variáveis bioquímicas e biológicas da microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i> em relação aos meios de cultura CHU <sub>12</sub> , NPK e M + NPK.....	35

## RESUMO

A microalga *A. gracilis* é conhecida pela sua capacidade de ser usada em nutrição de organismos aquáticos. Alguns estudos relatam que a adição de vitamina junto ao meio de cultura promove uma melhora nas condições do cultivo. O objetivo deste estudo foi avaliar o desempenho da microalga Chlorophyceae, *Ankistrodesmus gracilis*, em condições controladas em três diferentes meios de cultura, sendo um comercial (CHU<sub>12</sub>) e dois alternativos (NPK (20:5:20) e Macrófita + NPK) durante o período de 28 dias de cultivo para cada meio. O experimento foi realizado em recipientes de 13L durante 28 dias, com luminosidade constante de 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e para cada recipiente foram adicionados 20 mg de vitamina do complexo B. No meio CHU<sub>12</sub> apresentou densidade celular máxima de  $25,6 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$  e nos meios NPK e M+NPK foi de  $25,5$  e  $24,2 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$ , respectivamente. As quantidades de lipídios obtidas no presente estudo foram, para o meio NPK o valor médio foi de 12,68% do peso seco e para os meios M + NPK e CHU<sub>12</sub> os valores obtidos foram 9,85 e 2,82% do peso seco respectivamente. Em relação às proteínas a microalga *A. gracilis* apresentou valores significativos comprovando assim o seu grande potencial como nutriente na alimentação de organismos aquáticos, foram obtidos para o meio NPK valores de 41,26% do peso seco, e para os meios M + NPK e CHU<sub>12</sub> valores de 37,71 e 31,76% do peso seco respectivamente. Através dos dados obtidos neste estudo, pode-se concluir que a utilização dos meios de cultura alternativos NPK (20:5:20) e macrófita + NPK apresentaram resultados satisfatórios no crescimento e desenvolvimento da microalga *A. gracilis*. Em relação à nutrição de organismos aquáticos pode ser uma grande ferramenta como alimento natural.

**Palavras-chave:** microalgas, crescimento, lipídio, meios alternativos

## ABSTRACT

The microalgae *A. gracilis* is known for its ability to be used in nutrition of aquatic organisms. Some studies report that the addition of vitamin on the culture medium promotes an improvement in the conditions of cultivation. The objective of this study was to evaluate the performance of microalgae Chlorophyceae, *Ankistrodesmus gracilis*, under controlled conditions in three different culture media, being a commercial (CHU<sub>12</sub>) and two alternatives (NPK (20:5:20) and Macrophyte+NPK) during the period of 28 days of cultivation for each half. The experiment was accomplished in 13L containers during 28 days, with constant brightness of 60  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  and for each container were added 20 mg of vitamin B complex. In the middle CHU<sub>12</sub> has maximum cell density 25,6 x 10<sup>5</sup> cel mL<sup>-1</sup> and NPK and M+NPK media was 25,5 and 24,2 x 10<sup>5</sup> cel mL<sup>-1</sup>, respectively. The quantities of lipid obtained in this study were, in the middle the average value was NPK 12,68% of the dry weight and the means M + NPK and the values obtained CHU<sub>12</sub> were 9,85 and 2,82% of the dry weight respectively. In relation to protein microalgae *A. gracilis* presented significant values proving so its great potential as a nutrient in the feeding of aquatic organisms, were obtained for the NPK values of 41,26% of dry weight, and for the means CHU<sub>12</sub> 37,71 values and M+NPK and 31,76% of the dry weight respectively. Through the data obtained in this study, it can be concluded that the use of alternative culture media NPK (20:5:20) and macrophyte + NPK presented satisfactory results in the growth and development of microalgae *A. gracilis*. In relation to the nutrition of aquatic organisms can be a great tool as health food.

**Key words:** microalgae, growth, lipid, alternative medium

## 1 – INTRODUÇÃO

O estudo do cultivo de microalgas é importante para incrementar o conhecimento da biologia das espécies, favorecendo posterior produção em ambientes controlados. As espécies de microalgas são produzidas atualmente em escala comercial, resultando numa atividade de grande interesse favorecendo o desenvolvimento de diferentes campos da aquicultura. As microalgas podem ser utilizadas como fonte alimentar para larva de peixes, zooplâncton, camarões, rãs, moluscos cultivados em laboratório, outros invertebrados ou no tratamento de esgoto, produção química comercial e bioconservação de energia solar (KNUCKEY et al., 2006).

As microalgas são indicadas para uso como alimento, pois reúnem qualidades ideais de nutrição e digestibilidade, apresentando tamanho celular adequado, resistência as adversidades ambientais e às condições de cultivo (SILVA et al., 2004). Dentre elas, estão as que pertencem à classe Chlorophyceae, como *Ankistrodesmus gracilis*, que tem mostrado excelente resultado em cultivos realizados em laboratório (SIPAÚBA-TAVARES & PEREIRA, 2008).

O cultivo de microalgas em laboratório tem crescido principalmente quanto ao uso na nutrição de organismos aquáticos, mas ainda há resistência devido ao custo desse tipo de produção, então todas as alternativas para que se possa baratear esses custos devem ser estudadas com exaustão.

Em cultivos controlados, os meios de cultura oferecem nutrientes necessários para ótimo crescimento de cada espécie. O objetivo em toda cultura de microalga é a maximização da conversão da eficiência fotossintética para um ótimo de produção de material orgânico. Como qualquer grupo de organismos, as algas variam nos seus requerimentos, exigências de diferentes meios e técnicas de cultivo. O meio de cultura e a luz são as bases para o estabelecimento de boa técnica de qualidade algal (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001).

O uso de fertilizantes inorgânicos tem sido muito praticado em aquicultura, como forma de aumentar a biomassa de microalga. O nitrogênio e fósforo em fertilizantes incrementam o crescimento de pequenas algas unicelulares. Em meio alternativo a base de substâncias húmicas, o crescimento de *Scenedesmus*

*quadricauda* (Chlorophyceae) foi rápido quando misturado ao meio EDTA (JIN et al., 2008).

A utilização de meio de cultura para a microalga Chlorophyceae contendo plantas aquáticas e NPK, pode servir de importante fonte alternativa por apresentar concentrações elevadas de nitrogênio e fósforo, essenciais ao desenvolvimento e crescimento com baixo custo, contribuindo para a reciclagem de resíduos de produtos biológicos. A utilização de fertilizante químico (NPK) associado com extrato de macrófita (*Eichhornia crassipes*) promoveu ganho nutricional à microalga *Ankistrodesmus gracilis*, similar ao meio comercial CHU<sub>12</sub> (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009).

O crescimento das microalgas é influenciado pelas mudanças de temperatura, intensidade e duração de luz, porém alta densidade celular e valor nutricional adequado são resultados do cultivo com meio que forneça nutrientes suficientes e manejo integrado (UGWU et al., 2008). Em geral, o valor nutricional está diretamente relacionado à espécie, suplemento de nutrientes e luz (CAI et al., 2007). Outras condições físico químicas como preferências espectrais, taxas de oxigênio e dióxido de carbono são importantes para o crescimento da cultura, podendo maximizar a produção (YAMAGUCHI et al., 2008).

Outra forma de avaliar a importância da microalga é através da produção de lipídios, sendo este muito utilizado na indústria comercial (biodiesel). Atualmente, a produção de biodiesel a partir de microalgas é muito dispendiosa para competir com o petróleo, de modo que os desafios atuais associam-se ao isolamento e seleção de espécies promissoras de elevada acumulação de conteúdo lipídico; a uma estratégia de produção de boa qualidade, melhorando-se o potencial das microalgas (CAROLINO, 2011).

O presente estudo tem por objetivo avaliar o cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* em laboratório utilizando três meios de cultura, macrófita+NPK, NPK (20:5:20) e CHU<sub>12</sub>, a fim de avaliar a influência do meio de cultura no crescimento, com especial referência a biologia e valor nutricional durante o período experimental de 28 dias, gerando conhecimentos para implementação de novas técnicas de cultivo com fins de alta produção a baixo custo que são de necessidade no campo da aquicultura.

## 2 – REVISÃO DE LITERATURA

As microalgas são organismos fotossintéticos que utilizam luz e CO<sub>2</sub> como fonte de carbono para produção de biomassa (PEREZ–GARCIA et al., 2011); possuem mecanismo fotossintético semelhante ao das plantas superiores; ausência de estruturas como caules e folhas; grande maioria estão submersas na água e possuem assim maior acesso ao dióxido de carbono e nutrientes, com melhores taxas de conversão da energia solar em biomassa (SCHENK et al., 2008).

Comumente encontradas em águas doces, marinhas e até nos solos, são consideradas responsáveis por pelo menos 60% da produção primária da Terra (CHISTI, 2004).

Algumas microalgas já são cultivadas comercialmente, como as dos gêneros *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) utilizada para obtenção de astaxantina, *Chlorella beyerinck*, (Chlorophyceae) e *Arthrospira stizenberger* (Cyanophyceae) obtendo-se aditivos em alimentos naturais e *Dunaliella salina* (Chlorophyceae) para a obtenção de β-caroteno (BECKER, 2004). Estima-se que a produção anual de biomassa algal é cerca de 5 milhões de quilos por ano, com valor de mercado próximo a 330 USD por kg (PULZ & GROSS, 2004).

Nos sistemas aquáticos, desempenham um importante papel na ciclagem de nutrientes, no balanço do pH, atuando na remoção do dióxido de carbono, gerando oxigênio e promovendo melhoria na qualidade da água através da absorção de compostos nitrogenados (PEREZ- GARCIA et al., 2011). Favorecem também a remoção de contaminantes orgânicos, metais pesados e microrganismos patogênicos presente em águas residuais (MUNOZ & GUIEYSSE, 2006).

Várias espécies têm sido propostas como uma alternativa na remoção de nutrientes presentes na água em tratamentos biológicos (MALLICK, 2002), utilizando ainda a biomassa colhida como ração animal ou produtos químicos de alto valor comercial (NUÑEZ et al., 2001).

Na aquicultura muitas espécies de microalgas são utilizadas como fonte primária de alimento para algumas espécies de peixes, porém as mais adequadas são aquelas que reúnem qualidades ideais de nutrição, digestibilidade e que

apresentem tamanhos celulares compatíveis com a espécie de peixe nos diferentes estágios de desenvolvimento e que suportem as condições de cultivo (SILVA et al., 2004)

As células algais possuem composição bioquímica diversificada (carboidrato, proteína, lipídios, ácidos graxos, etc.) e este conteúdo está relacionado não apenas com cada espécie, mas também com os fatores ambientais, como condições de cultivo, meios de cultura utilizados, entre outros (MIAO & WU, 2004).

As pertencentes à classe Chlorophyceae contêm em sua composição cerca de 32% de fibras totais, 10% de minerais, 44% de albumina, 12% de ácidos graxos, e 2% de clorofila em relação ao peso seco (PANIANGUA, 2003). Por serem fontes de micronutrientes, vitaminas, óleos e elementos traço para toda comunidade aquática, as microalgas são de grande importância na produção e balanço de oxigênio dissolvido na água (RIQUELME & AVENDAÑO-HERRERA, 2003), no uso como alimento (SOUTO et al., 2008) e em diversas áreas da aquicultura.

Alguns pesquisadores como Hanel et al. (2007) e Ju et al. (2009) verificaram que a proteína produzida pelas microalgas possui grande potencial na substituição da proteína presente em farinhas de peixes e como importante aditivo em alimentos para os organismos aquáticos.

## **2.1 – Importância da microalga na Aquicultura**

No Brasil, alguns estudos têm enfatizado o cultivo em massa de plâncton de água doce em laboratório, como fonte de alimento para larvas e alevinos de peixes. A falta de uma tecnologia adequada que permita uma produção em massa de plâncton de água doce a baixo custo, ainda não apresentou nenhum avanço significativo no Brasil para atender as necessidades protéicas dos peixes.

A necessidade do alimento natural para os peixes no início do desenvolvimento pode ser resolvida pelo cultivo de plâncton em instalações especiais designadas para este propósito. Esta é sem dúvida, a linha a ser seguida onde a proteína essencial a sobrevivência da larva de peixe poderá ser

produzida em massa, num tempo mais curto e em uma área relativamente menor (SIPAÚBA-TAVARES, 2013).

O cultivo de algas em laboratório para obtenção de uma dieta é bastante adequado, pois, as células em crescimento exponencial têm alta capacidade fotossintética e o principal produto da sua fotossíntese é a proteína (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001).

A natureza oferece uma grande diversidade de alimento aos peixes, incluindo nutrientes em solução e uma quantidade de plantas e animais diferentes.

O ambiente de água doce comparado ao marinho oferece poucas oportunidades para especialização alimentar das diferentes espécies de peixes. Como consequência muitas delas têm uma ampla tolerância ao tipo de habitat, uma flexibilidade de hábitos alimentares e, em geral, compartilham muitos recursos do seu ambiente com várias outras espécies de peixes.

Cada espécie de peixe pode apresentar preferências por um determinado tipo de alimento, estando seus órgãos sensoriais adaptados à ele, não permanecendo constante durante toda a vida podendo mudar com as alterações de suas estruturas no decorrer do desenvolvimento do peixe (NIKOLSKY, 1969).

Um dos fatores mais importantes para o sucesso na criação de peixes é provavelmente a utilização do alimento natural, principalmente nos estágios iniciais de desenvolvimento, podendo se resolver cultivando estes organismos em instalações especiais designadas para este propósito (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001).

A produção de algas diretamente nos tanques de criação de peixes, utilizando adubos orgânicos ou fertilizantes químicos têm sido realizadas em muitas estações de piscicultura do país com intuito de estimular e desenvolver o fitoplâncton (GRIECO-REIS et al., 1986; SÁ-JUNIOR, 1994). No entanto, esta técnica apresenta alguns problemas como limitação de luz pelo rápido florescimento de algas e aparecimento de Cyanobactéria e conseqüentemente, pode ocorrer a produção de espécies de algas com baixo valor nutricional (SIPAÚBA-TAVARES, 2013).

Os reagentes químicos necessários para a preparação dos meios de cultura são caros e, alternativas que levem a uma redução do custo de produção das algas são necessárias.



