UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQÜICULTURA

CULTURA EM LARGA ESCALA DA MICROALGA *Ankistrodesmus gracilis* (REINSCH) KORSIKOV (CHLOROPHYCEAE), E DO MICROCRUSTÁCEO *Diaphanosoma birgei* (KORINECK, 1981) (CLADOCERA) EM LABORATÓRIO

Alitiene Moura Lemos Pereira

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena Sipaúba Tavares

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação do Centro de Aqüicultura da UNESP, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR em AQÜICULTURA

Jaboticabal

Estado de São Paulo - Brasil

2001

" se tiverdes fé como um grão de mostarda,
direis a este monte: passa daqui para acolá,
e este passará e nada será impossível"
Mateus 17: 20

Dedico:
Aos meus pais Nivalde e Aliete
Meus irmãos Ney e Eric

Ofereço:
A DEUS,
por todas as graças alcançadas,
hoje e sempre.

Agradecimentos

A Profa. Dra. Lúcia Helena Sipaúba Tavares, pela confiança depositada desde o início, pela oportunidade, orientação segura, principalmente pelo apoio e companheirismo durante todas as dificuldades encontradas nesta jornada.

A FAPESP pela bolsa concedida.

Aos membros da banca Dra. Odete Rocha, Dra. Maria da Graça Gama Melão, Dr. José Sávio Colares de Melo e o Dr. José Augusto Senhorini, pelas contribuições para este trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Pinheiro e a Profa. Dra. Maria Inez E. Geraldo Martins pelas valiosas sugestões.

Ao Prof. Dr. Jaime Maia dos Santos pela ajuda com a captura de imagens.

Ao Dr. Jaime Fábregas pelo chitosan e ajuda na revisão bibliográfica.

A todos professores do Centro de Aqüicultura por todo conhecimento compartilhado.

A todos funcionários do Centro de Aqüicultura, por tornar o ambiente de trabalho mais agradável.

À Silvinha, pela ajuda com as análises químicas e por tornar mais alegres as horas de laboratório.

A Waldeci e Roberto pelas idéias e ajuda na montagem do laboratório.

A Veralice e Fieno por todo apoio que excedeu a obrigação.

À Adriana Munhoz e Juliana Schober pela amizade e ajuda no experimento.

A Atomo, pela inestimável ajuda na condução do experimento.

As amigas Sandrinha, Rossineide, Joceli, Elisa e Lícia, pela amizade sincera, confiança e apoio incondicional desde o início do Curso.

À minha inesquecível turma 97: Atanásio, Ana Elisa, Afonso, Célia, Carlo, Deusimar, Josiane, Marcello Boock, Marcelo Pedreira, Mariana Petric, Moniquinha, Redelvin, Rose, Sérgio Ostini, pela amizade, carinho e por fazer com que me sentisse sempre em "casa".

Aos amigos Lígia, Japinha, Luíza, Flávio, Adriana Saccioto, Mariana, Karina, Gaúcho, Rodrigão e Twin pela amizade e sorrisos.

As amigas e companheiras de laboratório Rachel, Cíntia e Carlinha.

A Alfredo Olivera, por todo apoio, incentivo e ajuda desde o início do curso.

A Juliana Castilho pela ajuda na eterna luta entro o homem e o computador.

À família Galdenucci, em especial Joanalice, pela aceitação de uma "estrangeira" em Jaboticabal.

Aos meus pais Aliete e Nivalde, meus irmãos Ney e Eric e minha cunhada Telma pelo apoio incondicional durante todo o curso.

Sumário

Página

Revisão bibliográfica 9

Considerações gerais sobre a importância do plâncton natural na alimentação de peixes 9

Importância nutricional do alimento vivo 14

As espécies planctônicas estudadas 17

Fitoplâncton 17

Zooplâncton 18

Aspectos econômicos da cultura em larga escala em laboratório 21

Referências bibliográficas 25

Justificativa do estudo realizado 36

Objetivos gerais 37

Objetivos específicos 37

Capítulo 1- Metodologia e instalações empregadas na adequação do Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton para cultura em larga escala de *Ankistrodesmus gracilis* e *Diaphanosoma birgei* 38

Instalações do Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton 39

Sistemas de abastecimento: água, alga e ar 39

Sistema de iluminação 42

Assepsia empregada na cultura 44

Metodologia de cultivo: *Ankistrodesmus gracilis* 48

Metodologia de criação: *Diaphanosoma birgei* 39

Capítulo 2- Cultura em larga escala e análise da composição bioquímica da Chlorophyceae *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korsikov, e do Cladocera *Diaphanosoma birgei* (Korineck, 1981) em laboratório 50

Resumo 51

Abstract 52

Introdução 53

Material e métodos 54

Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* 54

Coleta e criação de *Diaphanosoma birgei* 55

Curva de crescimento e tempo de produção 56

Velocidade de crescimento e tempo de duplicação para

Ankistrodesmus gracilis 56
Taxa intrínseca de aumento e tamanho de *D. birgei* 57
Composição bioquímica 57
Análise estatística 58
Resultados 58
Crescimento de *Ankistrodesmus gracilis* 58
Criação e crescimento de *Diaphanosoma birgei* 62
Composição bioquímica 65
Discussão 66
Crescimento 66
Composição bioquímica 68
Referências bibliográficas 71
Capítulo 3- Aspectos econômicos da cultura em larga escala da Chlorophyceae *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korsikov, e do Cladocera *Diaphanosoma birgei* (Korineck, 1981) em laboratório 75
Resumo 76
Abstract 76
Introdução 77
Material e métodos 78
Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* 78
Separação da alga no meio de cultura 78
Criação de *Diaphanosoma birgei* 80
Peso seco de *Diaphanosoma birgei* 80
Análise econômica 80
Resultados 81
Cultura de *Ankistrodesmus gracilis* e *Diaphanosoma birgei* 81
Análise econômica 82
Discussão 83
Cultura de *Ankistrodesmus gracilis* e *Diaphanosoma birgei* 83
Análise econômica 85
Referências bibliográficas 88
Conclusões 91
Sugestões para trabalhos futuros 92

Apresentação

Esse trabalho foi organizado em forma de capítulos, segundo recomendação das normas do Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura da UNESP, Centro de Aquicultura.

Apresenta, inicialmente, uma revisão bibliográfica, além da justificativa e os objetivos propostos neste estudo.

O Capítulo 1 aborda a metodologia empregada no experimento, bem como as adaptações ocorridas nas instalações do Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton, ao longo do trabalho, indispensáveis a sua execução.

Os Capítulos 2 e 3 encontram-se sob a forma de artigo científico. O Capítulo 2 trata da cultura, crescimento e composição bioquímica da microalga *Ankistrodesmus gracilis* e do microcrustáceo *Diaphanosoma birgei.* Enquanto, o Capítulo 3 apresenta o custo operacional e o rendimento da produção em laboratório das espécies planctônicas citadas no capítulo anterior.

Os formatos das referências e dos artigos estão de acordo com as normas da revista Acta Scientiarum.

Revisão Bibliográfica

Considerações gerais sobre a importância do plâncton natural na alimentação de peixes

A disponibilidade de larvas e alevinos, em quantidade e com qualidade, é ainda um fator crítico para o sucesso da produção intensiva de peixes. Assim sendo, o investimento em pesquisas na área de larvicultura apresenta-se como a única alternativa para o desenvolvimento de técnicas que possibilitem a obtenção de melhores taxas de sobrevivência e de crescimento destes jovens organismos (Portella, 1995).

Uma das principais dificuldades na produção de alevinos é a alimentação das larvas. O pré-requisito importante para uma eficiente produção de alevinos é a disponibilidade de microrganismos em quantidade e qualidade para atender a demanda nos momentos de pico de produção das larvas (Geiger, 1983).