Dentre alguns meios testados com objetivo de reduzir o custo de produção estão: esgoto doméstico esterilizado para o cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* (PIPES & GOTAAS, 1960), *Chlorella vulgaris* (MARCELLO, 2013); extrato de lodo ativado e lodo digerido, acrescentando ou não outros resíduos como folha de chá e soja para o cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* (WONG & LAY, 1980); efluentes clarificados de biodigestores alimentados com esterco de porco para cultivo de *Chlorella vulgaris* (JUSIAK et al., 1984; DELABARY, 2012); NPK (20:5:20) para o cultivo de *Chlamydomonas* sp, *Scenedesmus bijugatus* e *Ankistrodesmus gracilis* (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 1993); vinhaça de cana-de-açúcar para cultivo de *Chlorella* sp. (OLIVEIRA, 1995); urina humana para cultivo de *Scenedesmus acuminatus* (ADAMSON, 2000); água intersticial extraída dos sedimentos de tanques de criação de camarão para cultivo de *Chaetoceros calcitrans*, *Nannochloropsis oculata* e *Oscillatoria* sp (YUSOFF et al., 2001), entre outros.

A adição de vitamina do complexo B às culturas de algas utilizadas como alimento para organismos aquáticos tem proporcionado ótimo crescimento e um aumento significativo na produção (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001; SIPAÚBA-TAVARES & PEREIRA, 2008; SIPAUBA-TAVARES et al. 2009, 2011, 2013; SIPAÚBA-TAVARES & BACHION, 2002).

Outra forma de baratear o custo de produção de microalgas em laboratório é o uso de plantas além de conter entre suas raízes uma população enorme de microrganismos associados, formam um componente ideal rico em material nutritivo (SIPAÚBA-TAVARES, 2000; SIPAÚBA-TAVARES et al. 2009). De acordo com Edwards (1990), *Tilapia nilótica* apresenta rendimento cerca de 2 a 5% do peso/dia quando alimentada com *Lemma*, em comparação com tratamento controle.

Em culturas em grandes volumes uma aeração constante e direta do meio de cultura é indispensável, mantendo as células em suspensão assegurando o suprimento de carbono inorgânico, estabilizando o pH, evitando a sedimentação excessiva das algas no fundo dos tanques ou sacos de cultivo, assegurando condições idênticas de crescimento para todas as células aumentando a superfície entre organismos e meio de cultura, facilitando as trocas gasosas (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001).

Sipaúba-Tavares & Bachion (2002) trabalhando com o cultivo de *Diaphanosoma birgei* e *Moina micrura*, verificaram que uma dieta a base de NPK (20:5:20) e vitamina B elevou o crescimento desta espécie além de fornecer um alimento com alto valor nutricional.

## **2.2 - O uso de microalgas como fonte energética**

A obtenção de biocombustível é a partir de açúcares, amido ou óleos vegetais, sendo estudado há mais de um século, com relação a produção a partir do alimento humano surgiu no sentido de oferecer aos produtores mais uma renda extra, porém os componentes que dão origem óleo para a produção de biocombustível, passaram a apresentar elevado preço no mercado (BATTEN & O'CONNELL, 2007).

Atualmente, uma das maiores preocupações ambientais é de encontrar uma fonte energética renovável que seja capaz de suprir o uso de combustíveis fósseis evitando assim, grande parte das emissões de gases de dióxido de carbono na atmosfera, que são os principais causadores do efeito estufa. Uma das alternativas pode ser o uso de bicomcombustíveis originados de fontes vegetais, como o biodiesel que é obtido a partir de oleaginosas (SCARDOELI-TRUZZI, 2013).

Algumas oleaginosas como a canola, a palma, soja e milho, produzem quantidades pequenas de óleo (cerca de 5% da biomassa total) (CHISTI, 2007) quando comparado com as microalgas, que conseguem acumular cerca de 25-50% de lipídios neutros nas células (HU et al., 2008), somado a isto, a superfície terrestre necessária para o cultivo das microalgas é inferior à das outras culturas, o que torna o biodiesel de microalgas o biocombustível renovável com alto potencial na substituição de combustíveis derivados do petróleo (CHISTI, 2007).

As microalgas ganharam grande interesse no seu uso como matéria-prima para produção de biocombustíveis (STEPHENS et al., 2010), devido a capacidade de serem cultivadas em locais com condições diversificadas quando comparado com outras culturas, e por apresentarem elevadas taxas de crescimento (CHISTI, 2007).

Algumas espécies possuem elevados teores de lipídios (CHISTI, 2007), sendo possível a extração de grandes quantidades de óleo, principal matéria prima para obtenção do biodiesel, entre as algas podem ser citadas: *Tetraselmis suecica* e *Botryococcus braunii*, que possuem respectivamente 15% e 75% de concentração lipídica nas células (KHAN, 2009), variando de acordo com as condições de cultivo.

A maioria dos óleos naturais produzidos pelas microalgas encontra-se na forma de triglicerídeos, que são considerados os melhores tipos de óleos para a produção de biodiesel (CHISTI, 2007; HU et al., 2008). O tipo de lipídios presentes varia entre as espécies (DAMIANI et al., 2010).

Alguns fatores ainda impedem a produção em massa de microalgas, como os altos custos envolvidos nos processos de cultivo, colheita e processamento. A colheita realizada no processo de produção pode atingir cerca de 20 a 30% dos custos (MOLINA-GRIMA et al., 2003).

Para a produção de biodiesel é fundamental a extração dos óleos presentes no interior das células. Esta extração pode ser feita por ação mecânica ou química, porém o uso de prensas mecânicas extrai uma porcentagem menor de óleos comparado com a extração química. O óleo extraído pode ser convertido em biodiesel através da reação de transesterificação, tecnologia esta já desenvolvida e industrialmente utilizada no processamento de conversão de óleos vegetais (JANAUN & ELLIS, 2010).

### **2.3 - Descrição da espécie *Ankistrodesmus gracilis***

Dentre as microalgas utilizadas para cultivo em laboratório, as Chlorophyceae unicelulares têm sido amplamente utilizadas na alimentação de organismos planctônicos e particularmente *Ankistrodesmus gracilis*, originária da região sudeste do Brasil, mostra-se bastante promissora como incremento da atividade aquícola (SIPAÚBA-TAVARES, 1995).

A alga *A. gracilis*, (Figura 1) pertence à classe Chlorophyceae, considerada uma das maiores classes de algas, com elevada diversidade de organismos, cerca de 17.000 espécies (RAVEN et al., 2001).



**FIGURA 1** – Microalga *Ankistrodesmus gracilis*: em colônia (A) e isolada (B).

Segundo BICUDO & MENEZES (2006), a posição sistemática desta microalga é a seguinte:

**Divisão:** Chlorophyta

**Classe:** Chlorophyceae

**Ordem:** Chlorococcales

**Família:** Oocystaceae

**Gênero:** *Ankistrodesmus*

**Espécie:** *Ankistrodesmus gracilis*

*Ankistrodesmus gracilis* apresenta critérios como fonte de alimento para diversos organismos aquáticos devido à qualidade física como pureza, disponibilidade, aceitação, valor nutricional, fácil de obtenção e economicamente viável (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 1993; HARDY & CASTRO, 2000; SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001).

Algas Chlorophyceae unicelulares são geralmente selecionadas para cultivo em massa e utilizadas na alimentação de organismos aquáticos por apresentarem parede celular mais fina e, portanto, uma quantidade de carbono inorgânico total em relação ao peso seco mais elevado do que as diatomáceas (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 1993).

As algas Chlorophyceae também denominadas de algas verdes constituem um grupo muito amplo e variado de algas unicelulares, de vida colonial e filamentosa. De cor verde intenso devido às clorofilas a e b que mascaram os carotenos e xantofilas. Os pirenóides situados nos cloroplastos armazenam amido como substância de reserva. Algumas algas Chlorophyceae são desnudas, mais a maioria possui uma parede celular formada por duas ou mais capas, a interna é

celulósica e a externa é pectínica. As algas de parede delgada têm, proporcionalmente, maior quantidade de material utilizável ou nutritivo que as de parede grossa (REYNOLDS, 1984).

A alga *A. gracilis*, quando isolada, caracteriza-se por ser unicelular imóvel e não produz zoósporos. Esta espécie apresenta célula alongada e pontiaguda em ambos os pólos. São comuns em água e solo, crescendo abundantemente, podendo originar florescimento, às vezes agregando-se em pequenos grupos (BOLD & WYNNE, 1995).

A escolha desta alga justifica-se pelas seguintes razões: de fácil cultivo ao longo do ano em laboratório; resiste bem ao manejo envolvido no cultivo; bem aceita como alimento pelas espécies zooplanctônicas e larvas de peixes (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 1993, 1994; SIPAÚBA-TAVARES et al., 1999; SIPAÚBA-TAVARES & BRAGA, 1999; HARDY & CASTRO, 2000; SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001; SIPAÚBA-TAVARES & BACHION, 2002).

Desta forma estudos que enfoquem maior conhecimento sobre a biologia e crescimento desta microalga, serão de fundamental importância em trabalhos que visem a produção de alimento vivo para organismos aquáticos.

## **2.4 - Fatores que influenciam no crescimento e desenvolvimento algal**

Para o cultivo de microalgas existem dois sistemas de cultivo: os denominados abertos e os fechados. Ambos os sistemas apresentam diferentes variações geométricas, sendo os mais conhecidos entre os sistemas abertos os “raceway” e dentre os fechados os fotobiorreatores tubulares e em forma de placas.

Mesmo tendo vários estudos e pesquisas sobre o uso de fotobiorreatores fechados, a utilização de sistemas comerciais de cultivo aberto do tipo tanque é maior, por possuir menores custos de implantação e operação (PUSHPARAJ et al., 1997). Esses tanques são equipados com agitadores compostos por pás giratórias ou outros materiais promovendo assim a circulação do meio de cultura (HASE et al., 2000).

As lagoas fotossintéticas são sistemas abertos, pouco profundos, com cerca de 10 a 50 cm para que seja possível a difusão do dióxido de carbono proveniente da atmosfera e ocorra maior penetração da luz solar, sendo comumente construídos em cimento ou terra compactada e impermeabilizados por lonas plásticas (CHISTI, 2007). Este sistema apresenta vantagens como menor gasto de energia necessária para operação e fácil manutenção da temperatura, devido ao contato direto com a atmosfera gerando maior dissipação de calor (MATA et al., 2010).

Sistemas de cultivo em fotobiorreatores verticais promovem elevada transferência de massa e mistura adequada das microalgas, com baixo rompimento das células evitando o estresse e aumentando a capacidade de limpeza e esterilização. Em função da maior superfície de área de iluminação, os sistemas verticais são ideais para cultivo em larga escala, alcançando altos níveis de oxigênio dissolvido com maior distribuição de luz na coluna, maximizando a produção (CHAE et al., 2006).

O cultivo em sistemas fechados possibilita maior produtividade de biomassa, redução dos riscos de contaminação e controle das condições de cultivo (BOROWITZKA, 1999; BRENNAN & OWENDE, 2010). Mesmo com estas vantagens, o alto custo de implantação, manutenção e operação, dificulta a utilização destes sistemas de cultivo em larga escala, sendo considerado o seu uso apenas no cultivo de espécies que possuam elevado valor comercial, como por exemplo, destinadas aos setores fármacos, nutracêuticos e de cosméticos (ERIKSEN, 2008; SCHENK et al., 2008).

Para o desempenho e desenvolvimento das microalgas em sistema de cultura os nutrientes considerados essenciais para o crescimento das microalgas são divididos em dois grupos: os macro nutrientes (oxigênio, nitrogênio, hidrogênio, fósforo, cálcio, magnésio, potássio e enxofre) e micronutrientes (ferro, boro, cobre, cobalto, zinco, vanádio, molibdênio e sódio) (SIPAÚBA- TAVARES & ROCHA, 2001).

A limitação de determinado nutriente pode alterar a taxa de crescimento e modificar a composição bioquímica das microalgas, como por exemplo, um meio onde a limitação de nitrogênio é maior, o conteúdo lipídico pode dobrar (WIDJAJA et al., 2009), porém a falta ou ausência de nitrogênio reflete negativamente na densidade celular obtida (HUANG et al., 2010).

Além dos nutrientes considerados essenciais, o uso de vitaminas do complexo B (tiamina, cobalamina e biotina) complementa o meio sendo que para muitas espécies são essenciais (SIPAÚBA-TAVARES & BACHION, 2002; SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001). O crescimento adequado da microalga em meio de cultura é dependente do balanço de nutrientes e da adição de complexo vitamínico que promovem ótimo crescimento.

O balanço de nutrientes varia de acordo com as condições de cultivo, alterando também a importância relativa dos mesmos como fatores limitantes ou controladores. A microalga *A. gracillis* é comumente cultivada em meio comercial CHU<sub>12</sub>, mas este eleva os custos totais de produção, inviabilizando o cultivo em larga escala.

Alguns meios de cultura alternativos podem substituir os reagentes utilizados nas formulações dos meios comerciais, obtendo-se resultados similares tanto no crescimento algal como no valor nutricional da espécie (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009).

O uso de meios alternativos utilizando produtos orgânicos é uma forma de aproveitar o excesso de material ou mesmo resíduos. As plantas aquáticas também denominadas de macrófitas desempenham importante função na manutenção e equilíbrio dos ambientes aquáticos (RODELLA et al., 2006), contribuindo nas transformações físicas, químicas e nos processos microbiológicos da água atuando na remoção de nutrientes (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2003).

A utilização de meio de cultura para a microalga Chlorophyceae contendo extrato de plantas aquáticas e NPK, pode servir de importante fonte alternativa por apresentar concentrações elevadas de nitrogênio e fósforo, essenciais ao desenvolvimento e crescimento com baixo custo, contribuindo para a reciclagem de resíduos de produtos biológicos.

O uso de fertilizante químico (NPK) associado com extrato de macrófita (*Eichhornia crassipes*) promoveu elevado valor nutricional para a microalga *A. gracilis*, sendo estes resultados similares ao meio comercial CHU<sub>12</sub> (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009).

*Eichhornia crassipes* comumente conhecida como aguapé é uma planta de água doce, pertencente à família Pontederiaceae, contendo em suas estruturas elevadas quantidades de nitrogênio, fósforo, magnésio, manganês, cobre, zinco

entre outros compostos, possibilitando o uso como fertilizante (SAHU, 2002; SIPAÚBA-TAVARES & BRAGA, 2007).

Meios à base de fertilizante inorgânico como o NPK, tem sido propostos como uma alternativa de baixo custo mostrando resultados satisfatórios quando comparado a meios comerciais, como o  $\text{CHU}_{12}$ , promovendo alta produção de *A. gracilis* com elevado valor nutricional (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 1993; SIPAÚBA-TAVARES & BRAGA, 1999; HARDY & CASTRO, 2000; SIPAÚBA-TAVARES & PEREIRA, 2008; SIPAÚBA-TAVARES et al., 2011).

Em cultivos controlados, os meios de cultura oferecem nutrientes necessários para o crescimento ótimo de cada espécie, sendo o nitrogênio, fósforo e potássio, fundamentais na maioria dos meios, tanto para espécies de água doce, como para as espécies marinhas (YAMAGUCHI, 2008).

A grande maioria das microalgas desenvolve-se em temperaturas entre 10 e 35°C, tendo ótimo crescimento entre 15 e 25°C (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001). A temperatura exerce influência direta sobre a velocidade da fotossíntese e o seu aumento acelera os processos oxidativos, como degradação da matéria orgânica, resultando em maior quantidade de nutrientes para o meio (MARGALEF, 1983).

O controle do pH, também possui importante papel no cultivo de microalgas, pois a elevação do mesmo acarreta na decantação de ferro e pode ocasionar aglomeração das microalgas junto com o precipitado (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001).

A luz é um dos principais fatores no crescimento das microalgas, contudo a intensidade requerida é específica para cada espécie, e, se a intensidade luminosa atingir todos os ângulos do recipiente de cultivo, proporcionará melhores taxas de absorção de energia aumentando a eficiência fotossintética (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2011).

Através da atividade enzimática, a intensidade luminosa influencia diretamente na síntese de proteína (RUYTERS, 1984; UMINO et al., 1991) e em excesso pode provocar efeito letal nas células devido à formação de peróxido de hidrogênio (HIRAYAMA et al., 1996).

Segundo Chisti (2007), valores de intensidade luminosa acima do requerido para a espécie acarreta a redução na taxa de crescimento, sendo este fenômeno denominado foto inibição. O ponto de inibição varia de acordo com as condições



do sistema de cultivo e depende da espécie. A luz em sistemas de cultivo de microalgas em laboratório levam a um dos maiores gastos, sendo que as taxas consideradas ideais estão entre 50 e 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , alternando em ciclos de 12 em 12 horas (BROWN et al., 1997), entretanto algumas espécies requerem maiores intensidades luminosas (HOFF & SNELL, 1997; AI et al., 2008). A influência dos ciclos de luz tem sido relatada como fator determinante na taxa de atividade fotossintética das microalgas (JANSSEN et al., 1999; 2000; 2001).

### 3 – MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 – Descrição do local de estudo

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), Jaboticabal, SP (Figura 2). Um dos setores do laboratório é o de cultivo de microalgas que possui uma área total de 28,43 m<sup>2</sup>, onde 16,05 m<sup>2</sup> são destinados para o cultivo em larga escala e 12,38 m<sup>2</sup> inclui uma sala de assepsia e um cepário, no qual foi realizado o experimento e onde são mantidas as culturas de microalgas.



**FIGURA 2** - (A) Vista externa do Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton, (B) sala de cultivo em larga escala e (C) cepário onde é realizado o cultivo em pequena escala

O cepário foi construído com pisos de cerâmica de cor gelo, paredes revestidas de azulejos brancos, contendo prateleiras de estrutura vazada que permitem a máxima passagem da luz e um sistema de cultivo com condições artificiais de iluminação, aeração e temperatura. A iluminação é composta por lâmpadas fluorescentes evitando interferência na temperatura do local e são distribuídas de forma intercalada atingindo todos os ângulos do cepário (Figura 3). A refrigeração é mantida de forma constante por um ar condicionado e a aeração é fornecida por um sistema artificial de compressores e filtros de ar diminuindo o risco de contaminação das culturas.



**FIGURA 3** - Sistema de iluminação artificial composto por lâmpadas fluorescentes e prateleiras de estrutura vazada (A) e filtros interno de ar (B)

O laboratório é abastecido com água proveniente de nascente, localizada na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP- Campus de Jaboticabal, onde após a captação, a água é armazenada em reservatório, atuando como um tanque de decantação de particulados sólidos provenientes da nascente e como reserva d'água para funcionamento do laboratório. Antes de abastecer o laboratório, a água passa por um sistema de dupla filtragem por filtros CUNO (5 e 1  $\mu\text{m}$ ) reduzindo a perda de pressão da água no processo, sendo que as tubulações por onde a água passa (canos/torneiras) são de materiais plásticos para evitar possíveis contaminantes.

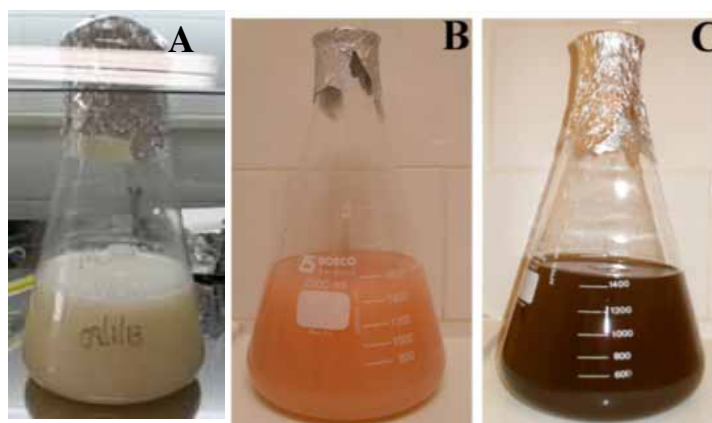
### 3.2 - Cultura algal

A alga *Ankistrodesmus gracilis* foi proveniente da Universidade Federal de São Carlos, linhagem n<sup>o</sup> 005CH, isolada da Represa do Broa (SP, Brasil). Posteriormente, cultivada no Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton (UNESP, Centro de Aquicultura) em sistema de cultivo estático não axênico, com aeração constante, temperatura de  $24,0 \pm 2,0$  °C sob iluminação de lâmpadas fluorescentes, com intensidade de 19,3 a 35  $\mu\text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$  no topo da cultura. A alga foi cultivada em 3 meios (1 comercial e dois alternativos): CHU<sub>12</sub> (comercial),

meio NPK (20:5:20) e meio macrófita + NPK (2:5:20), de acordo com (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 1994, 2001).

### 3.3 - Meios de cultura

Neste estudo foram utilizados três meios de cultura: um comercial CHU<sub>12</sub> usualmente utilizado para cultivo de *A. gracilis* e, outros dois meios alternativos, sendo um a base de fertilizante NPK (20:5:20) (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 1993) e outro com a macrófita *Eichhornia crassipes* associado ao NPK (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009) (Figura 4).



**FIGURA 4** – Meios de cultura utilizados no experimento, onde (A) meio CHU<sub>12</sub>, (B) o meio NPK e (C) macrófita associado ao NPK

O meio de cultura CHU<sub>12</sub> é um meio comercial preparado a base de vários reagentes químicos: Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, KCl, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>, Biotina. Posteriormente foram diluídos em 1400 mL de água destilada e autoclavados a 120 °C durante 20 minutos (Tabela 1).

O meio NPK (20:5:20) é um fertilizante químico, composto por uréia (fonte de nitrogênio), super fosfato simples (fonte de fósforo) e sulfato de potássio (fonte de potássio) (Tabela 1). Para a manutenção do cultivo de *A. gracilis* em laboratório, cerca de 70 g de fertilizante químico NPK (20:5:20) foram pesados, posteriormente triturados, diluídos em 1400 mL de água destilada e autoclavados a 120 °C durante 20 minutos.

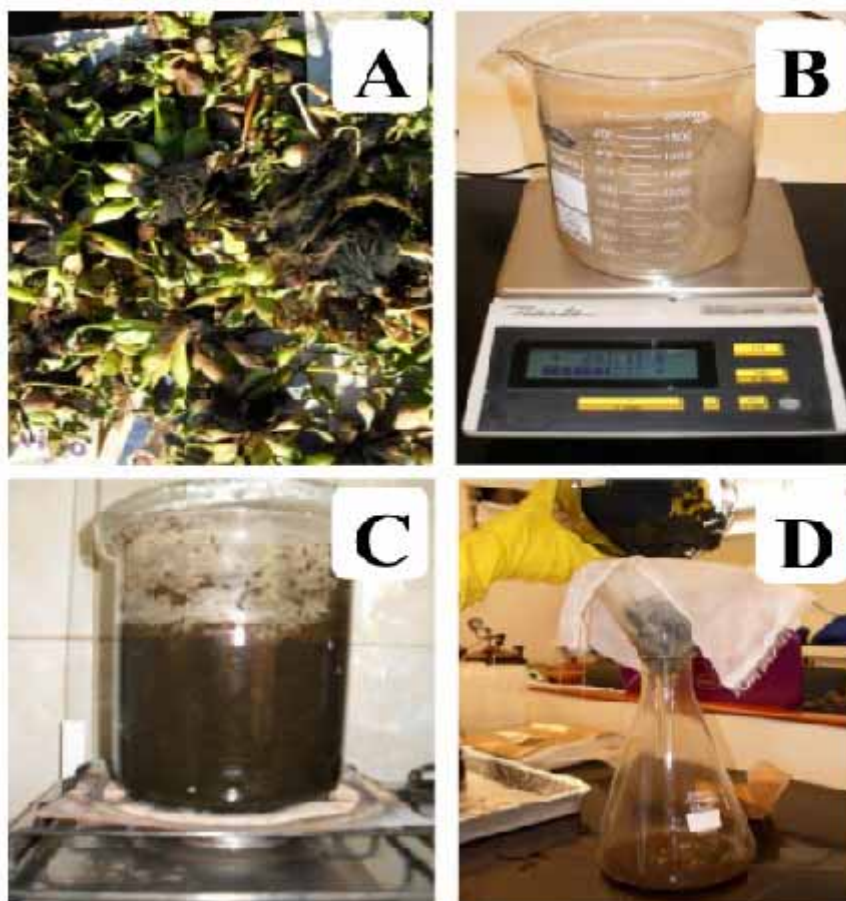
O meio de macrófita + NPK (Tabela 1) foi produzido e preparado através da planta aquática *Eichhornia crassipes* comumente conhecida como água-pé, onde cerca de cinco quilos desta planta foram secos e triturados, obtendo-se 243,10 gramas de pó de macrófita. Posteriormente, o pó obtido da macrófita foi fervido em água destilada por uma hora, filtrado e autoclavados a 120 °C durante 20 minutos (SIPAÚBA- TAVARES et al., 2009) (Figura 5).

Após o resfriamento uma sub-amostra da água de 70 mL foi retirada e completada para 1400 mL de água destilada, acrescentando 30 mL de NPK em função do melhor desempenho de *A. gracilis*, pois o meio contendo apenas macrófita possui uma coloração muito escura, dificultando o crescimento adequado da microalga. Além disso, a associação com o NPK fornece a microalga maiores concentrações de nitrogênio e potássio ao meio de cultura (SIPAÚBA-TAVARES & BRAGA, 2007).

**TABELA 1** – Composição dos nutrientes nos diferentes meios de cultura NPK, CHU<sub>12</sub>, e Macrófita + NPK.

Constituintes	NPK (gL <sup>-1</sup> )	CHU12 (gL <sup>-1</sup> )	*Macrófita + NPK (gL <sup>-1</sup> )
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	2,5	-	-
K <sub>2</sub> O	10	-	-
N	10	-	0,095
P	-	-	0,091
C	-	-	0,199
Mn	-	-	0,06
Mg	-	-	0,003
Fe	-	-	2,18
K	-	-	0,056
Ca	-	-	0,001
Cu	-	-	0,05 mg
Vit B <sub>1</sub> (tiamina)	0,007	-	0,007
Vit B <sub>2</sub>	0,007	-	0,007
Vit B <sub>6</sub>	0,005	0,085	0,005
Vit B <sub>12</sub>	33 µg	-	33 µg
Vit H (biotina)	0,01 mg	-	0,01 mg
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-	3,0	-
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	-	2,0	-
KCL	-	0,5	-
K <sub>2</sub> SiO	-	0,5	-
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	-	7,5	-
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	0,5	-

\*Fonte: A composição do meio de macrófita foi baseada em Sipaúba-Tavares et al. (2009)



**FIGURA 5** - *Eichhornia crassipes* (aguapé) em processo de secagem (A), obtenção do pó de macrófita já moido e triturado (B), macrófita sendo fervida (C) e filtrada (D)

### 3.4 - Delineamento experimental

O experimento foi realizado em sistema estático ou “batch” (fechado) em triplicata durante 28 dias totalizando 15 recipientes para cada meio e as variáveis foram mensuradas periodicamente (1, 7, 14, 21 e 28). Iniciou em erlenmeyers de 2L contendo os meios de cultura (CHU<sub>12</sub>, NPK (20:5:20) e macrófita + NPK). Para o meio CHU<sub>12</sub> foram adicionados 100 mL de meio, para o meio NPK (20:5:20), 40 mL de meio e para o meio M + NPK, 50 mL de meio macrófita associados a 3 mL de NPK, sendo que para cada meio foram acrescentados 1400 mL de água destilada.

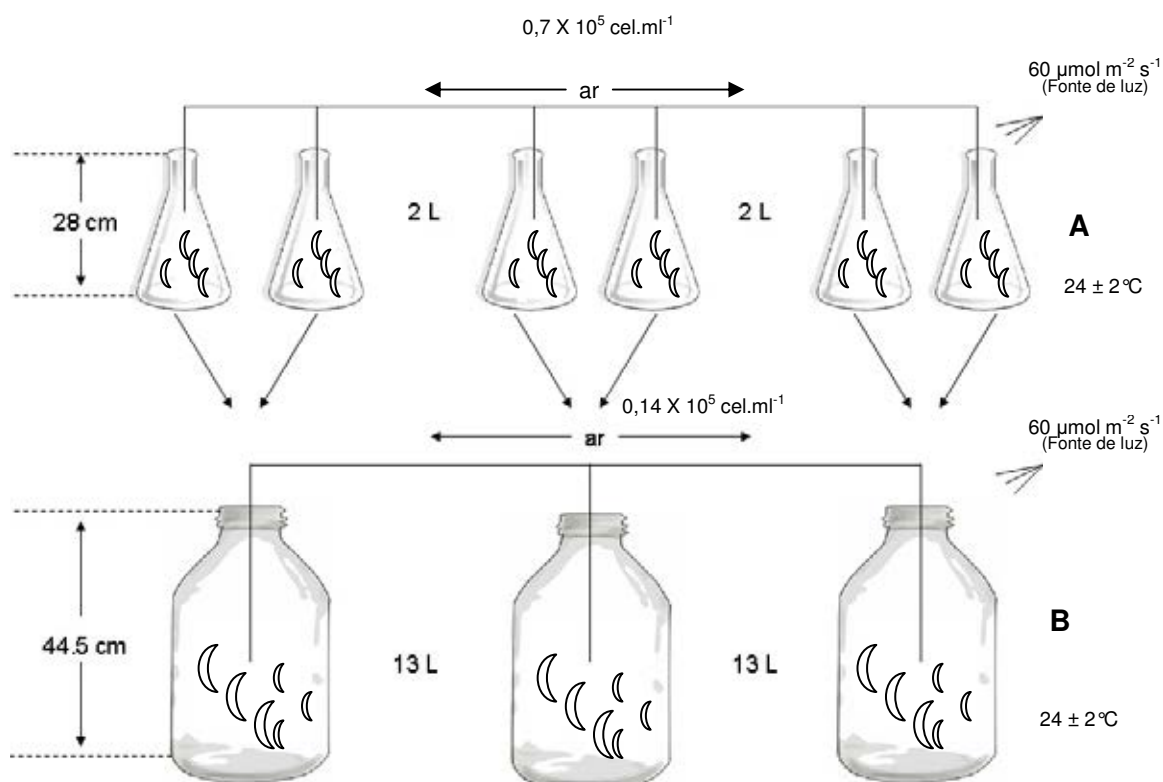
Quando a cultura alcançou a fase exponencial de crescimento (8 dias) o conteúdo de dois frascos de cada tratamento (4L), foram transferido para

recipientes de vidro de 13L (Figura 6) na densidade de  $5,1 \times 10^5$  céls mL<sup>-1</sup> para o meio de macrófita+NPK;  $4,4 \times 10^5$  céls mL<sup>-1</sup> para o meio NPK e  $4,5 \times 10^5$  céls mL<sup>-1</sup> para o meio CHU<sub>12</sub>. Em seguida, foi adicionado 140 mL de meio de cultura para cada unidade de recipiente, mais 10L de água e 20 mg de vitaminas do complexo B, de acordo com Sipaúba-Tavares & Bachion (2002).