Em algumas espécies de peixes, as larvas nascem com grandes reservas vitelínicas, o que lhes assegura o tempo necessário para o desenvolvimento de estruturas digestivas, capacitando-as, inclusive, para assimilar dietas artificiais. No entanto, a maioria das espécies potencialmente viáveis para a aqüicultura possui reservas vitelínicas escassas, órgãos digestivos incompletos e um período de transição para nutrição exógena bastante reduzida, diminuindo as probabilidades de sobrevivência (Sorgeloos *et al.*, 1991).

Peixes com alimentação inicial deficiente têm elevada mortalidade (Tacon, 1993) e poderão sofrer posteriormente com desempenhos inferiores de crescimento(Lim & Wong, 1997). Assim, a qualidade e a quantidade do alimento ingerido por um peixe determina a sua taxa de crescimento, o tempo de maturidade sexual e, conseqüentemente, o tempo de vida (Nikolsky, 1963).

Nos primeiros dias de vida destes organismos, a qualidade e a quantidade de alimentos adequados é de grande importância. Quando as larvas iniciam sua alimentação exógena, ingerem alimentos vivos como algas unicelulares, Rotifera, Copepoda e Cladocera, dentre outros organismos do plâncton (Landa, 1998).

Nesta etapa, a disponibilidade de organismos zooplanctônicos no ambiente aquático é fundamental, pois estes passam a ser a principal fonte de substâncias necessárias ao desenvolvimento larval, tais como proteínas, aminoácidos livres, enzimas, ácidos graxos essenciais, dentre outros (Portella, 1995).

No processo de alimentação de peixes, cabe ressaltar as diferenças biológicas e comportamentais entre os grupos zooplanctônicos as quais influenciam a seleção alimentar das larvas, verificando-se que a disponibilidade de uma presa para um determinado predador é resultante de um somatório de processos fisiológicos e comportamentais apresentados por ambos. (Sipaúba-Tavares *et al.*, 1994)

Os estudos de alimentação que envolve a disponibilidade e preferência alimentar norteiam aspectos imprescindíveis para a utilização do alimento natural e a busca de uma cultura mais eficiente, principalmente para espécies neotropicais, bastantes desconhecidas neste aspecto (Fonseca, 1999).

As larvas e pós-larvas de peixes são consumidores importantes em ecossistemas aquáticos; embora, pouco seja conhecido a respeito do seu hábito alimentar, de suas exigências nutricionais, bem como das estimativas de seu consumo diário. Os componentes nutricionais da dieta dependem da demanda nutricional e da capacidade metabólica específica da larva (Watanabe & Kiron, 1994)

Estudos na comunidade planctônica podem ser extremamente importantes, não somente pela rapidez de informações, uma vez que esses organismos apresentam ciclo de vida curto e acelerada taxa de crescimento, mas também porque desempenham papel fundamental na transferência de energia dentro da rede trófica, servindo como via de fluxo energético entre os produtores primários e os consumidores. Deve-se considerar ainda que o zooplâncton faz parte da dieta alimentar dos peixes em pelo menos uma parte do seu ciclo de vida, o que justifica uma melhor compreensão de sua dinâmica populacional (Pereira, 1998).

O plâncton constitui a unidade básica de produção de matéria orgânica nos ecossistemas aquáticos. Na presença de nutrientes adequados e suficientes, os componentes vegetais do plâncton são capazes de acumular energia luminosa sob a forma de compostos químicos energéticos através da fotossíntese. O oxigênio gerado neste processo representa uma parte substancial do que é consumido pelos organismos aquáticos na respiração. As zonas de maior abundância em pescado são aquelas onde o plâncton é abundante, uma vez que o mesmo é essencial para a dieta de muitos peixes (Infante, 1988).

O fitoplâncton constitui a base da estrutura trófica dos lagos e o zooplâncton nutre-se das mais variadas partículas de alimento, servindo, por sua vez, como presa para outras espécies carnívoras, tanto invertebrados como vertebrados. Os invertebrados predadores exercem, às vezes, um profundo efeito sobre a estrutura da

comunidade do zooplâncton, porém o impacto dos vertebrados, em especial os peixes, é de maior significado. Nas etapas iniciais de desenvolvimento e, às vezes, durante toda a vida, os peixes alimentam-se do zooplâncton. O tamanho da presa a ser capturada aumenta à medida que o predador aumenta de tamanho (Infante, 1988).

Nos estágios mais jovens, as pós-larvas de peixe consomem indivíduos de pequeno porte, tais como protozoários, rotíferos e larvas de Copepoda. Em poucos dias, os alevinos passam a consumir organismos maiores, dando preferência a microcrustáceos, principalmente Cladocera. Mais tarde, passarão a alimentar-se de Copepoda ou mesmo de larvas de insetos, dependendo da espécie considerada. Desta forma, a obtenção de zooplâncton em abundância e de boa qualidade nutricional, é um requisito básico em qualquer projeto de piscicultura (Pinto-Coelho *et al.*, 1997), objetivando melhorar as técnicas empregadas de modo a garantir uma melhor produção.

Barbosa *et al.* (1996) verificaram que, em estudos de alimentação de pós-larvas e alevinos de piapara, *Leporinus elongatus,* criados em laboratório e em tanques de piscicultura, que os Crustacea contribuíram com mais de 70% dos itens ingeridos, sendo que os Cladocera constituíram com quase 100% do alimento destas larvas, após 21 dias de vida.

Sipaúba-Tavares (1993), estudando a seletividade alimentar de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e de tambacu (híbrido *Colossoma macropomum* x *Piaractus mesopotamicus*) constatou que, embora alguns itens alimentares tenham sido selecionados preferencialmente (Cladocera, seguido de Rotifera). As larvas de ambas as espécies apresentaram caráter oportunista, com a disponibilidade influenciando a seletividade.

Fregadolli (1990) afirmou que os grupos de organismos de pequeno porte, tais como Cladocera, são preferidos pelas larvas de peixes em comparação com os grupos de maior tamanho, tais como os Copepoda. A preferência em questão deve-se também ao mecanismo de locomoção, que nos Copepoda é mais eficiente, facilitando a fuga.

A resposta numérica entre consumidor e recurso está relacionada com a eficiência de predação, capacidade de refúgio da presa, saciação do predador, conversão da biomassa da presa pelo predador e heterogeneidade ambiental (Sterner, 1993)

A seleção de presas por larvas de peixes é afetada por um grande número de fatores relacionados às características da larva e da presa. Estes fatores incluem

acuidade visual, limite visual e sensibilidade espectral, contraste de presa, forma, mobilidade, concentração e presença de estimulantes químicos (Cunha & Planas, 1999)

A melhor opção para a nutrição inicial de larvas é o alimento vivo, devido ao conteúdo de ácidos graxos essenciais (Watanabe *et al.*, 1983). Nesse período larval, a utilização de microrganismos se impõe, tanto para aumentar a taxa de sobrevivência como para reduzir o custo da alimentação das formas juvenis (Rothbard, 1979).

A produção de plâncton vem sendo realizada em diversas estações de piscicultura do país pela adição de fertilizantes ou adubo orgânico em tanques, as quais visam estimular o desenvolvimento do plâncton (Silva *et al.*, 1983; Grieko-Reis *et al.* 1986; Santeiro & Pinto-Coelho, 2000). As larvas de peixes e os alevinos são liberados em tanques adubados, pouco tempo depois do início de sua alimentação exógena.

Estes sistemas apresentam problemas, uma vez que o controle da qualidade das espécies forrageiras em tanques externos para alimentar as larvas é mínimo (Moriarty, 1997). Além disso, pode existir variação na quantidade e qualidade do alimento por alterações climáticas (Sipaúba-Tavares, 1988).

Em lagos tropicais, a abundância de zooplâncton pode ser afetada pela flutuação do nível da água, alterando as características físicas e químicas da água, provocando mudanças ocasionais e de curta duração, tais como variações bruscas de temperatura, variações diárias na concentração de oxigênio dissolvido, dentre outros (Melo, 1998).

A temperatura e a disponibilidade de alimento são consideradas por vários autores como os mais importantes fatores que controlam a abundância do zooplâncton em um lago, tendo ambas um papel importante no ritmo reprodutivo das populações zooplanctônicas (Seixas, 1981).