**FIGURA 6** – Montagem do experimento: Adição de vitamina do complexo B (A), Adição do meio de cultura (B), Adição da alga (C), Experimento montado (D).

O experimento foi desenvolvido com intensidade luminosa constante de  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  até o final do experimento (Figura 7).



**FIGURA 7** – Diagrama esquemático do cultivo em “Batch” da microalga *Ankistrodesmus gracilis* nos volumes de 2 L e 13 L, em que: A = frascos, B = galões.

### 3.5 – Variáveis de qualidade do meio

Todas as variáveis de qualidade do meio de cultura foram analisadas nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 de cultivo. A temperatura ( $^\circ\text{C}$ ), pH, oxigênio dissolvido ( $\text{mg L}^{-1}$ ) e condutividade elétrica ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ) foram mensurados com uma sonda multiparâmetros YSI 556 MPS.

Amônia ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ), nitrito ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ), nitrato ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ), fósforo total ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) e ortofosfato ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) foram determinados de acordo com Koroleff (1976) & Golterman et al. (1978).

### 3.6 - Determinação do crescimento



Para avaliação do crescimento de *A. gracilis* nos três meios de cultura, alíquotas de 1 mL foram removidas diariamente ao longo de 28 dias consecutivos e 2x1 µL de sub-amostras foram contadas em hemocitômetro de Neubauer. O resultado obtido através da contagem foi expresso em número de células mL<sup>-1</sup> x 10<sup>5</sup>.

Neste estudo a taxa de crescimento e tempo de duplicação foram obtidas durante os dias de cultivo 1, 7, 14, 21, 28. A taxa de crescimento (k) (divisões por dia) foi obtida utilizando a seguinte fórmula:

$$k = (3.322/t_2 - t_1 \times \log N_2/N_1)$$

Onde t = tempo; N = número de células e t<sub>2</sub> - t<sub>1</sub> = diferença entre o tempo (GUILLARD, 1973).

O tempo de duplicação (T<sub>d</sub>) (tempo de divisão celular ou tempo de geração) foi calculado a partir dos resultados obtidos da taxa de crescimento, usando a fórmula:

$$T_d = 1k^{-1}$$

Onde T<sub>d</sub> = tempo de duplicação; 1k<sup>-1</sup> = divisão por dia (GUILLARD, 1973).

### 3.7 - Características algais

O peso seco, teor de cinzas, comprimento total, volume celular e carbono orgânico total foram quantificados nos dias de cultivo 1, 7, 14, 21, 28. O peso seco (pg cel<sup>-1</sup>) foi determinado obtendo-se 10 mL de cada réplica, coletado semanalmente como descrito acima e filtrado em filtro de fibra de vidro (GF/C 0,7 mm de tamanho de poro), previamente lavado em água destilada. Posteriormente o filtro foi seco em estufa a 60 °C e submetidos a pesagem até peso constante. A determinação do conteúdo de cinzas (pg cel<sup>-1</sup>) da microalga foi obtida incinerando os filtros em mufla a 500 °C, por 4 horas.

Para o comprimento total ( $\mu\text{m}$ ) cerca de 50 indivíduos foram mensurados em microscópio (Leica modelo- DFC 295) com o sistema de análise de imagens Las Core (LAS V3.8), com ocular micrométrica, em um aumento de 40 vezes. O cálculo do volume celular foi obtido pelo tamanho médio celular com uso da fórmula geométrica correspondente a forma da célula (dois cones acoplados) de acordo com Vollenweider et al. (1974) e Bottrel et al. (1976).

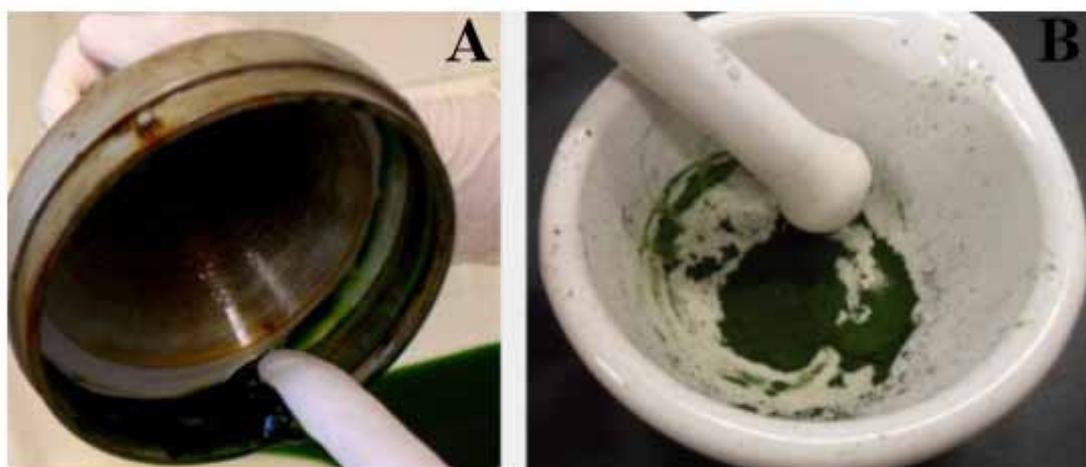
O carbono orgânico total foi calculado a partir da fórmula abaixo usando a regressão proposta por Rocha & Duncan (1985).

$$C = 0,1204. V^{1,051}$$

Onde: C = teor de carbono em  $\text{pg.célula}^{-1}$ ; V = volume celular

### 3.8 - Composição bioquímica

Para análise de lipídio e proteína bruta, a biomassa foi colhida nos diferentes dias de cultivo (1, 7, 14, 21, 28), centrifugada e liofilizada (Figura 8) seguindo a metodologia proposta por A.O.A.C. (1990).



**FIGURA 8** - Biomassa algal após a centrifugação (A) e biomassa liofilizada para posterior análise bioquímica (B)

### **3.9 - Pigmento**

A clorofila-*a* foi quantificada nos respectivos dias de cultivo (1, 7, 14, 21, 28). A extração deste pigmento foi realizada através do uso de etanol a 90% a quente e posteriormente determinado por método espectrofotométrico, segundo metodologia NUSCH (1980).

### **3.10 – Análise estatística**

Para as características algais foi aplicada a análise ANOVA (one-way), verificando se ocorreram diferenças entre os diferentes meios de cultura no decorrer do período de cultivo. Na ocorrência de diferenças entre as médias dos meios de cultura foi aplicado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade, com o software estatístico STATISTICA versão 8.0 (STATSOFT, 2007).

## 4 – RESULTADO E DISCUSSÃO

### 4.1. Variáveis de qualidade do meio

A temperatura do sistema de cultivo variou de 22 a 26°C (Figura 9). Um dos principais fatores responsáveis por regular as respostas morfológicas e fisiológicas das células é a temperatura (ZENG et al., 2011). Altas temperaturas geralmente aceleram as taxas metabólicas, enquanto as baixas temperaturas inibem o crescimento algal (MUNOZ & GUIEYSSE, 2006). Entretanto temperaturas ótimas também são influenciadas por outras variáveis ambientais, tais como a intensidade luminosa (ZENG et al., 2011).

Pequenas flutuações de temperatura no sistema de cultivo não ocasionam problemas sérios no desenvolvimento da microalga, mas temperaturas muito baixas ou muito altas afetam drasticamente o crescimento, levando as microalgas à morte (HOFF & SNELL, 1997).

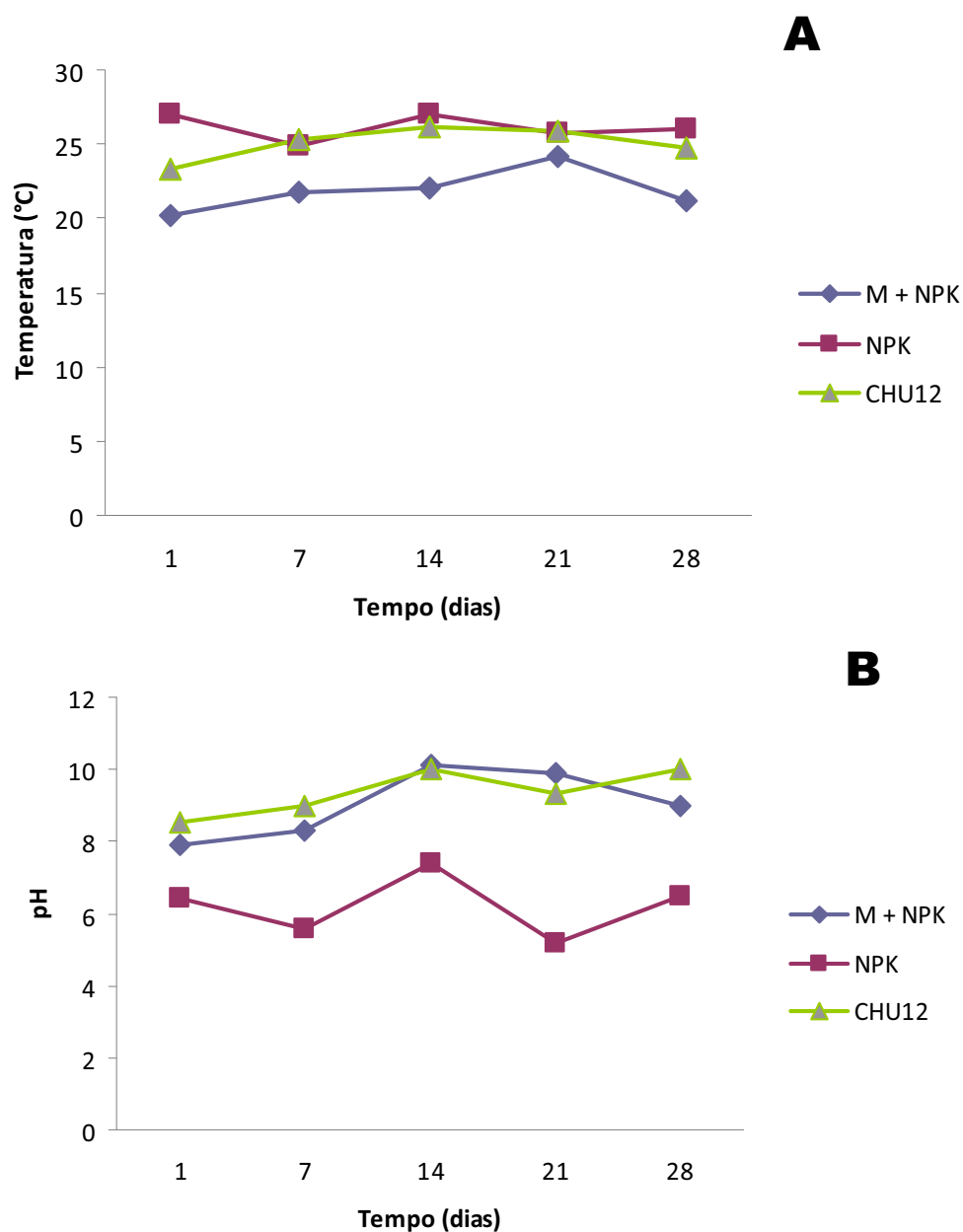
Na comparação dos valores entre os meios de cultura, diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) ocorreram, com média de 21,86 °C para o meio M+NPK, 26,13 °C para o meio NPK e 25,06 °C para o meio CHU<sub>12</sub> (Figura 9).

Em relação ao pH, na comparação dos valores entre os meios de cultura, diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) ocorreram, com média de 9,37 para o meio CHU<sub>12</sub>, 9,05 para os meios M+NPK e 6,21 NPK. Os menores valores foram obtidos no meio NPK e os maiores valores no meio CHU<sub>12</sub>, sendo de 5,2 e 10 respectivamente (Figura 9).

As microalgas são capazes de metabolizar carbono inorgânico (CO<sub>2</sub>), o pH possui tendência de aumentar durante o cultivo (ROCHA et al., 2003). A grande maioria das espécies de microalgas possuem ótimo crescimento em pH neutro, porém algumas espécies crescem sob condições ácidas ou alcalinas (ZENG et al., 2011).

O oxigênio é um fator essencial no cultivo de microalgas, a falta em uma cultura pode reduzir as taxas de crescimento e, assim, diminuir a produtividade de biomassa quando a densidade celular é elevada (WU & SHI, 2007). Ocorreram diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre os meios de cultura, sendo que no meio

M+NPK a média foi de  $5,29 \text{ mg L}^{-1}$ , no NPK  $7,34 \text{ mg L}^{-1}$  e no  $\text{CHU}_{12}$   $7,87 \text{ mg L}^{-1}$ . Os menores valores foram obtidos para o meio M+NPK e os maiores valores no meio  $\text{CHU}_{12}$ , sendo  $5 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $8,5 \text{ mg.L}^{-1}$  respectivamente (Figura 10).

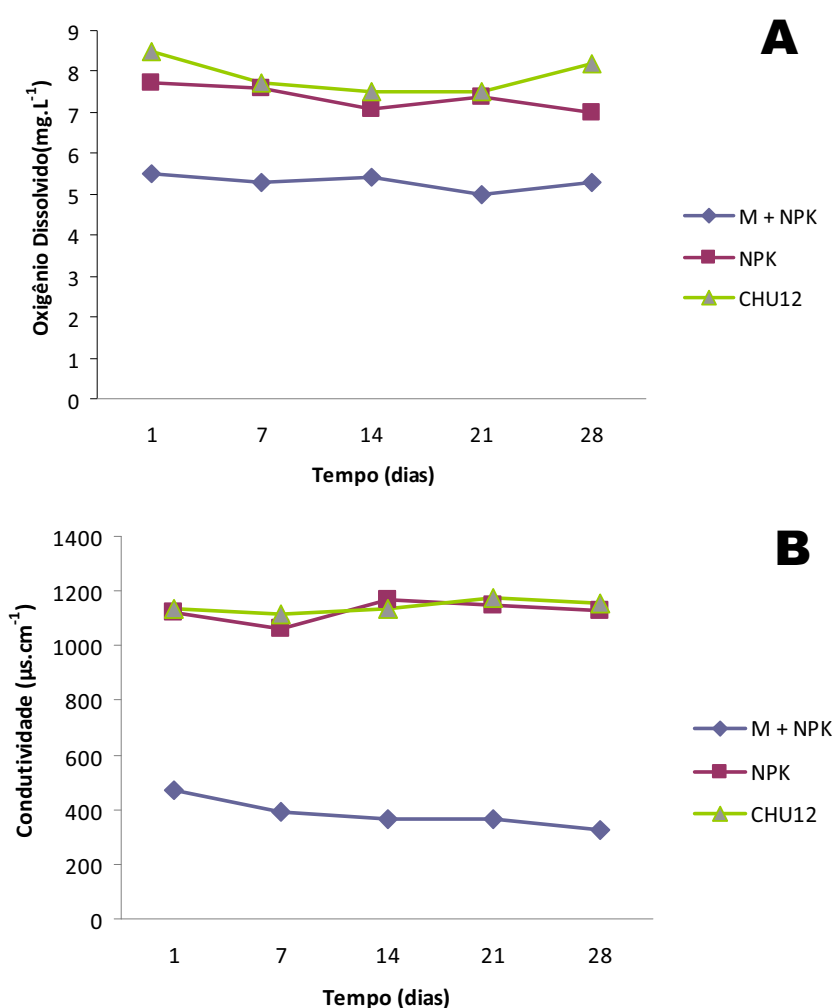


**FIGURA 9** - Variação da temperatura (A) e pH (B) em relação aos meios de cultura  $\text{CHU}_{12}$ , NPK e M + NPK.

Com o aumento na densidade celular, a concentração de oxigênio dissolvido também aumentou (ZHAO et al., 2011). A concentração de oxigênio

dissolvido no meio de cultura não deve ficar abaixo de  $4 \text{ mg L}^{-1}$ , contudo também não pode ultrapassar  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (Al et al., 2008).

A condutividade elétrica apresentou grandes variações quando comparado os meios de cultura. O meio  $\text{CHU}_{12}$  apresentou os maiores valores chegando a atingir  $1.177,3 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$ , seguido do meio NPK que obteve em média  $1.125,27 \text{ } \mu\text{S.cm}^{-1}$  e  $383,40 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$  para o meio M + NPK (Figura 10). O fato do meio NPK obter variação semelhante ao meio  $\text{CHU}_{12}$  pode estar relacionada à sua composição, basicamente constituída por sais e elevada concentração de nutrientes. Para esta variável ocorreu diferença significativa entre os meios de cultura ( $p < 0,01$ ).



**FIGURA 10** - Variação da concentração de oxigênio dissolvido (A) e condutividade elétrica (B) em relação aos meios de cultivo  $\text{CHU}_{12}$ , NPK e M + NPK.

Uma das principais vantagens dos experimentos realizados em escala laboratorial é a possibilidade de rápido controle e fácil monitoramento das

variáveis de cultivo. Determinar as faixas ótimas e exigências de fatores como temperatura, pH, oxigênio e luminosidade para cada espécie é de fundamental importância, pois a partir dos resultados obtidos será possível a otimização das condições de cultivo melhorando o desenvolvimento e crescimento das microalgas (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001).

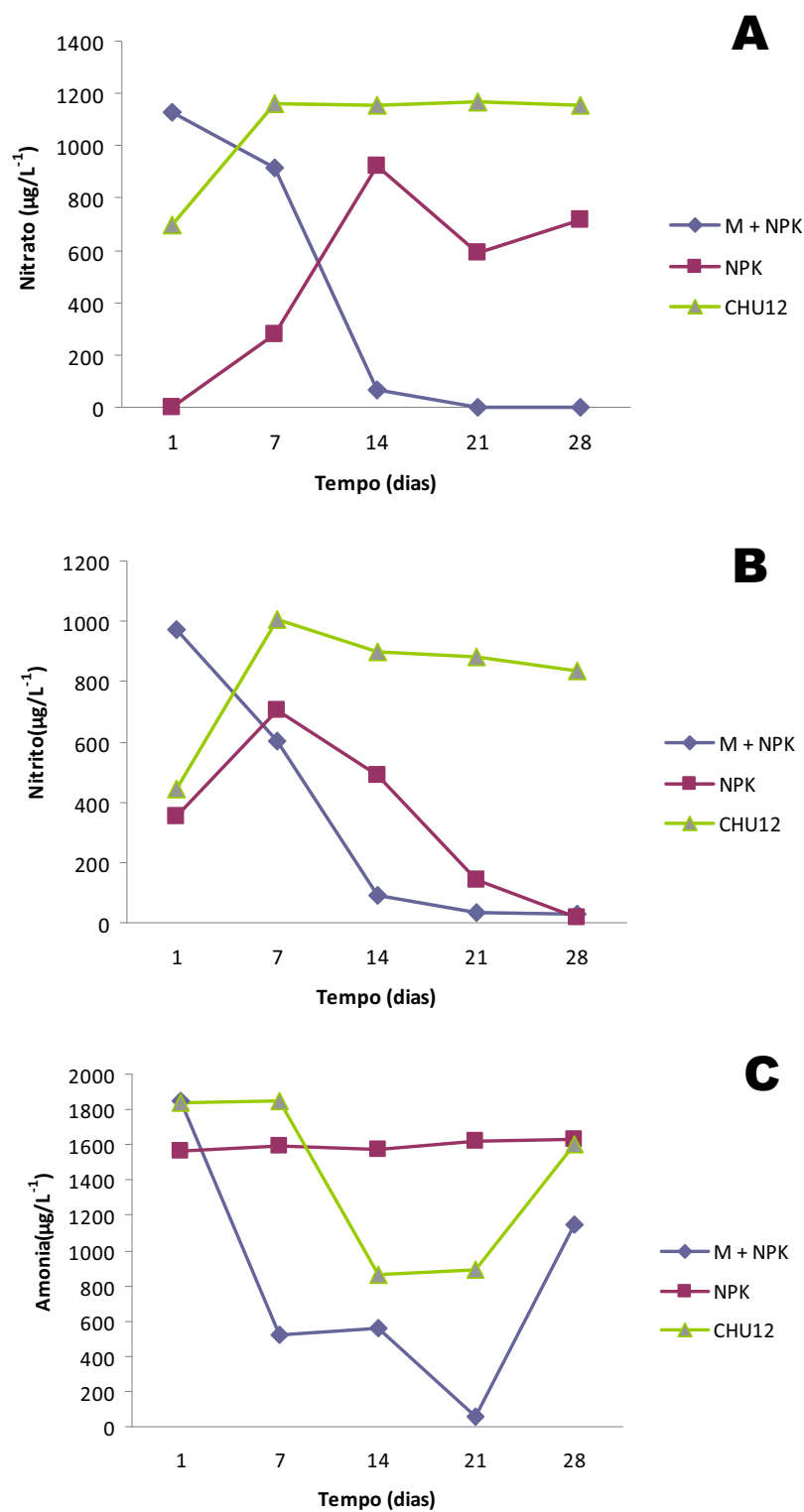
Para ótimo desempenho das microalgas, vários nutrientes são considerados essenciais ao seu desenvolvimento (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001). Muitos elementos são relatados de grande importância para o crescimento adequado das microalgas, tais como carbono (C), oxigênio (O), hidrogênio (H), nitrogênio (N), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), ferro (Fe), enxofre (S), fósforo (P) e elementos traços (JUNYING et al., 2013, SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001). Algumas variáveis como a intensidade luminosa, também podem influenciar a taxa de assimilação dos nutrientes, podendo acelerá-las ou diminuí-las (PEREZ- GARCIA et al., 2011).

O nitrogênio desempenha importante papel no crescimento, desenvolvimento, reprodução e outras atividades fisiológicas das microalgas. A fonte de nitrogênio e suas concentrações também afetam diretamente o acúmulo de lipídio nas células (JUNYING et al., 2013). A amônia vem sendo relatada como a principal fonte de nitrogênio utilizada pelas microalgas, e é energeticamente mais eficiente, já que menos energia é necessária para a sua assimilação (SHI et al., 2000; GROBBELAAR, 2004).

Neste experimento as concentrações de amônia nos meios apresentaram grandes variações. O meio M+NPK obteve os menores valores, média de 825,72  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , com decréscimo no 21º dia obtendo o valor médio de 54,9  $\mu\text{g L}^{-1}$ . O meio CHU<sub>12</sub> e NPK apresentaram as maiores concentrações, médias de 1.407,19  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 1.594,93  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Para esta variável, foram encontradas diferenças significativas quando comparado os meios de cultura ( $p < 0,01$ ) (Figura 11).

O nitrato também é uma importante fonte de nitrogênio para as microalgas, afetando o metabolismo e crescimento (PEREZ- GARCIA et al., 2011).

Para assimilá-lo, as células vegetais transportam-no através das membranas e, em seguida o reduzem-no a amônio, consumindo neste processo grandes quantidades de energia e carbono (CRAWFORD et al., 2000).



**FIGURA 11** - Variação da concentração de compostos nitrogenados Nitrato (A), Nitrito (B) e Amônia (C) em relação aos meios de cultivo CHU<sub>12</sub>, NPK e M+ NPK.

Em geral as maiores concentrações de nitrato foram obtidas no meio CHU<sub>12</sub>, sendo a média 1065,95 µg L<sup>-1</sup>. Os meios NPK e M+NPK obtiveram



médias menores  $497,19 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $397,03 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Inicialmente o meio  $\text{CHU}_{12}$  e NPK apresentaram concentrações menores que o meio M + NPK.

O meio  $\text{CHU}_{12}$  apresentou as maiores concentrações,  $1159,2$  a  $1167,3 \mu\text{g L}^{-1}$ , a partir do 7º dia de experimento, o oposto do observado com o meio M + NPK,  $917,8$  a  $68,6 \mu\text{g L}^{-1}$ , que tendeu a decrescer até o final do experimento. O NPK,  $277$  a  $922,3 \mu\text{g L}^{-1}$ , tendeu a crescer ao longo do experimento. Ocorreu diferença significativa ( $p < 0,01$ ) do nitrato entre os meios de cultura utilizados.

Para os valores de nitrito ocorreram diferenças significativas ( $p < 0,01$ ) entre os meios de cultura, sendo que no meio  $\text{CHU}_{12}$  a média foi de  $813,74 \mu\text{g L}^{-1}$ , no NPK  $340,78 \mu\text{g L}^{-1}$  e no M+NPK  $345,83 \mu\text{g L}^{-1}$ . Os menores valores foram obtidos para o meio NPK e os maiores valores no meio  $\text{CHU}_{12}$  (Figura 11).

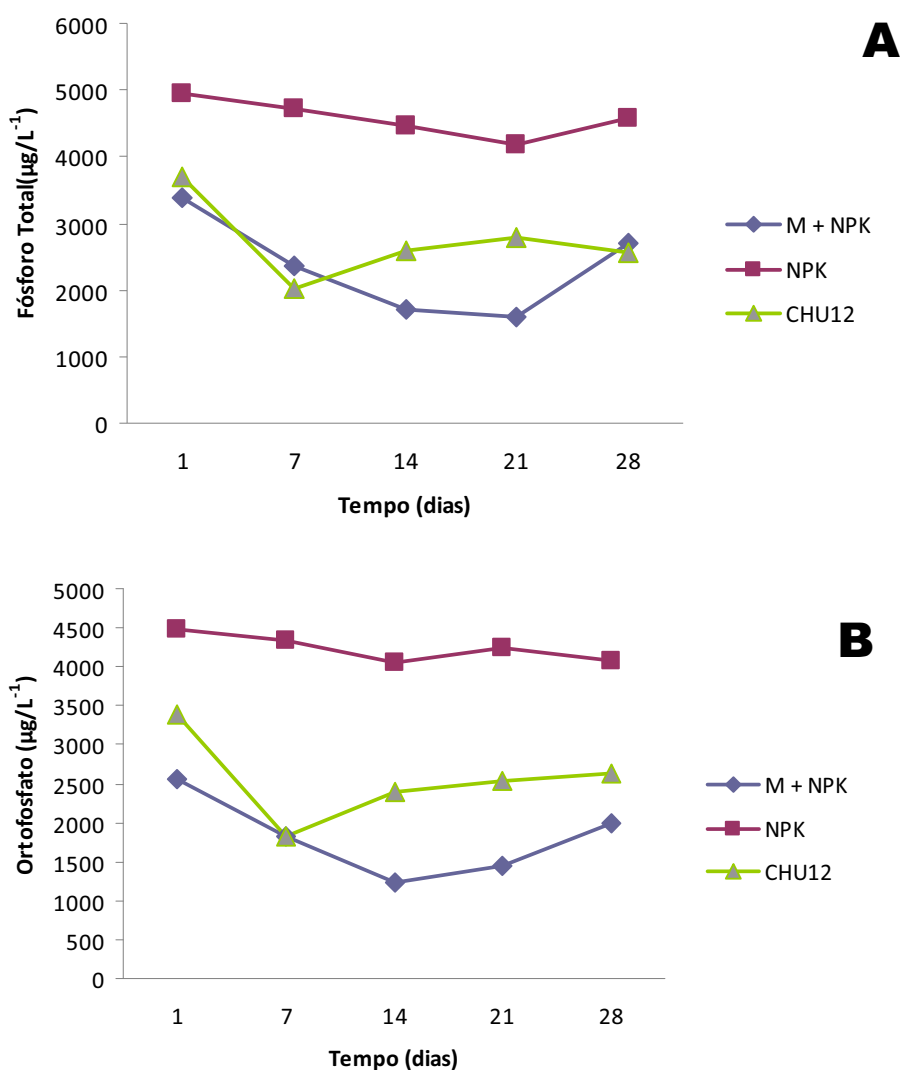
O fósforo é um elemento essencial para o cultivo de microalgas na forma de fosfato, fosfato de hidrogênio, entre outros, desempenhando papel importante nos processos metabólicos das microalgas, bem como, na sucessão de fitoplâncton nos ecossistemas aquáticos, na conversão de energia e na fotossíntese (JUNYING et al., 2013).