Organismos vivos, em ambientes naturais, são ricos em vitaminas e minerais, podendo em ambientes artificiais, serem enriquecidos pela incorporação de nutrientes como vitaminas, aminoácidos, ácidos graxos essenciais e minerais; assim esses elementos poderão ser transferidos via cadeia alimentar para os consumidores finais (Nayar *et al.*, 1998).

Dada a escassez de informações relativas às exigências nutricionais das larvas de peixes sul-americanos, tornam-se necessárias pesquisas que investiguem os alimentos mais utilizados (Portella, 1995).

As dietas artificiais para a alimentação de organismos aquáticos, apesar de muito empregadas, não suprem as necessidades nutricionais dos organismos, sendo, por isso, geralmente associadas com alimento vivo. Uma dieta adequada é geralmente específica, atendendo as exigências de uma espécie ou um grupo restrito, significando anos de pesquisas e recursos financeiros empregados para sua elaboração.

Dabrowsky (1984) afirmou que não seria fácil estimar as exigências nutricionais para as larvas e juvenis de peixes pelos métodos e procedimentos tradicionais, utilizando-se dietas padrão ou semipurificadas, as quais, geralmente, não dão suporte ao crescimento de diversas espécies de peixes. Por serem organismos muito diferentes do peixe adulto e estarem em contínua transformação - tanto nos processos de digestão e absorção como no transporte e assimilação de compostos químicos - o referido autor acha provável que as exigências nutricionais também sofram modificações; daí a dificuldade para formulação de dietas que satisfaçam suas necessidades.

Além do seu uso na alimentação, o plâncton poderia ser utilizado como o controle do tratamento de resíduos, uma vez que algas são capazes de transformar resíduos em biomassa de alto valor biológico (Nascimento, 1994).

O plâncton pode ser utilizado de maneira direta através de cultura em larga escala de algas planctônicas ou semiplanctônicas como *Spirulina*, *Chlorella* e outras, que têm sido utilizadas na alimentação humana e em aqüicultura (Infante, 1988).

A cultura monoespecífica de microrganismos vegetais e animais em larga escala abriu novas e amplas perspectivas para a alimentação de larvas de espécies marinhas e de água doce. Para tanto, pesquisas em todo mundo têm sido realizadas principalmente com o crustáceo *Artemia* e com o Rotifera *Brachionus plicatilis* ambos de ambiente marinho, procurando ao mesmo tempo diminuir custos de produção, estudar novas formas de administração e, principalmente, de complementar a composição bioquímica desses organismos para atender as exigências nutricionais das larvas de peixes (Portella, 1995).

Pouco tem sido feito em relação à cultura em larga escala de espécies fitoplanctônicas e zooplanctônicas nativas, necessitando, portanto mais estudos e trabalhos que evidenciem sua importância como alimento natural na larvicultura (Sipaúba-Tavares, 1988).

Importância nutricional do alimento vivo

A partir da segunda metade da década de 80, novos enfoques têm direcionado as linhas de pesquisa dentro dos estudos de composição bioquímica do plâncton. Atualmente há um interesse voltado para a ficologia aplicada, principalmente em áreas como aqüicultura e na determinação da qualidade nutricional de alimentos algais para animais em cativeiro (Sicko-Goad & Andersen, 1991; Sipaúba-Tavares & Rocha, 1993; Hardy & Castro, 2000).

Um alimento adequado deve apresentar algumas características tais como: qualidade física (pureza, disponibilidade, aceitabilidade), indicadores nutricionais (digestibilidade, nutrientes, energia), facilidade de obtenção, reprodução rápida e baixo custo de produção (Watanabe & Kiron, 1994; Lagler *et al.*, 1997; Macedo, 1999).

Fontes de alimento vivo são essenciais, tanto para organismos marinhos quanto dulcícolas, especialmente durante a fase larval, apesar da existência de várias misturas de alimentos secos artificiais (Isik *et al.*, 1999).

Experimentos realizados sobre o papel das algas na nutrição de larvas de peixes e alevinos forneceram informações importantes relativas aos aspectos qualitativos e quantitativos da alimentação (Sipaúba-Tavares, 1988).

Segundo Gerking (1994), as larvas de peixes, em termos de alimentação, podem ser consideradas como "espécies separadas" de suas formas adultas, em função do pequeno porte e pouco desenvolvimento do tubo digestivo, a alimentação pode ser muito diferente daquelas que as espécies praticam durante a vida adulta. Este autor afirma que a grande disparidade entre as larvas e as formas adultas, tanto em termos morfológicos quanto fisiológicos, implica em hábitos alimentares diferentes. Segundo o mesmo autor, as larvas da maioria das espécies são planctófagas, principalmente zooplanctófagas, mesmo aquelas cujos adultos são herbívoros.

Dabrowsky (1991) propõe três fatores para explicar as diferenças morfológicas e enzimáticas que ocorrem durante a fase de alimentação exógena em larvas de peixes. Denominadas de fatores externo, central e local estariam relacionados, respectivamente, com a ingestão de organismos vivos, com os mecanismos endócrinos e com a secreção de enzimas pancreáticas pelas próprias larvas.

Apesar de haver evidência de que as larvas possam apresentar alguma atividade enzimática já nos primeiros dias de vida, pesquisadores acreditam que enzimas exógenas, contidas no zooplâncton, podem contribuir significativamente no processo digestivo, quando do início da alimentação exógena (Dabrowsky, 1984, 1991;

Lauff & Hofer, 1984;), tanto por contribuição direta como por estimulação dos grânulos de zimogênio das larvas.

Dada a posição ocupada pelo fitoplâncton na cadeia trófica, são de grande importância as pesquisas que têm como objetivo desenvolver técnicas para o cultivo em massa de algas utilizadas na alimentação direta das larvas ou indiretamente, através da alimentação de diversas espécies de zooplâncton que, por sua vez, constituirão o alimento natural de peixes, possibilitando a transferência dos nutrientes das algas (vitaminas e ácidos graxos) para um nível trófico superior (Sipaúba-Tavares & Rocha, 1993; Brown *et al.*, 1997).

Existem diversas espécies de algas que são possuem tecnologia de cultivo amplamente difundida, apresentando diferentes características de conteúdo nutricional. Para a cultura de organismos de água doce, existe uma carência de tecnologia de produção de fitoplâncton e zooplâncton em larga escala, porém foram realizados estudos com enfoque na produção em pequena escala (Sipaúba-Tavares, 1988; Sipaúba-Tavares & Rocha, 1993; Sipaúba-Tavares *et al.*, 1994; Sipaúba-Tavares *et al.*, 1999; Hardy & Castro, 2000; Macedo & Pinto-Coelho, 2000a,b).

O cultivo de microalgas em laboratório, para obtenção de uma dieta definida, é bastante adequado, pois as células em crescimento exponencial possuem alta qualidade nutricional (Sipaúba-Tavares & Rocha, 1993), agindo também como agente probiótico que afeta positivamente o desenvolvimento dos organismos aquáticos (Kay, 1991).

Experimentos substituindo farinha de peixe por algas demonstraram que a carpa comum e a cabeça grande apresentaram um rendimento maior que o controle (farinha de peixe), enquanto o da tilápia e da carpa prateada foram semelhantes ao controle (Venkataraman & Becker, 1985)

Brown *et al.* (1989, 1997) afirmaram que, durante a fase de crescimento, as algas apresentam variação na composição bioquímica e, na fase estacionária, o nível de carboidratos e de lipídeos é alto, porém, com baixo nível de proteína devido à limitação de nitrogênio.

Dentre as diversas espécies de algas, as Chlorophyceae unicelulares são geralmente selecionadas para cultivo em massa com a finalidade de utilização como alimento para organismos zooplanctônicos, principalmente por apresentarem parede celular mais fina e, portanto, uma quantidade de carbono orgânico total em relação ao peso seco, mais elevado do que as diatomáceas (Sipaúba-Tavares & Rocha, 1993).