Neste experimento os níveis de fósforo ficaram acima de  $1300 \mu\text{g L}^{-1}$ , indicando alta disponibilidade deste nutriente. O meio NPK apresentou os maiores valores (em média  $4578,21 \mu\text{g L}^{-1}$ ); os meios M + NPK e  $\text{CHU}_{12}$  apresentaram concentrações médias de  $2349,79 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $2729,53 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente (Figura 12). Para esta variável, foi observada diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre os meios de cultura.

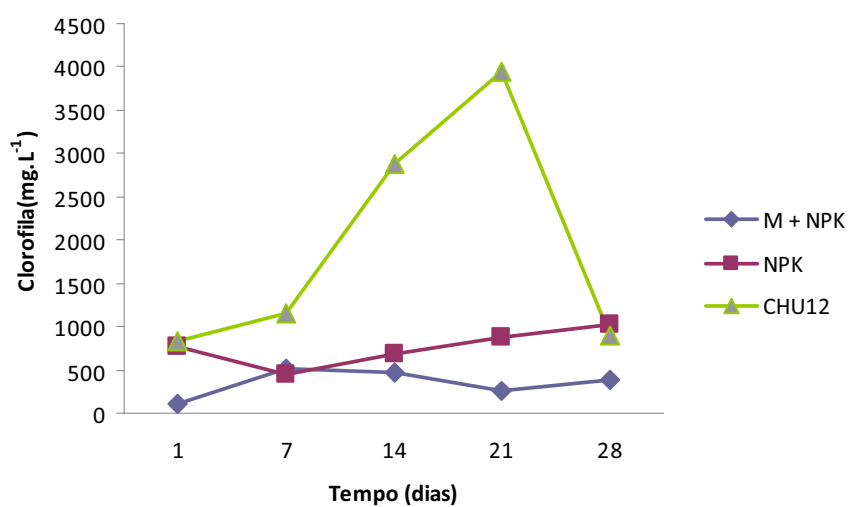
Para o ortofosfato durante o experimento, a concentração no meio NPK apresentou os maiores valores em média  $4230,67 \mu\text{g L}^{-1}$ , os meios M + NPK e  $\text{CHU}_{12}$  apresentaram concentrações médias de  $1810,41 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $2552,69 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente (Figura 12). Para esta variável, ocorreu diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre os meios de cultura.

As concentrações médias de clorofila-a foram mais expressivas no meio  $\text{CHU}_{12}$  ( $1938,86 \text{ mg L}^{-1}$  em média) já para os meios NPK e M+NPK as médias foram  $758,69 \text{ mg L}^{-1}$  e  $347,45 \text{ mg L}^{-1}$  respectivamente (Figura 13).

Para esta variável, ocorreu diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre os meios de cultura.



**FIGURA 12 - Variação das concentrações de fósforo (A) e ortofosfato (B) em relação aos meios de cultivo CHU<sub>12</sub>, NPK e M+ NPK**



**FIGURA 13 - Variação da clorofila-a em relação aos meios de cultivo CHU<sub>12</sub>, NPK e M+ NPK**

Os altos valores de clorofila-*a* estão associados à elevada densidade pois, muitas classes de algas, particularmente as algas verdes (Chlorophyceae), contêm grandes quantidades de clorofila (CHEN et al., 2009). O pico de clorofila-*a* no meio CHU<sub>12</sub> pode ser devido a maior quantidade de macro e micro nutrientes presentes no meio.

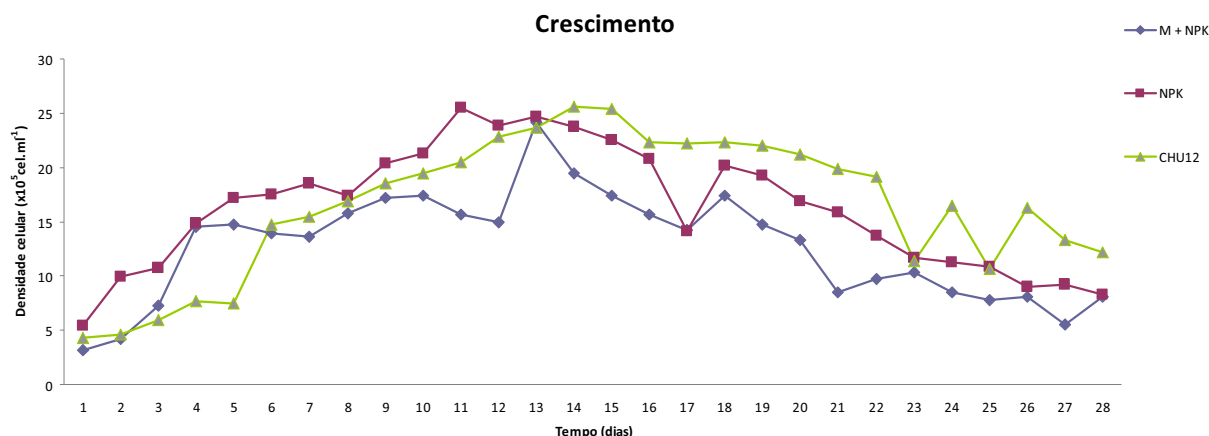
#### 4.2. Variáveis Biológicas e Bioquímicas

O crescimento de uma cultura algal é geralmente expresso pelo aumento de biomassa, do número de células ou da concentração de clorofila-*a* por unidade de tempo (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001). No cultivo, o termo crescimento refere-se às mudanças pelas quais a cultura passa, sendo composto por distintas fases: fase de indução ou lag; exponencial ou log; estacionária; redução de crescimento e senescente ou declínio (HOFF & SNELL, 1997).

Em relação ao crescimento de *Ankistrodesmus gracilis* cultivada em diferentes meios de cultura, foi observado melhores resultados no meio CHU<sub>12</sub>, onde a maior densidade celular foi obtida no 14<sup>º</sup> dia de cultivo, sendo de  $25,6 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup>. O meio NPK obteve densidade celular máxima de  $25,5 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup> no 11<sup>º</sup> dia. Já para o meio M + NPK a maior densidade foi de  $24,2 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup>, sendo obtida no 13<sup>º</sup> dia de cultivo (Figura 14).

As diferenças entre os picos de densidade celular nos diferentes meios de cultura não foram expressivas, porém os meios alternativos (NPK e M + NPK) apresentaram pico de densidade celular anterior (11<sup>º</sup> e 13<sup>º</sup> dia) ao do meio CHU<sub>12</sub> (14<sup>º</sup> dia). Comparando as três curvas de crescimento, foi observado que ocorreu diferença significativa ( $p < 0,01$ ) entre os meios de cultura alternativos (NPK e M+NPK) e o comercial (CHU<sub>12</sub>).

O conhecimento da curva de crescimento em cultivo de algas é muito importante, pois esta fase exponencial é considerada o período ideal para ser fornecida como alimento aos organismos aquáticos, pois as células encontram-se em divisão celular com elevado número de indivíduos, tendo como produto final produção de proteína (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 1993).



**FIGURA 14** - Curva de crescimento da microalga *Ankistrodesmus gracilis* durante o período experimental em relação aos meios de cultura CHU<sub>12</sub>, NPK e M+ NPK.

Ao longo dos 28 dias de experimento, foi observado que tanto para o meio NPK quanto para o CHU<sub>12</sub> as curvas de crescimento foram similares, com valores celulares médios de  $16,2 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$  e  $16,5 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$  respectivamente. Já no meio M+NPK, a curva de crescimento apresentou valor médio de  $12,7 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$  diferenciando-se dos outros dois meios ( $p < 0,01$ ).

Em relação às taxas de crescimento e tempo de duplicação, quando o cultivo o meio M+NPK apresentou maior taxa de crescimento, com  $K = 0,24$  divisões por dia e tempo de duplicação de 4,11 dias, já os meios NPK e CHU<sub>12</sub> apresentaram uma taxa de duplicação de  $K = 0,18$  divisões por dia e  $K = 0,20$  divisões por dia e tempo de duplicação de 5,47 dias e 5,04 dias, respectivamente (tabela 2).

A redução da taxa de crescimento pode ocorrer por diversos fatores, como por exemplo, à diminuição na disponibilidade de nutrientes, aumento da concentração de metabólitos e diminuição da disponibilidade de luz devido ao auto sombreamento (McKIM & DURNFORD, 2006).

**TABELA 2** – Taxa de crescimento e tempo de duplicação da microalga *Ankistrodesmus gracilis* durante o período experimental em relação aos meios de cultura CHU<sub>12</sub>, NPK e M + NPK.

Parâmetros	MACRÓFITA + NPK	NPK	CHU12
Taxa de crescimento (divisões/dia)	0,24	0,18	0,20
Tempo de duplicação (dias)	4,11	5,47	5,04

O peso seco apresentou variações entre os meios de cultura. Para o meio CHU<sub>12</sub> os valores obtidos variaram de 1,3 a 5,85 pg cel<sup>-1</sup> com valor médio de 3,528 pg cel<sup>-1</sup> e os meios NPK e M + NPK o peso seco variou de 1,23 a 9,83 pg cel<sup>-1</sup> com valor médio de 5,12 pg cel<sup>-1</sup> e 1,91 a 7,02 pg cel<sup>-1</sup>, com valor médio de 4,43 pg cel<sup>-1</sup> (tabela 3).

Comparando esses resultados com Hardy & Castro (2000), utilizando esse mesmo meio de cultura para o cultivo de *Ankistrodesmus gracilis*, obtiveram resultado de peso seco superior ( $125,0 \pm 13,1$  pg cel<sup>-1</sup>) aos encontrados nesse trabalho.

O teor de cinzas, embora represente uma pequena porcentagem do peso seco (5%), para muitas algas planctônicas pode representar mais de 50%, principalmente, em algas com maciça estrutura inorgânica (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 1993).

Os valores médios do teor de cinzas foram de 1,69 pg cel<sup>-1</sup> para o meio CHU<sub>12</sub>, 1,54 pg cel<sup>-1</sup> para o meio NPK e 2,69 pg cel<sup>-1</sup> para o meio M + NPK, equivalendo em média a 1% do peso seco. Em relação aos resultados obtidos de peso seco e cinzas, não ocorreram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre os meios (tabela 3).

Uma das principais características avaliadas para o uso das microalgas como alimento é o comprimento de suas células e grandes variações na forma e dimensões, indicam o biovolume disponível como alimento (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2001). Diversos fatores influenciam o volume celular das microalgas, dentre eles a temperatura (MARTÍNEZ et al., 2000), intensidade luminosa (SANCHO, 1997; CELEKLI & DONMEZ, 2006) e disponibilidade de nutrientes (LURLING, 2006).

Os valores de comprimento total foram similares para os meios NPK e M + NPK e comprimento total um pouco menor para o meio CHU<sub>12</sub> 20). No meio CHU<sub>12</sub>, as células apresentaram comprimento médio de 13,47 µm, o meio NPK apresentou valores de comprimento total das células em média de 14,25 µm e o meio M + NPK obteve valores médios de 14,75 µm. Para esta variável, não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os meios de cultura (tabela 3).

Em relação ao volume celular, o meio CHU<sub>12</sub> obteve-se valor médio 59,80 µm<sup>3</sup> e entre os meio NPK e M+ NPK os resultados médios foram aproximados,

sendo  $65,72 \mu\text{m}^3$  e  $71,29 \mu\text{m}^3$ , respectivamente. Para esta variável, não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os meios (tabela 3).

A família Chlorophyceae unicelulares são comumente utilizadas em cultivos de larga escala e na alimentação de organismos aquáticos por terem como principal característica a parede celular mais fina, quando comparada com as diatomáceas, assim a quantidade de carbono orgânico total em relação ao peso seco é maior (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 1993). O carbono constitui 40 a 60% da biomassa algal (FISCHER & ALFERMANN, 1995). Na avaliação da qualidade da microalga como alimento, este parâmetro é de grande importância (ROCHA & DUNCAN, 1985).

Neste estudo, os valores médios de carbono orgânico total obtido foram de  $10,75 \text{ pg cell}^{-1}$  para o meio M+NPK, para o meio NPK foi de  $9,87 \text{ pg cell}^{-1}$  e CHU12 o valor médio foi  $8,92 \text{ pg cell}^{-1}$ . Para esta variável, não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os meios (tabela 3).

**TABELA 3** – Valores médios das variáveis bioquímicas e biológicas da microalga *Ankistrodesmus gracilis* em relação aos meios de cultura CHU<sub>12</sub>, NPK e M + NPK.

VARIÁVEIS	MACROFITA + NPK	NPK	CHU <sub>12</sub>	ANOVA
Comprimento total ( $\mu\text{m}$ )	$14,75 \pm 2,8$	$14,25 \pm 2,5$	$13,47 \pm 2,34$	$p > 0,05$
Volume celular ( $\mu\text{m}^3$ )	$71,29 \pm 35,38$	$65,72 \pm 34,68$	$59,80 \pm 27,44$	$p > 0,05$
Fibra (%)	$6,43 \pm 0,92^b$	$4,71 \pm 1,09^{(ab)}$	$4,22 \pm 1,56^a$	$P < 0,05$
Peso seco ( $\text{pg.cell}^{-1}$ )	$4,43 \pm 2,39$	$5,12 \pm 3,45$	$3,47 \pm 1,94$	$p > 0,05$
TOC ( $\text{pg.cell}^{-1}$ )	$10,75 \pm 5,64$	$9,87 \pm 5,56$	$8,92 \pm 4,32$	$p > 0,05$
Teor de cinzas (% peso seco)	$2,69 \pm 1,74$	$1,54 \pm 0,33$	$1,69 \pm 0,64$	$p > 0,05$

A composição bioquímica está entre os maiores fatores determinantes do valor nutricional de microalgas (MULLER-NAVARRA, 1995; SHAMSUDIN, 1998). Segundo Fabregas et al. (1998) a composição bioquímica varia em função das condições de cultivo, da composição do meio, fases de crescimento, além do tamanho da célula, digestibilidade e toxicidade. O valor nutricional também varia em função do tamanho e forma dos recipientes de cultivo, aeração, volume celular (tamanho) e aspectos físicos químicos dos meios de cultura.