Existe um interesse especial nos efeitos específicos da qualidade da alga usada como alimento. Trabalhos prévios demonstraram que a condição fisiológica da alga é um fator crítico que influencia a ingestão, a fecundidade e as taxas de crescimento populacional de zooplâncton herbívoro (Kilhan *et al.*, 1997).

O conhecimento das características físicas e químicas das algas é de interesse para o estudo de zooplâncton filtrador já que o alimento presente em águas naturais é o fitoplâncton (Rocha & Duncan, 1985). Além disso, pesquisas sobre os elementos inorgânicos que compõem as algas são importantes para investigações sobre biogeografia, fisiologia da alga e aplicações das algas na indústria química, nutrição e farmacêutica (Hou & Yan, 1998).

Em sistemas de água doce, o conhecimento da composição do alimento natural pode fornecer informações sobre as interações competitivas entre as espécies (Kerfoot *et al.*, 1985)

O cultivo de fitoplâncton com alguma limitação de nutriente ou exposição a radiação UV afeta a morfologia da célula de algumas espécies, podendo afetar também a digestibilidade do fitoplâncton pelo zooplâncton (Gulati & Demott, 1997). Células cultivadas com restrição de nitrogênio apresentam níveis inferiores de proteína e com restrição de fósforo possuem níveis mais elevados de carboidrato e lipídeos que aquelas sem nenhum tipo de restrição (Kilhan *et al.*, 1997).

O zooplâncton é uma fonte valiosa de proteínas, aminoácidos, lipídeos, ácidos graxos, minerais e enzimas, sendo um substituto de baixo custo para a farinha de peixe e *Artemia* (Kibria *et al.*, 1997).

Poucos estudos têm enfatizado a composição bioquímica do zooplâncton, principalmente de água doce, sendo vital para avaliar o valor nutricional das espécies e sua adequação como alimento na aqüicultura (Watanabe *et al.*, 1983; Kibria *et al.*, 1997).

A *Artemia* é o alimento mais comum, porém outros organismos têm sido utilizados com sucesso. Trutas por exemplo, apresentou ótima taxa de eficiência protéica quando alimentada com *Daphnia* e *Moina* (Watanabe *et al.*, 1983), arenques e trutas assimilaram mais de 90% da matéria seca quando alimentadas com copépodos congelados (Sargent *et al.*, 1979).

Santeiro (2001), comparando o valor nutricional de Rotifera com os Cladocera e Copepoda em tanques externos de cultura de plâncton, verificou que estes últimos foram superiores aos primeiros.

O zooplâncton também tem propriedades que auxiliam sua absorção. Hasler (1938) afirmou que Cladoceros, em especial *Daphnia*, possuem 200 vezes mais protease por grama de peso do corpo que a carne de porco.

Existe uma grande necessidade de estudos mais detalhados sobre organismos zooplanctônicos tropicais, alimentados com alga de origem conhecida com alto valor nutricional para incrementar significativamente o valor nutricional desses animais como alimento para larvas de peixes e alevinos (Macedo & Pinto-Coelho, 2000a).

A composição bioquímica do zooplâncton pode variar com as estações do ano e com os níveis de nutrientes na água, como também entre as espécies. *Moina* sp, por exemplo, apresenta 67,5% de proteína; 14,6% de fibra bruta; 20,7% de carboidrato e 6,8% de cinzas. Já *Daphnia* sp. contém 63,3% de proteína; 14,2% de fibra bruta; 14,2% de carboidrato e 12,7% de cinzas (Kibria *et al.*, 1997; Fábregas *et al.*, 1998). Peña *et al.* (1998) afirmou que o teor de proteína encontrado para *Diaphanosoma celebensis* foi de 55,1%.

O alimento também pode influenciar na composição bioquímica do zooplâncton. Experimentos realizados com *Daphnia magna* e *D. cucullata* revelaram que, ao serem alimentadas com algas coloniais e unicelulares, essas espécies não apresentaram diferenças quanto ao nível protéico, carboidratos ou lipídeos, porém, um aumento do conteúdo de ácidos graxos pode ser observado naquelas alimentadas com algas coloniais (Lürling *et al.*, 1997). Já *Diaphanosoma birgei*, quando alimentado com a clorofícea *Ankistrodesmus gracilis* apresentaram alto valor nutricional quando o alimento era acrescido de vitamina e ração (Sipaúba-Tavares & Bachion, 2001).

As espécies planctônicas estudadas

Fitoplâncton

As Chlorophyta são o maior e mais variado filo de algas, caracterizadas pela coloração verde atribuída aos pigmentos predominantes clorofila a e b, embora contenham outros pigmentos como: carotenóides α, β e γ e diversas xantofilas. São as que mais se assemelham às plantas superiores, baseando-se nos pigmentos fotossintéticos, estocagem de amido e organização estrutural dos cloroplastos. Possuem vida livre ou colonial, com flagelos temporários ou ausentes (Happey-Wood, 1988).

As colônias às vezes estão envolvidas por mucilagem e o modo de união das colônias é característica das espécies, facilitando sua identificação; são encontradas

em todos os corpos de água de água doce, ainda que em pequeno número (Happey-Wood, 1988; Infante, 1988)

A alga *Ankistrodesmus gracilis* (Figura 1) pertence à divisão Chlorophyta, ordem Chlorococcales, família Oocystaceae e caracteriza-se por ser unicelular, imóvel e não produzir zoósporos. Esta espécie apresenta célula alongada e pontiaguda em ambos os pólos (Bold & Wynne, 1985). É característica de ambientes eutróficos (Happey-Wood, 1988) e é comum em água e solo, crescendo abundantemente e podendo originar “bloons” ou florescimento, às vezes agregando-se em pequenos grupos (Bold & Wynne, 1985).

A Chlorophyceae *Ankistrodesmus gracilis* tem sido utilizada com bons resultados como alimento para zooplâncton e larvas de peixes. Experimentos demonstraram que esta alga atinge fase exponencial de crescimento ao redor do 8º dia de cultivo, com a concentração de 4,0 x 10^6 células.mL^{-1} (Sipaúba-Tavares, 1988; Sipaúba-Tavares & Rocha, 1993; Bachion, 1996; Sipaúba-Tavares *et al.*, 1999, Hardy & Castro, 2000).

Tavares & Matsumura-Tundisi (1984) verificaram alta taxa de filtração e assimilação de *A. gracilis* pelo Copepoda *Argyrodiaptomus furcatus.* Cowgill *et al.* (1985), utilizando *Ankistrodesmus convolutus* na alimentação de *Ceriodaphnia dubia affinis*, verificaram uma maior taxa reprodutiva comparada a outros 16 tipos de alga. A produção de ovos de *Moina micrura* também foi maior com *A. gracilis* num estudo realizado por Macedo & Pinto Coelho (2000b).

Zooplâncton

O zooplâncton, devido à sua posição intermediária entre os autótrofos (fitoplâncton) e outros heterótrofos (peixes e outros carnívoros), representa um importante elo na cadeia alimentar dos ecossistemas aquáticos (Telvin & Burgis, 1979; Gulati, 1982; Sipaúba-Tavares, 1988; Hardy & Castro, 2000). A importância desses organismos nos diferentes ecossistemas aquáticos é evidenciada por sua ocorrência quase universal nos corpos de águas naturais. O zooplâncton de água doce é predominantemente constituído por Protista, Rotifera e Crustacea, sendo que este último grupo é principalmente representado pelos Copepoda e Cladocera. A diversidade de espécies e a abundância de cada um destes grupos variam grandemente entre os diferentes corpos de água e dependem de um complexo de fatores físicos, químicos e bióticos (Rocha & Sipaúba-Tavares, 1994).

A ordem Cladocera pertencente à subclasse Branchiopoda é um grupo predominante de água doce, com poucas espécies marinhas. Caracterizam-se por uma carapaça quitinosa que cobre e protege a cabeça e o corpo. O corpo é bastante transparente, não apresenta segmentação evidente e seu tamanho varia de 200 a 3000 μm, possuindo na cabeça um olho grande, composto e móvel (Infante, 1988).

Os Cladocera apresentam reprodução partenogenética (assexuada) ou sexual, com ciclos de vida curtos. Em geral, podem ser criados em laboratório, desde que as condições físicas e químicas estejam dentro dos limites de tolerância de cada espécie e o alimento seja adequado (Rocha & Sipaúba-Tavares, 1994).

A reprodução ocorre durante a maior parte do ano por partenogênese. As fêmeas produzem de um a quarenta ovos, os quais se desenvolvem até alcançar as formas juvenis, semelhantes ao adulto quando são liberadas (Infante, 1988).

Situações ainda não bem compreendidas, relacionadas às condições ambientais, induzem o aparecimento de machos e ocorre, então, a fecundação dos ovos. Os ovos fecundados são grandes e apenas um ou dois são produzidos. As paredes da câmara de incubação transformam-se em uma cápsula protetora (efípio), desaparecendo na muda seguinte. O efípio pode suportar longos períodos em altas temperaturas ou secas, facilitando a dispersão da espécie (Barnes, 1984; Infante, 1988).

Pereira (1998) afirmou que o crescimento das populações de Cladocera era influenciado pela fecundidade dos indivíduos e esta relacionada diretamente com a temperatura da água, quantidade e qualidade do alimento.

Os Cladocera nadam por meio de suas antenas, com movimento quase sempre vertical, rápido e aos saltos; são filtradores alimentando-se de plâncton ou detritos (Barnes, 1984). Constituem-se itens alimentares indispensáveis na dieta de diferentes espécies de peixes porque constituem presa de fácil captura nos estágios em que a predação é eminentemente visual, sendo o tamanho, forma e movimento desses organismos característica fundamentais, determinando a pressão de predação exercida pelos peixes sobre esses organismos (Zaret, 1980; Infante, 1988).

Os Cladocera apresentam taxa de filtração mais elevadas do que os Copepoda, tornando-se abundantes quando, além de pequenas algas, outras fontes de alimento como bactérias e detritos se encontram disponíveis (Colus, 1995).

1

2

Figura 1- Chlorophyta *Ankistrodesmus gracilis* (100X) (1) e Cladocera *Diaphanosoma birgei* (50X) (2).

O *Diaphanosoma birgei* (Figura 1), espécie comumente presente em muitos lagos e reservatórios do Brasil (Matsumura-Tundisi, 1984), em um estudo realizado por Fonseca (1999) foi a espécie dominante em viveiros de piscicultura em Volta Grande, Minas Gerais.

Pereira (1998), trabalhando em viveiros de piscicultura, verificou que as espécies de Cladocera mais abundantes foram *Moina micrura*, *Bosmina hagmani* e *Diaphanosoma birgei*, porém esta última espécie foi dominante quando os viveiros apresentavam reduzidas concentrações de oxigênio dissolvido, altos valores de concentrações de fósforo e fluxo de água elevado.

O *Diaphanosoma birgei* está presente praticamente durante todo o ano nos viveiros de piscicultura e carcinicultura do Centro de Aqüicultura-UNESP (Jaboticabal - SP)(Bachion & Sipaúba-Tavares, 1993; Sipaúba-Tavares & Colus, 1997). Resiste ao manejo envolvido na criação (Bachion, 1996) e é selecionado positivamente como alimento pelas larvas de peixes (Sipaúba-Tavares, 1993; Sipaúba-Tavares & Bachion, 1995; Sipaúba-Tavares & Braga, 1999).

O conhecimento dos vários aspectos da biologia dos organismos zooplanctônicos, suas preferências alimentares, taxas de crescimento populacional e condições adequadas à criação em larga escala são abordagens imprescindíveis que precedem, indiscutivelmente, os trabalhos de criação de peixes em que o plâncton é utilizado como alimento natural (Sipaúba-Tavares, 1988).

Aspectos econômicos do cultivo em larga escala em laboratório

As algas constituem o componente mais importante do alimento natural de organismos planctônicos e herbívoros filtradores, principalmente Cladocera, ocupando a posição central na cadeia alimentar (Hardy & Castro, 2000). Além de servir como alimento na aqüicultura, as algas tornaram-se o objeto de estudo devido à capacidade de produzir substâncias de interesse científico e econômico tais como, substâncias que podem ser usadas na fabricação de cosméticos, como aditivo em alimentos e na indústria farmacêutica (Borowitza & Borowitza, 1989).

Embora a tendência atual seja o uso de alimentos artificiais em aqüicultura, para muitos organismos o alimento natural ainda é vital. Neste caso, nas larviculturas são produzidas não apenas algas como também zooplâncton para o consumo de larvas de peixes, camarões e moluscos (Muller-Fuega, 2000).

Dados que evidenciem a importância relativa dos diversos fatores que identifiquem o custo da produção do alimento vivo para a criação de larvas aquáticas são escassos não sendo avaliados individualmente, e as informações ainda são restritas. Além disso, os custos são variáveis em função de cada instalação de produção, localização geográfica, suprimentos entre outros (Coutteau & Sorgeloos, 1992; Votolina *et al.*, 1998).

Embora pesquisas visando a produção de algas de água doce em larga escala tenham sido realizadas no Brasil (Tanji et al, 1983; Sipaúba-Tavares & Rocha, 1993), em nenhuma delas foi feito um estudo sobre a viabilidade econômica da produção em larga escala, persistindo a dúvida quanto sobre a viabilidade técnica e econômica do processo.

O sucesso na produção de plâncton em larga escala depende de muitos fatores, sendo um deles o custo efetivo para instalação e implementação do sistema sendo este ainda um processo gradual, necessitando de pesquisas de mercado. O primeiro passo para seleção da produção comercial de uma espécie de alga é a análise de mercado, avaliando-se o preço dos insumos, o tamanho e o crescimento do mesmo, determinando-se a existência de competidores de outra origem que possam concorrer com este produto (Borowitza, 1992; 1999).

Apesar de a produção de algas ser, em alguns casos, uma atividade vital para a produção de formas aquáticas juvenis e adultas, não resta dúvida que é também onerosa. Pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de reduzir os custos de produção através da substituição do uso de meios de cultivo padrão, substituindo-se os reagentes químicos puros por fertilizantes comerciais mais baratos ou por outras fontes alternativas (Portella,1985).

A biotecnologia de algas fez os maiores avanços nas últimas décadas e diversas algas e produtos oriundos das mesmas são produzidos comercialmente. Por exemplo, as algas *Chlorella, Dunaliella* e *Spirulina*, que são espécies cultivadas como alimento para organismos aquáticos, utilizadas na extração de produtos químicos de alto valor monetário e também para tratamento de efluentes (Borowitza, 1992).

As algas são uma fonte de alimento rapidamente renovável e produzem mais biomassa que qualquer outro produtor primário por unidade de tempo. A produção de trigo (300 kg/matéria seca/ha/ano) quando comparada à produção da alga Chlorophyceae *Chlorella sp* (15.700 kg/matéria seca/ha/ano) apresenta valores bem inferiores para uma mesma unidade de tempo (Kay, 1991).

Até o presente momento, a utilização de microalgas como alimento em aqüicultura tem aplicação limitada (Benemann, 1992), prevalecendo o cultivo em pequena escala, em laboratório. Grande parte da responsabilidade por essa limitação deve-se ao alto custo de produção, podendo chegar a US$ 1.000,00.kg^{-1} (peso seco), ou pelas dificuldades de manutenção da cultura em boas condições por algum tempo, ou seja, sem contaminações e risco de queda de produção.

A alga pode ser oferecida como alimento junto com o meio na qual foi cultivada (líquida), neste caso significando grandes volumes e podendo sofrer contaminação por bactérias e redução na qualidade do produto; ou pode ser oferecida na forma concentrada em pasta, reduzindo essa via de contaminação (Esquivel & Votolina, 1996).