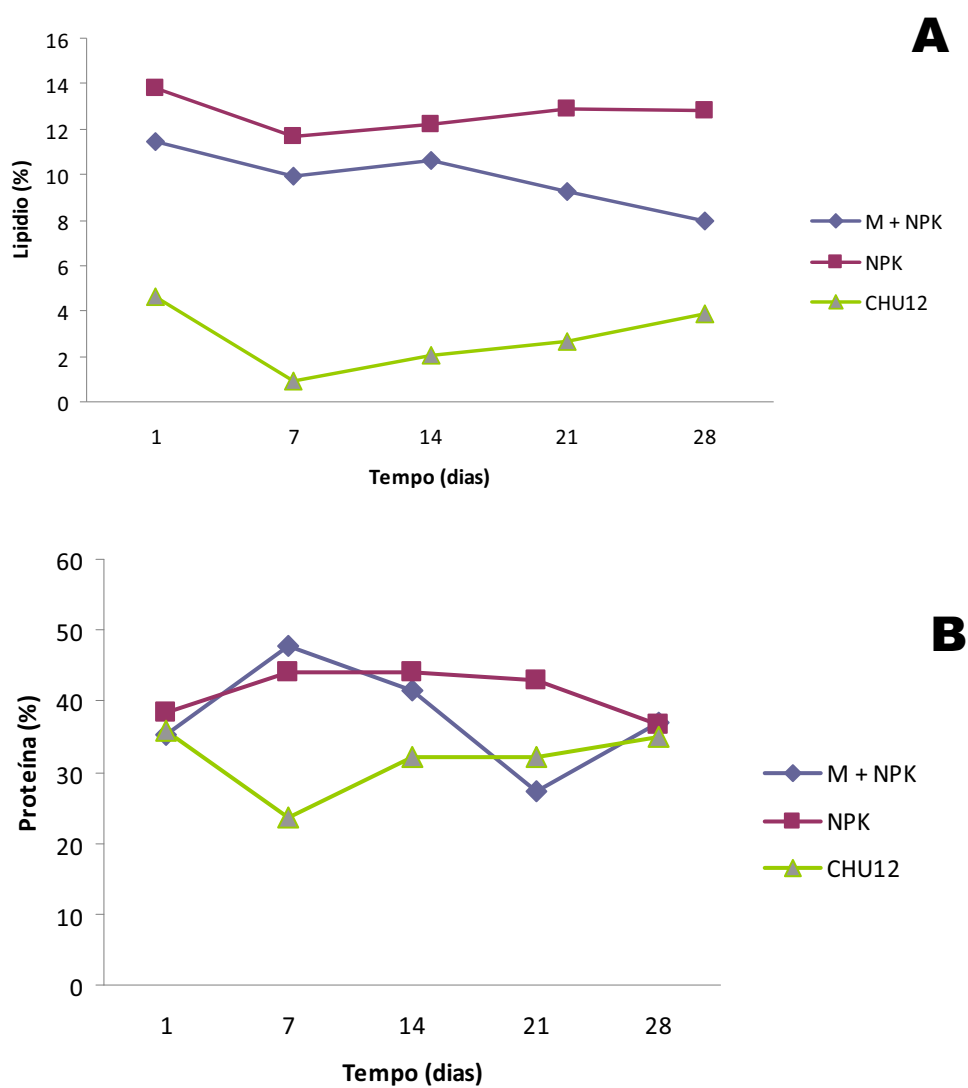
Brown et al., (1997), afirmaram que durante a fase de crescimento, as algas apresentam variação na composição bioquímica, e na fase estacionária, o nível de carboidratos e lipídios é alto, porém com baixo nível de proteína, devido a limitação de nitrogênio.

O teor de proteína para os três meios de cultura esteve acima de 30% de peso seco sendo que para o meio M + NPK o valor médio foi de 37,71%, para o meio NPK o valor médio foi de 41,26% e o para o meio CHU<sub>12</sub> o valor médio foi de 31,76%, houve diferença significativa em relação a proteína ( $p < 0,05$ ) e os maiores valores foram encontrados para o meio NPK onde houve variação 36,71 a 44,17% de peso seco (Figura 16). Brown et al. (1997) também observaram níveis de proteína acima de 30% de peso seco para microalgas marinha, atribuindo estes valores à aeração do meio.

Sipaúba-Tavares & Pereira (2008) trabalhando com *Ankistrodesmus gracilis* em meio NPK em tanques de 850 L com iluminação constante, obtiveram valores de proteínas de 47,3% de peso seco, similares aos encontrados neste trabalho. Nayar et al. (1998) ao avaliar a qualidade nutricional de *Chlorella vulgaris* utilizada como alimento vivo na aquicultura, verificou níveis de proteína bruta de 12,2% de peso seco, inferiores aos obtidos neste estudo. Para o meio de M + NPK a proteína variou de 27,22 a 47,64% de peso seco, para o meio CHU<sub>12</sub>, a proteína variou de 23,59 a 35,97% de peso seco.

Estudos diários, no metabolismo de lipídios em diatomáceas, têm demonstrado que lipídios e ácidos graxos podem ser oxidados quando as células requerem energia para o processo de biossíntese, inclusive protéica, em condições de ausência de luz durante a divisão celular (SICKO-GROAD & ANDERSEN, 1991). A média do conteúdo de lipídios das células das algas varia entre 1% a 70%, mas pode chegar a 90% do peso seco, sob certas condições (SPOLAORE et al., 2006).

Para o meio de M+NPK o valor de lipídio variou de 7,93 a 11,46% de peso seco sendo os valores médios de 9,85% de peso seco, para o meio NPK, o valor variou de 11,66 a 13,78% de peso seco sendo os valores médios de 12,68% de peso seco, o meio CHU<sub>12</sub>, variou de 0,89 a 4,63% de peso seco sendo os valores médios de 2,82% de peso seco, ocorreu diferença significativa entre os meios ( $p < 0,01$ ). Os valores de lipídios foram superiores nos meios alternativos quando comparado ao meio comercial (CHU<sub>12</sub>) (Figura 15).



**FIGURA 15** - Variação da lipídio (A) e proteína (B) em relação aos meios de cultivo CHU<sub>12</sub>, NPK e M+ NPK



## 5 - CONCLUSÃO

Com base nos resultados, pode-se concluir que a utilização dos meios de cultura alternativos NPK (20:5:20) e macrófita + NPK apresentaram resultados satisfatórios no crescimento e desenvolvimento da microalga *A. gracilis*, sendo estes resultados, muitas vezes, superiores ao meio comercial utilizado (CHU<sub>12</sub>), indicando alto potencial para a aplicação em áreas de nutrição animal.

Em relação à composição bioquímica, para os três meios de cultura o teor de lipídio foi abaixo de 15%, porém os meios alternativos apresentaram os teores de lipídio bem acima do meio CHU<sub>12</sub>. Em relação aos teores de proteína também foram maiores nos meios alternativos, em geral o meio NPK com as maiores concentrações.

## 6 – REFERÊNCIAS

ADAMSON, M. Potential use of human urine by greenhouse culturing of microalgae (*Scenedesmus acuminatus*), zooplankton (*Daphnia magna*) and tomatoes (*Lycopersicon*). **Ecological Engineering**, Amsterdam, v. 16, n. 2, p. 243-254, 2000.

AI, W.; GUO, S.; QIN, L.; TAGNG, Y. Development of ground-based space micro-algae photo-bioreactor. **Advances in Space Research**, Kidlington, v. 41, n. 5, p. 742-747, 2008.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C.). **Official methods of analysis**. 15<sup>th</sup>. ed. Washington, DC, 1990.

BATTEN, D.; O'CONNELL, D. **Biofuels in Australia**: some economic and policy issues. Canberra, Austrália: Rural Industries Research and Development Corporation, nov. 2007. Disponível em: <<https://rirdc.infoservices.com.au/downloads/07-177>>. Acesso em: 11 abr. 2014.

BECKER, W. Microalgae for aquaculture – The nutritional value of microalgae for aquaculture. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Publishing, 2004. p. 380-391.

BICUDO, C. E. de M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil**: chave para identificação e descrições. São Carlos: RiMa, 2006. 502p.

BOLD, H. C.; WYNNE, M. J. **Introduction to the algae, structure e reproduction**. N. Jersey: Prentice Hall Inc., 1995. 586 p.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. **Progress in Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 35, n. 1-3, p. 313–321, 1999.

BOTTREL, H. H.; DUNCAN, A.; GLIWICZ, Z. M.; GRYGIEREK, E.; HERZIG, A.; HILLBRICH-ILKOWSKA, A.; KURASAWA, H.; LARSSON, P.; WEGLENSKA, T. A. Review of problems in zooplankton production studies. **Norwegian Journal of Zoology**, Chichester, v. 24, n. 1, p. 419-456, 1976.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae – A review of a technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Kidlington, v. 14, n. 2, p. 557-577, 2010.

BROWN, M. R.; JEFREY, S. W.; VOLKMAN, J. K.; DUNSTAN, G. A. Nutricional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 151, n. 1- 4, p. 315-331, 1997.

CAI, S. Q.; HU, C. Q.; DU, S. B. Comparisons of growth and biochemical composition between mixeal culture algae and yeast and monocultures. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 104, n. 5, p. 391-397, 2007.

CAROLINO, L. R. V. **Cultivo de microalgas unicelulares para determinação da produção lipídica e sequestro de carbono**. 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia) – Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2011.

CELEKLI, A.; DONMEZ, G. Effect of pH, light, intensity, salt and nitrogen concentration on growth and  $\beta$ -carotene accumulation by a new isolate of *Dunaliella* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 22, n. 2, p. 183-189, 2006.

CHAE, S. R.; HWANG, E. J.; SHIN, H. S. Single cell protein production of *Euglena gracilis* and carbon dioxide fixation in an innovative photobioreactor. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 97, n. 2, p. 322-329, 2006.

CHEN, W.; ZHANG, C.; SONG, L.; SOMMEFELD, M.; AMDHU, Q. A high throughput Nile method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. **Journal of Microbiology Methods**, Amsterdam, v. 77, n. 1, p. 41-47, 2009.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, New York, v. 25, n. 3, p. 294-306, 2007.

CHISTI, Y. Microalgae: our marine forests. Book reviews. In: RICHMOND, A. (Ed.). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. 566 p.

CRAWFORD, N. M.; KAHN, M. L.; LEUSTEK, T.; LONG, S. R. Nitrogen and sulfur. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 786-849.

DAMIANI, M. C.; POPOVICH, C. A.; CONSTENLA, D.; LEONARDI, P. I. Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 101, n. 11, p. 3801–3807, 2010.

DELABARY, G. S. **Avaliação do crescimento de três microalgas para a remoção de nutrientes de efluente de estação de tratamento de dejetos suínos**. 2012. 163 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

EDWARDS, P. An alternative excreta-reuse strategy for aquaculture: the production of high-protein animal feed. In: EDWARDS, P.; PULLIN, R. S. V. (Ed.). **Wastewater-fed aquaculture: proceeding of International Seminar on Wastewater Reclamation and Reuse for Aquaculture**. Bangkok: Environmental Sanitation Information Center, 1990. p. 120-131.

ERIKSEN, N. T. The technology of microalgal culturing. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 30, n. 9, p. 1525-1536, 2008.

FÁBREGAS, J.; OTERO, A.; MORALES, E. D.; ARREDONDO-VEJA, B. O.; PATINO, M. Modification of the nutritive value of *Phaeodactylum tricornutum* for *Artemia* sp. in semicontinuous cultures. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 169, n. 3-4, p. 167-176, 1998.

FISCHER, U.; ALFERMANN, A. W. Cultivation of photoautotrophic plant cell suspension in the bioreactor: influence of culture conditions. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 19-28, 1995.

GOLTERMAN, H. L.; CLYMO, R. S.; OHNSTAD, M. A. **Methods for physical and chemical analysis of freshwater**. London: Blackwell Scientific Publications, 1978. p. 213. (IBP Handbook, 8).

GRIECCO-REIS, M. A.; ONAGA, C. A.; BORGES, V. A.; SANTOS, A. A. Acompanhamento da produção de plâncton em tanques fertilizados na Estação de Piscicultura de Jupia (CESP). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 5., 1986, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá: Simbraq, 1986. p. 24-30.

GROBBELAAR, J. U. Algal biotechnology: real opportunities for Africa. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v. 70, n. 1, p. 140-144, 2004.

GUILLARD, R. R. L. Division rates. In: STEIN, J. R. (Ed.). **Handbook of phycollogical methods: culture methods and growth measurements**, London: Cambridge University Press, 1973. p. 289-311.

HANEL, R.; BROEKMAN, D.; DE GRAAF, S.; SCHNACK, D. Partial replacement of fishmeal by lyophilized powder of the microalgae *Spirulina platensis* in pacific White shrimp diets. **The Open Marine Biology Journal**, Bussum, v. 1, n. 1, p. 1-5, 2007.

HARDY, E. R.; CASTRO, J. G. D. Qualidade nutricional de três espécies de clorofíceas cultivadas em laboratório. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 30, n. 1, p. 39-47, 2000.

HASE, R.; OIKAWA, H.; SASAO, C.; MORITA, M.; WATANABE, Y. Photosynthetic production of microalgal biomass in a raceway system under greenhouse conditions in Senday city. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 9, n. 2, p. 157-163, 2000.

HIRAYAMA, S.; UEDA, R.; SUGATA, K. Evaluation of active oxygen effect on photosynthesis of *Chlorella vulgaris*. **Free Radical Research**, London, v. 25, n. 3, p. 247-257, 1996.

HOFF, F. H.; SNELL, T. W. **Plankton culture manual**. 4<sup>th</sup> ed. Florida: Aqua Farms, 1997. 141 p.

HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D.; ZHANG, X.; CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, Kidlington, v. 87, n. 1, p. 38-46, 2010.

HU, Q.; SOMMERFELD, M.; JARVIS, E.; GUIRARDI, M.; POSEWITZ, M.; SEIBERT, M.; DARZINS, A. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuels production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, Oxford, v. 54, n. 4, p. 621-639, 2008.

JANAUN, J.; ELLIS, N. Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Kidlington, v. 14, n. 4, p. 1312-1320, 2010.

JANSSEN, M.; KUIJPERS, T. C.; VELDHOEN, B.; TERNBACH, M. B.; TRAMPER, J. R.; WIJFFELS, M. R. H. Specific growth rate of *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella sorokiniana* under medium duration light: dark cycles: 13-87s. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 70, n. 1-3, p. 323-333, 1999.

JANSSEN, M.; SLENDERS, P.; WINTER, M.; TRAMPER, L. R. M.; WIJFFELS, R. H. Photosynthetic efficiency of *Dunaliella tertiolecta* under short light/dark cycles. **Enzyme and Microbial Technology**, Philadelphia, v. 29, n. 4-5, p. 298-305, 2001.

JANSSEN, M.; WINTER, J.; TRAMPER, L. R.; SNEL, M. J.; WIJFFELS, R. H. Efficiency of light utilization of *Chlamydomonas reinhardtii* under medium-duration light: dark cycles. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 78, n. 2, p. 123-137, 2000.