O sucesso de uma produção de algas em larga escala, depende também do custo resultante da técnica utilizada para a separação da biomassa (Soeder, 1981). Esta técnica revela-se uma das maiores dificuldades, pois a maioria das algas tem densidade apenas levemente superior à do meio, tamanho reduzido e baixa taxa de sedimentação. Vários métodos para separação de algas foram testados, porém alguns problemas ocorrem em relação aos processos propostos, como toxicidade do floculante e altos custos de energia (Oswald, 1988; Buelma *et al.*, 1990).

Por outro lado, a escolha do processo a ser utilizado, além da questão do custo, depende da finalidade do uso das algas a serem cultivadas. As técnicas usadas para colheita são centrifugação, sedimentação, flutuação e filtração (Janelt *et al.*, 1997).

O sistema de centrifugação é um dos mais caros, exigindo máquinas específicas. A sedimentação é um dos meios mais viáveis pois é um processo natural. Janelt *et al.* (1997), usando um sedimentador com lâminas dispostas em diferentes níveis para a alga *Chlorella vulgaris*, obtiveram uma concentração de 2 $x10^{8}$ cel.mL^{-1}, 0,2 a 0,3 g peso seco por dia.

A aceleração do processo exige um agente floculador. Pesquisas foram conduzidas avaliando o uso de chitosan, um produto natural, para separação de microalgas tanto marinhas quanto de água doce (Lavoie & de La Noüe, 1983; Morales *et al.*, 1985).

Chitosana é um biopolímero, altamente digestivo e não tóxico, usado freqüentemente como agente floculante para culturas de algas (Lubián, 1989). A concentração de chitosana necessária para obtenção de 100% de floculação é

diferente para cada cultura de alga, dependendo da densidade celular, tamanho da alga, fase de crescimento, entre outros (Morales *et al.*, 1985).

Em relação ao zooplâncton, a *Artemia* é o organismo mais comumente encontrado no mercado na forma de ovos de resistência. Também já estão disponíveis, sob a forma de ovos de resistência, outros tipos de organismos zooplanctônicos, sendo *Daphnia* e *Moina* os gêneros mais comuns. Encontra-se disponível no mercado *Daphnia* de água doce, fresca, congelada e esterilizada por US$ 6,60/100g.

Referências bibliográficas

Bachion, M.A. *Estudo do crescimento e desenvolvimento de três espécies zooplanctônicas submetidas a diferentes dietas alimentares,* Jaboticabal, 1996. (Master Tesis) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista.

Bachion, M.A.; Sipaúba-Tavares, L.H. Estudo da composição das comunidades fitoplanctônica e zooplanctônica em dois viveiros de camarão, *Acta Limnol. Brasil.*, *4*:371-393, 1993.

Barbosa, N.D.C.; Silva Jr., J.M.; Costa, C.L.; Zaniboni Filho, E. Utillização da soja crua no cultivo de alevinos de piapara (*Leporinos elongatus* Valenciennes, 1849). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQÜICULTURA, 6, 1996, Natal. *Anais*... Natal:SIMBRAQ, 1996. p. 50-56.

Barnes, R. D. *Zoologia dos invertebrados*, São Paulo: Livraria Roca Ltda, 1984.

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

Bold, H.C. ; Wynne,M.J. *Introduction to the algae, structure e reproduction.* N. Jersey: Prentice Hall Inc., 1985. 586p.

Borowitza, M.A.; Borowitza, L.J**.** *Micro-algal, biotechnology.* Cambridge: Cambridge University Press, 1989. 447p.

Borowitza, M.A. Algal biotechnology products and process - matching science and economics. *J. of Applied Phycol.*, *4*:267-279, 1992.

Borowitza, M.A. Comercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and ferments*. J. of Biotechnology*, *70*:331-321, 1999.

Brown, M.R.; Jeffrey, S. W.; Garland, C. D. *Nutritional aspects of microalgae used in mariculture; A literature review*. Sidney: CSIRO Mar. Lab. Rep*.* 1989, 44p.

Brown, M.R., Jeffrey, S. W., Volkman, J.K., Dunstan, G. A . Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture, 151*:315-331, 1997.

Buelma, G.; Bhattarai, K. K.; De La Noüe, J.; Taiganides, E. P. Evaluation of various flocculants for the recovery of algal biomass grown on pig waste. *Biological Wastes*, *31*:211-222, 1990.

Colus, D. S. O. *Distribuição da comunidade zooplanctônica e fitoplanctônica em dois viveiros de cultivo semi-intensivo de peixes.* Jaboticabal, 1995. (Master Thesis) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista.

Coutteau, P.; Sorgeloos, P. The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve mollusks: an international survey*. J. Shellfish Research*, *11*:467-476, 1992.

Cowgill, V. M.; Meating, K. I.; Takahashi, I. T. Fecundity and longevity *of Ceriodaphnia dubia affinis* in relation to diet at two differents temperature. *J. Crustacean Biol.*, *5*:420-429, 1985.

Cunha, I.; Planas, M. Optimal prey size for early turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.) based on mouth and ingested prey size, *Aquaculture*, *157*:103-110, 1999.

Dabrowski, K. The feeding of fish larvae: present "state of art" and perspectives, *Reprod. Nutr. Develop., 24*(6): 807-833, 1984.

Dabrowski, K. Dietary requirement for freshwater fish larvae - In search of common thread. In: Lavens, P.; Sorgeloos, P.; Jaspers, E.; Ollevier, F. (ed.). *Fish & Crustacean Larviculture Symposium*. Gent: European Aquaculture Society, 1991. p. 9-10.

Delincé, G**.** *The ecology of the fish pond ecosystem*. Dordrecht: Kluter Academic, 1992. 230p.

Esquivel, B. C.; Votolina, D. Nutritional value of preserved microalgae for subadult *Mytilus galloprovincialis*. *J. World Aquac. Soc.*, *27*:113-118, 1996.

Fábregas, J.; Otero, A.; Morales, E. D.; Arredondo-Veja, B. O.; Patiño, M. Modification of the nutritive value of *Phaeodactylum tricornutum* for *Artemia* sp. in semicontinuous cultures. *Aquaculture*, *169*:167-176, 1998.

Fonseca, C. *Estudo da alimentação das pós-larvas e alevinos de Leporinos frederici, (Bloch, 1794) (Osteichthyes, Characidae)*. Jaboticabal, 1999. (Master Thesis) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista.

Fregadolli, C.H. *Estudo comparativo do comportamento alimentar das larvas de pacu, Piaractus mesopotamicus (Holmber, 1887) e de tambaqui, Colossoma macropomum (Cuvier, 1818) em laboratório.* Salvador, 1990. (Master Thesis) - Universidade Federal da Bahia.

Geiger, J. G. A review of pond zooplankton production and fertilization for the culture of larvae and fingerling striped bass. *Aquaculture*, *35*:353-369, 1983.

Gerking, S.D. *Feeding ecology of fishes.* San Diego: Academic Press Inc., 1994.

Grieko-Reis, M.A.; Onaga, C.A.; Borges, V.A. ; Santos, A.A. Acompanhamento da produção de plâncton em tanques fertilizados na estação de Aquicultura de Japuá (CESP). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 5, 1986, Cuiabá, *Anais...*Cuiabá: Simbraq, 1986. p.24-30.

Gulati, R.D. Zooplankton and its grazing as indicators of trophic status in Dutch Lakes. In: SYMPOSIUM OF ZOOPLANKTON, 2, 1982. Utrecht. *Anais....* . Utrecht, 1982. p. 342-354,

Gulati, R.M.; Demott, W.R. The role of food quality for zooplankton: remarks on the state-of-art, perspectives and priorities, *Freshwater biology, 38*:753-768, 1997.

Happey-Wood, C.M. Ecology of freshwater planktonic green algae. In: Sandgren, C.D. (ed.). *Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton*. Cambridge: Syndicate of the University of Cambridge, 1988. p.175-226.

Hardy, E.; Castro, J.G.D. Qualidade nutricional de três espécies de clorofíceas cultivadas em laboratório, *Acta Amazonica*, *30*(1):39-47, 2000.