JIN, X.; CHU, L.; YAN, F.; LENG, Q. Effects of lanthanum (III) and EDTA on the growth and competition of *Microcystis aeruginosa* and *Scenedesmus quadricauda*. **Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters**, Amsterdam, v. 39, n. 1, p. 86-93, 2008.

JUNYING, Z.; JUNFENG, R.; BAONING, Z. Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel. **Chinese Journal of Catalysis**, Amsterdam, v. 34, n. 1, p. 80-100, 2013.

JUSIAK, M. P.; DUSZOTA, M.; MATUSIAK, K.; MYCIELSKI, R. Intensive culture of *Chlorella vulgaris* as the second stage of biological purification of nitrogen industry wastewater. **Water Research**, London, v. 18, n. 1, p. 1-7, 1984.

JU, Z. Y.; FORSTER, I.; DOMINY, W. Effects of supplementing two species of marine algae or their fractions to a formulated diet on growth, survival and composition of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 292, n. 3-4, p. 237-243, 2009.

KHAN, S. A.; RASHMI; HUSSAIN, M. Z.; PRASAD, S.; BANERJEE, U. S. Prospects of biodiesel production from microalgae in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Kidlington, v. 13, n. 9, p. 2361-2372, 2009.

KNUCKEY, R. M.; BROWN, M. R.; ROBERT, R.; FRAMPTON, D. M. F. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. **Aquacultural Engineering**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 300-313, 2006.

KOROLEFF, F. Determination of ammonia. In: GRASSHOFF, K. (Ed.). **Methods of seawater analysis**. Berlin: Verlag Chemie Weinheim, 1976. p. 126-133.

LURLING, M. Effects of a surfactant (FFD-6) on *Scenedesmus* morphology and growth under different nutrient conditions. **Chemosphere**, Kidlington, v. 62, n. 8, p. 1351-1358, 2006.

MALLICK, N. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. **Biometals**, Dordrecht, v. 15, n. 4, p. 377-390, 2002.

MARCHELLO, A. E. **Cultivo de microalgas e redução de coliformes em efluente de tratamento anaeróbio**. 2013. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

MARGALEF, R. **Limnología**. Barcelona: Ediciones Omega S.A.P., 1983. 1010 p.

MARTÍNEZ, M. E.; SANCHEZ, S.; JIMENEZ, J. M.; EL YOUSFI, F.; MUNOZ, L. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalgae *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource of Technology**, Amsterdam, v. 73, n. 3, p. 263-272, 2000.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Kidlington, v. 14, n. 1, p. 217-232, 2010.

McKIM, S. M.; DURNFORD, D. G. Translational regulation of light-harvesting complex expression during photo acclimation to high-light in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Issy les Moulineaux, v. 44, n. 11-12, p. 857-865, 2006.

MIAO, X.; WU, Q. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 110, n. 1, p. 85- 93, 2004.

MOLINA-GRIMA, E.; BELARBI, E. H.; ACIEN- FERNANDEZ, F. G.; ROBLES-MEDINA, A.; CHIST, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics. **Biotechnonlogy Advances**, New York, v. 20, n. 7-8, p. 491-515, 2003.

MULLER-NAVARRA, D. C. Biochemical v. s. mineral limitation in *Daphnia*. **Limnology and Oceanography**, Waco, v. 40, n. 7, p. 1209-1214, 1995.

MUNOZ, R.; GUIEYSSE, B. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. **Water Research**, London, v. 40, n. 15, p. 2799–2815, 2006.

NAYAR, S.; HEGDE, S.; RAO, P. S.; SUDHA, P. Live organisms as feed in aquaculture. **INFOFISH Internacional**, Kuala Lumpur, v. 4, p. 36-40, 1998.

NIKOLSKY, G. V. **Theory of fish population dynamics for rational exploitation and management of fishery resources**. Edinburgh: Oliver & Boyd edition, 1969. 323 p.

NUÑEZ, J. V.; VOLTOLINA, D.; NIEVES, M.; PIÑA, P.; MEDINA, A.; GUERRERO, M. Nitrogen budget in *Scenedesmus obliquus* cultures with artificial wastewater. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 78, n. 2, p. 161–164, 2001.

OLIVEIRA, H. T. Vinasse as substrate to culture *Chlorella vulgaris*. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON MICROALGAE AND AQUATIC PLANTS CULTURING, 1995, Habana, Cuba. **Anais...** [S.l.: s.n.], 1995. 40 p.

PANIANGUA, L. M. **El Tecnitatl, concentrado de algas *Spirulina* frente de proteínas comestibles del pueblo de los Aztecas**. México: [S.l.], 2003. p. 1-8.

PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. **Water Research**, London, v. 45, n. 1, p. 11-36, 2011.

PIPES, W. O.; GOTAAS, H. B. Utilization of organic matter by *Chlorella* grown in sewage. **Applied Microbiology**, Washington, DC, v. 8, n. 3, p. 163-169, 1960.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology Biotechnology**, Heidelberg, v. 65, n. 6, p. 635-648, 2004.

PUSHPARAJ, B.; PELOSI, E.; TREDICI, M.; PINZANI, E.; MATERASSI, R. An integrated culture system for outdoor production of microalgae and cyanobacteria. **Journal of Applied Phycology**, Dordrecht, v. 9, n. 2, p. 113-119, 1997.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906 p.

REYNOLDS, C. S. **The ecology of freshwater phytoplankton**. Cambridge: University Press, 1984. 384 p.

RIQUELME, C. E.; AVENDAÑO-HERRERA, R. E. Microalgae and bacteria interaction in the aquatic environment and their potential use in aquaculture. **Revista Chilena De Historia Natural**, Santiago, v. 76, n. 4, p. 725-736, 2003.

ROCHA, M. S. J.; GARCIA, J. E. C.; HENRIQUES, M. H. F. Growth aspects of the marine microalga *Nannochloiropsis gadiana*. **Biomolecular Engineering**, Amsterdam, v. 20, n. 4-6, p. 237-242, 2003.

ROCHA, O.; DUNCAN, A. The relationship between cell carbon and cell volume in freshwater algal species used in zooplanktonic studies. **Journal of Plankton Research**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 279-294, 1985.

RODELLA, R. A.; COSTA, N. V.; COSTA, L. D. N. C.; MARTINS, D. Diferenciação entre *Egeria densa* e *Egeria najas* pelos caracteres anatômicos foliares. **Planta Daninha**, Jaboticabal, v. 24, n. 2, p. 211-220, 2006.

RUYTERS, G. Effects of blue light on enzymes. In: SENGER, H. (Ed.). **Blue light effects in biological systems**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. p. 283-301.

SAHU, A.; SAHOO, S. K.; GIRI, S. S. Efficacy of water hyacinth compost in nursery ponds for larval rearing of Indian mayar carp, *Labeo rohita*. **Bioresource of Technology**, Amsterdam, v. 85, n. 1, p. 309-311, 2002.

SÁ-JUNIOR, W. P. Production of planktonic biomass for feed of alevins at the furnas hydrobiology and hatchery station. In: PINTO-COELHO, R. M.; GIANI, A.; SPERLING, E. von (Ed.). **Ecology and human impact on lake and reservoirs in Minas Gerais**. Belo Horizonte: SEGRAC, 1994. p. 133-140.

SANCHO, M. E. M.; CASTILLO, J. M. J.; EL YOUSFI, F. Influence of phosphorus concentration on the growth kinetics and stoichiometry of the microalgae *Scenedesmus obliquus*. **Process Biochemistry**, London, v. 32, n. 8, p. 657- 664, 1997.

SCARDOELI-TRUZZI, B. **Utilização de meio de cultura alternativo no estudo do crescimento da microalga *Haematococcus pluvialis* flotox em laboratório**. 2013. 78 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Tecnologia em Biocombustíveis) – Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal, Jaboticabal, 2013.

SCHENK, P. M.; THOMAS-HALL, S. R.; STEPHENS, E.; MARX, U. C.; MUSSGUNG, J. H.; POSTEN C.; KRUSE, O.; HANKAMER, B. Second generation biofuels: high- efficiency microalgae for biodiesel production. **Bioenergy Research**, New York, v. 1, n. 1, p. 20-43, 2008.

SHAMSUDIN, L. Seasonal variation of fatty acid content in natural microplankton from the tumpat Coastal Waters of the South China Sea. **Archives of Physiology and Biochemistry**, London, v. 106, n. 3, p. 253-260, 1998.

SHI, X-M.; ZHANG, X-W.; CHEN, F. Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. **Enzyme and Microbial Technology**, Philadelphia, v. 27, n. 3-5, p. 312-318, 2000.

SICKO-GOAD, L.; ANDERSEN, N. A. Effect of growth and light/dark cycles on diatom lipid and composition. **Journal of Phycology**, Hoboken, v. 27, n. 6, p. 710-718, 1991.

SILVA, F. C.; PEREIRA, A.; CANOZZI, M. B.; ARAÚJO, S. C. Cultivo de microalgas marinhas. In: POLI, C. R.; POLI, A. T. B.; ANDREATTA, E.;



BELTRAME, E. (Org.). **Aquicultura**: experiências brasileiras. Florianópolis: Multitarefa, 2004. p. 93-120.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; BACHION, M. A. Population growth and development of two species of cladocera, *Moina micrura* and *Diaphanosoma birgei*, in laboratory. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 62, n. 4A, p. 701-711, 2002.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; BARROS, A. F.; BRAGA, F. M. S. Effects of floating macrophyte cover on the water quality in fishpond. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 25, n. 1, p. 101-106, 2003.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; BRAGA, F. M. de S. Feeding activity of *Colossoma macropomum* larvae (tambaqui) in fish pond with water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) fertilizer. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 67, n. 3, p. 454-466, 2007.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; BRAGA, F. M. de S. Study of feeding habits of *Piaractus mesopotamicus* (Pacu) larvae in fish ponds. **Naga - The ICLARM Quarterly**, Penang, v. 22, n. 1, 1999.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; IBARRA, L. C.; FIORESI, T. B. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (REISCH) Korsikov (Chlorophyceae) em laboratório utilizando meio CHU12 e de macrófita com NPK. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 35, n. 1, p. 111-118, 2009.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. **Limnologia aplicada à aqüicultura**. Jaboticabal: FUNEP, 1995. 70 p.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; MILLAN, R. N.; BERCHIELLI, F. A.; BRAGA, F. M. S. Use of alternative media and different types of recipients in a laboratory culture of *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korshikov (Chlorophyceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, Maringá, v. 33, n. 3, p. 247-253, 2011.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; MILLAN, R. N.; BERCHIELLI-MORAIS, F. A effects of some parameters in upscale culture of *Haematococcus pluvialis* Flotow. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 73, n. 3, p. 585-591, 2013.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; PEREIRA, A. M. L. Large scale laboratory cultures of *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) and *Diaphanosoma birgei* Korinek (Cladocera). **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 68, n. 4, p. 875-883, 2008.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes: I- algas clorofíceas. **Biotemas**, Florianópolis, v. 6, n. 1, p. 93-106, 1993.

SIPAUBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. São Carlos: Rima, 2001. 106 p.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; ROCHA, O. Sobrevivência de larvas de *Piaractus mesopotamicus* (Holberg, 1887) (Pacu) e *Colossoma macropomum* (Curvier, 1818) (Tambaqui), cultivadas em laboratório. **Biotemas**, Florianópolis, v. 7, n. 1-2, p. 46-56, 1994.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. **Uso racional da água em aquicultura**. Jaboticabal: Maria de Lourdes Brandel, 2013. 190 p.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. Utilização de biofiltros em sistemas de cultivo de peixes. **Informe agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, p. 38-43, 2000.

SOUTO, M.; SAAVEDRA, M.; POUÇÃO-FERREIRA, P.; HERRERO, C. Riboflavin enrichment throughout the food chain from the marine microalga *Tetraselmis suecica* to the rotifer *Brachionus plicatilis* and to White Sea Bream (*Diplodus sargus*) and Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) larvae. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 283, n. 1-4, p. 128-133, 2008.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 101, n. 2, p. 87-96, 2006.

STATSOFT, INC. STATISTICA: data analysis software system. Version 8.0. São Caetano do Sul, 2007. Disponível em: <www.statsoft.com>. Acesso em: 13 maio. 2014.

STEPHENS, E.; ROSS, I. L.; KING, Z.; MUSSGUG, J. H.; KRUSE, O.; POSTEN, C.; BOROWITZKA, M.; HANKAMER, B. An economic and technical evaluation of microalgal biofuels. **Nature Biotechnology**, New York, v. 28, n. 2, p. 126-128, 2010.

UGWU, C. U.; AOYAGI, H.; UCHIYAMA, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 99, n. 10, p. 4021-4028, 2008.

UMINO, Y.; SATOH, A.; SHIRAIWA, Y. Factors controlling induction of external carbonic anhydrase and charge in K<sup>1/2</sup> (CO<sub>2</sub>) of photosynthesis in *C. vulgaris*. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 379-384, 1991.

VOLLENWEIDER, R. A. **A manual on the methods for measuring primary production in aquatic environments**. Oxford: Blackwell Scientific Publ., 1974. 225 p.

WIDJAJA, A.; CHIEN, C. C.; JU, Y. H. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, n. 1, p. 13-20, 2009.

WONG, M. H.; LAY, C. C. The comparison of soy-bean wastes, used tealeaves and sewage sludge for growing of *Chlorella pyrenoidosa*. **Environmental Pollution**, Kidlington, v. 23, n. 4, p. 247-259, 1980.

WU, Z.; SHI, X. Optimization for high-density cultivation of heterotrophic *Chlorella* based on a hybrid neural network model. **Letters in Applied Microbiology**, Chichester, v. 44, n. 1, p. 13-18, 2007.

YAMAGUCHI, H.; SAKAMOZO, S.; YAMAGUCHI, M. Nutrition and growth kinetics in nitrogen and phosphorus limited cultures of the novel real tide flagellate *Chattonella ovate* (Raphidophyceae). **Harmful Algae**, Amsterdam, v. 7, n. 1, p. 26-32, 2008.

YUSOFF, F. M.; MATIAS, H. B.; KHALID, Z. A.; PHANG, S. M. Culture of microalgae using interstitial water extracted from shrimp pond bottom sediments. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 201, n. 3-4, p. 263-270, 2001.

ZENG, X.; DANQUAH, M. K.; CHENA, X. D.; LU, Y. Microalgae bioengineering: from CO<sub>2</sub> fixation to biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Kidlington, v. 15, n. 6, p. 3252– 3260, 2011.

ZHAO, B.; ZHANG, Y.; XIONG, K.; ZHANG, Z.; HAO, X.; LIU, T. Effect of cultivation mode on microalgal growth and CO<sub>2</sub> Fixation. **Chemical Engineering Research and Design**, London, v. 89, n. 9, p. 1758-1762, 2011.