Hasler, A.D. Fish biology and limnology of Crater Lake, Oregon. *Journal of Wildlife Management*, *2* (3):94-103, 1938.

Hoff, F. H., Snell, T. W. *Plankton Culture Manual*. Florida: Ralard Printers, 1997. 142p.

Hou, X.; Yan, X. Study on the concentration and seasonal variation of inorganic elements in 35 species of marine algae. *The Science of Total Environment*, *222*:141-156, 1998.

Infante, A.G. *El plancton de las aguas continentales*. Washington: The General Secretariat of the Organization of American States, 1988. 130p.

Isik, O.; Sarihan, E.; Kusvuran, E.; Gül, O.; Erbatur, O. Comparison of fatty acid composition of the freshwater fish larvae Tilapia zilli, the rotifer *Brachionus calyciflorus*, and the microalgae *Scenedesmus abundans*, *Monoraphidium minitum* and *Chlorella vulgaris* in the alga-rotifer-fish larvae food chains, *Aquaculture*, *174*:299-311, 1999.

Janelt, G.; Bolt, P.; Gerbsch, N.; Buchholz, R.; Cho, M.G. The lamellar settler - a low cost alternative for separating the micro-alga *Chlorella vulgaris* from cultivation broth? *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, *48*:6-10, 1997.

Kay, R.A. Microalgae as food and supplement. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *30*:555-573, 1991.

Kibria, G.; Nugegoda, D.; Fairclough, R.; Lam, P.; Bradly, A. Zooplankton: Its biochemistry and significance in aquaculture, *Naga The ICLARM Quarterly*, april-june, p. 9-15, 1997

Kerfoot, W.C.; Demott, W.R. Deangelis, D.L. Interactions among cladocerans: food limitation and exploitative competition. *Arch. Hydrobiol. Beith. Ergebn. Limnol., 21*:431-451, 1985.

Kilhan, S.S.; Kreeger, D.A.; Goulden, C.E.; Lynn, S.G. Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*, *Freshwater Biology*, *38*:591-596, 1997.

Lagler, K.E., Bardach, J.E.; Miller, R.R.; Passino, D.R.M. Foods, digestion, nutrition and growth. In: Sons, J.W.B. (ed.). *Ichthyology*. Cambridge: Cambridge Press, 1997. p.358-370.

Landa, G.G. *Composição do zooplâncton em quatro represas no campus da Universidade Federal de Lavras: um subsídio à piscicultura.* Lavras, 1998. (Master Thesis) - Universidade Federal de Lavras.

Lauff, M.; Hofer, R. Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes, *Aquaculture, 37*:335-346, 1984.

Lavoie, A.; de La Noüe, J. Harvesting microalgae with Chitosan. *J. World Mariculture Soc.*, *14*:685-694, 1983.

Lim, L.C.; Wong, C.C. Use of the rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas, in freshwater ornamental fish larviculture, *Hydrobiol.*, *358*: 269-273, 1997.

Lubián, L. Concentrate cultured marine microalgae with Chitosan, *Aquaculture*, *8*:257-265, 1989.

Lubzens, E.; Rothbard, S.; Blumental, A.; Kolodny, G.; Perry, B.; Olund, B.; Wax, Y.; Farbstein, H. Possible use of *Brachionus plicatilis* (O.F.Muller) as food for freshwater cyprinid larvae, *Aquaculture, 60*:143-155, 1987.

Lürling, M.; de Lange, H.J.; Van Donk, E. Changes in food quality of the green algae *Scenedesmus* induced by *Daphnia* infoquemicals: biochemical composition and morphology, *Freshwater Biology*, *38*:619-628, 1997.

Macedo, C.F. *O estudo da qualidade nutricional de duas espécies de cladóceros em relação às clorofíceas Ankistrodesmus gracilis e Scenedesmus quadricauda*. Belo Horizonte, 1999. (Master Thesis) - Ecologia, Conservação e Manejo de Vida Silvestre, Universidade Federal de Minas Gerais.

Macedo, C. F; Pinto-Coelho, R.M. Taxas de filtração de *Daphnia laevis* e *Moina micrura* em relação às clorofíceas *Scenedesmus quadricauda* e *Ankistrodesmus gracilis*. *Acta Limnol. Bras.*, *12*:1-10. 2000. a

Macedo, C.F; Pinto-Coelho, R.M. Efeito das algas *Ankistrodesmus gracilis* e *Scenedesmus quadricauda* no crescimento e no índice lipídico de *Daphnia laevis* e *Moina micrura*, *Acta Scientiarum*, *22*(2):397-401, 2000. b

Matsumura-Tundisi, T. Occurrence of species of the genus *Daphnia* in Brazil, *Hydrobiologia*, *112*: 161-165, 1984.

Melo, N.F.A.C. *Estruturas de população de Cladocera (Crustacea) em dois lagos da amazonia central (Amazonas-Brasil),* Manaus, 1998. (Master Thesis) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade do Amazonas.

Morales, J.; de La Noüe, L.; Picard, G. Harvesting marine microalgae species by Chitosan flocculation, *Aquacultural Engineering, 4*:257-270, 1985.

Moriarty, D.J.W. The role of microorganisms in aquaculture ponds, *Aquaculture*, *151*:333-349, 1997.

Muller-Fuega, A. The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of Applied Phycology*, *12*:527-534, 2000.

Nascimento, V.M.C. *Caracterização limnológica e efeito de vários usos do solo na qualidade de água do Córrego da Barrinha, Pirassununga/SP.* Brasília, 1994 (Master Thesis) - Universidade de Brasília.

Nayar S., Hegde S., Rao P.S., Sudha, S. Live organisms as feed in aquaculture, *Infofish International*, (4):36-40, 1998.

Nikolsky, G.V. *The ecology of fishes*, London: Academic Press, 1963, 352p.

Oswald, W.J. Large Scale Algal Culture System (engineering aspects) In: Borowitzka MA, Borowitzka, LJ (eds) *Microalgal biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. p. 357-395.

Peña, M.R.; Fermin, A.C.; Lojera, D.P. Partial replacement of *Artemia* sp. by the brackishwater caldoceran, *Diaphanosoma celebensis* (Stingelin), in the larval rearing of the sea bass, *Lates calcarifer. The Israeli Journal of Aquaculture- Bamidgeh*, *50*(1)25-32, 1998.

Pereira, R.H.G. *Dinâmica das populações de Cladocera em viveiros de piscicultura e sua relação com o fluxo de água e densidade de estocagem de peixes,* São Carlos, 1998. (Master Thesis) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Pinto-Coelho, R.M.; Sá Junior, W.P.; Corgosinho, P.H. Variação nictemeral do status nutricional do zooplâncton em tanques de cultivo de plâncton, *Rev. Unimar, 19*(2):521-535, 1997

Portella, M.C. *Efeito da utilização de dietas vivas e artificiais enriquecidas com fontes de ácidos graxos essenciais, na sobrevivência, desenvolvimento e composição corporal de larvas e alevinos de curimbatá Prochilodus scrofa (Pisces,*

Prochilodontidae). São Carlos, 1995 (Doctoral Thesis) - Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos.

Rothbard, S. Practical mass culture of rotifer *Brachionus plicatilis* (Muller). *EIFAC-Technical Paper*, *35*(8-11):194-202, 1979.

Rocha, O.; Duncan, A. The relationship between cell carbon and cell volume in freshwater algae species used in zooplanktonic studies, *Journal of Plankton Research*, *7*(2):279-294, 1985.

Rocha, O.; Sipaúba-Tavares, L.H. Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes: II Organismos zooplanctônicos, Biotemas, *7*(10):94-109, 1994.

Santeiro, R.M. Variação nictimeral de fatores limnológicos e do estaus nutricional do zooplâncton em tanques de cultivo de plâncton. Jaboticabal, 2001. (Master Thesis) - Centro de Aqüicultura - Universidade Estadual Paulista.

Santeiro, R.M.; Pinto-Coelho, R.M. Efeitos de fertilização na biomassa e qualidade nutricional do zooplâncton utilizado na alimentação de alevinos na estação de hidrobiologia e piscicultura de Furnas, MG, *Acta Scientiarum*, *22*(3):707-716, 2000.

Sargent, J.R.; Mcintosh, R.; Bauermeister, A.; Blaxter, J.H.S. Assimilation of the waters of marine zooplankton by herring (*Clupea harengus*) and rainbow *trout (Salmo gairdneri*), *Mar. Biol*., *51*:203-207, 1979.

Seixas, M.H. *Aspectos ecológicos das populações de Cladocera (Crustacea) na represa do Lobo ("Broa"), São Carlos, SP,* São Carlos, 1981. (Master Thesis) - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos.

Sicko-Goad, L.; Andersen, N.A. Effect of growth and light/dark cycles on diatom lipid content and composition. *J. Phycol.*, *27*:710-718, 1991.

Silva, S.L.O.; Coelho, J.B.; Dias, C.; Pinto, J.B.; Crisóstomo, L.C. Cultivo de peixes econômicos em ambientes fertilizados com efluentes de biodigestor. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 3. São Carlos, 1983. *Anais...* São Paulo, 1983, p.25.

Sipaúba-Tavares, L.H. *Utilização do plâncton na alimentação de larvas e alevinos de peixes.* São Carlos, 1988. (Doctoral Thesis) - Universidade Federal de São Carlos.

Sipaúba-Tavares, L.H. Análise da seletividade alimentar em larvas de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e tambacu (híbrido, pacu - *Piaractus mesompotamicus* e tambaqui - *Colossoma macropomum*) sobre os organismos zooplanctônicos, *Acta Limnol. Brasil*., *6*:114-132, 1993.

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*, *6*(1):93-106, 1993.

Sipaúba-Tavares, L.H.; Bachion, M.A ; Rocha, O. Estudo do crescimento populacional de três espécies zooplanctônicas em laboratório e o uso do plâncton na alimentação de alevinos de *Oreochromis niloticus* (tilápia) e *Astyanax scabripinis paranae* (lambari), *Rev. UNIMAR*, *16*(3):189-201, 1994.

Sipaúba-Tavares, L.H. ; Bachion, M.A. A laboratory study of "tambaqui" (*Colossoma macropomum*) and "tambacu" (hybrid, *Piaractus mesopotamicus* and *Colossoma macropomum*) fedding on zooplankton. *European Aquaculture Society* (Special Publication), (24):466-68, 1995.

Sipaúba-Tavares, L.H.; Colus, D.S.O. Estrutura da comunidade fitoplanctônica e zooplanctônica em dois viveiros de cultivo semi-intensivo de peixes (Jaboticabal, São Paulo, Brasil), *Bol. Lab. Hidrobiol.*, *10*:51-64,1997.

Sipaúba-Tavares, L.H.; Pelicioni, L.C.; Olivera, A. Use of inorganic (npk) and the chu12 medium for cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* in laboratory, *Brazilian Journal of Ecology*, *3*(1), 1999.

Sipaúba-Tavares, L. H.; Braga, F. M. Study on feeding habits of *Piaractus mesopostamicus* (Pacu) larvae in fish ponds, *Naga, The ICLARM Quartely*, *22*(1):24-30, 1999.

Sipaúba-Tavares, L.H.; Rocha, O. *Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos.* São Carlos: FAPESP / RIMA, 2001.

Sipaúba-Tavares, L.H.; Bachion, M.A. Influence of dietary habits (algae+supplement) on laboratory population growth and development of two species of Cladocera, *Moina micrura* and *Diaphanosoma birgei*, *Rev. Brasil. Biol.* (in press).

Soeder, C.J. Types of algal ponds, *U.F.O.S.,* Publ. Series C., (3):131-135, 1981.

Sorgeloos, P.; Lavens, P.; Leger, P.; Tackaert, W. State of art in larviculture of fish and shellfish. In: Lavens, P.; Sorgeloos, P.; Jaspers, E.; Ollevier, F. (ed.). *Fish & Crustacean Larviculture Symposium*. Gent: European Aquaculture Society, 1991. p. 3-5.

Sterner, R.W. *Daphnia* growth on varying quality of *Scenedesmus*: mineral limitation of zooplankton, *Ecology*, *74*:2351-2360, 1993.

Tacon, A.G.J. *Feed ingredients for warmwater fish. Fish meal and other processed feedstuffs.* Rome: FAO fisheries, 1993. (Circular 856).

Tavares, L.H.S. ; Matsumura-Tundisi, T. Feeding in adult females of *Argyrodiaptomus furcatus* (Sars, 1901), Copepoda-Calonioda, of Lobo Reservoir (Broa), São Carlos, São Paulo, Brazil, *Hidrobiol.*, *113*:15-23, 1984.

Tanji, S.; Mishima, M.; Pozzi, R. Cultivo de *Chlorella ellipsoidea* S-1 em sacos plásticos, *Boletim do Instituto de Pesca*, *10*:9-16, 1983.

Telvin, M.P. ; Burgis, M.J. Zooplankton Ecology and Pollution Studies. In: Ravera, O. (ed.). *Biological Aspects of Freshwater Pollution*. Oxford: Pergamom, 1979. p.19-38.

Venkataraman, L.V.; Becker, E.W. *Biotechnology & utilization of algae- The Indian experience.* Mysore: Central Food Technological Research Institute, 1985.

Votolina, D.; Nieves, M.; Navarro, G.; Oliva, T.; Peraza, D. The importance of acclimation for evaluation of the alternative media for microalgae growth. *Aquaculture Engineering*, *19*:7-15, 1998.

Watanabe, T.; Kitajima, C.; Fujita, S. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fishes: a review, *Aquaculture*, *34*:115-143, 1983.

Watanabe, T.; Kiron, A. Prospects in larval fish dietetics, *Aquaculture*, *34*: 115-143, 1994.

Zaret, T.M. *Predation and freshwater communities*. New Havan :Yale Univ. Press, 1980.

Justificativa do estudo realizado

Para o desenvolvimento de uma tecnologia de cultura em larga escala, são necessários estudos que busquem a maior produtividade em menor tempo de cultura, com melhor aproveitamento dos recursos empregados. Com o objetivo de otimizar a tecnologia de produção de plâncton empregada no Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton (UNESP/CAUNESP) foram realizados estudos de crescimento e produção em larga escala (250 e 850L) com a alga *Ankistrodesmus gracilis* e o microcrustáceo *Diaphanosoma birgei*.

Este trabalho se propôs a dar continuidade aos estudos de produção de plâncton, tendo como meta a adequação do laboratório existente e o desenvolvimento de um método para cultura em larga escala de algas e zooplâncton.

A proposta deste projeto foi tentar elucidar quais são os fatores que interferem em uma cultura em larga escala, as características do crescimento do plâncton produzido, a composição bioquímica, produtividade, qualidade e o custo do produto produzido.

Muitas informações já foram obtidas com estudos em pequena escala, de cultivos de algas e zooplâncton de água doce, porém estudos em larga escala são escassos no Brasil. Assim, pretendeu-se com este projeto contribuir para o entendimento de uma das grandes lacunas existentes na aqüicultura de água doce, que é a produção de organismos vivos que possam ser utilizados com eficácia pelas diversas larvas de peixe e alevinos.

O conhecimento dos vários aspectos das condições adequadas a cultura em larga escala de organismos planctônicos, como também sobre a biologia e o potencial de crescimento, é imprescindível para que o plâncton possa ser usado como alimento natural, na aqüicultura, eficientemente.

Objetivos

Desenvolver um sistema de cultura em larga escala e avaliação do custo de produção da alga Chlorophyceae *Ankistrodesmus gracilis* e do Cladocera *Diaphanosoma birgei* em laboratório.

Objetivos específicos

- Adequar o Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton (LLPP) para a produção em larga escala;
- Determinar a composição bioquímica e estudo de crescimento da alga *A. gracilis* e do Caldocera *D. birgei*;
- Avaliar o custo e rendimento da cultura da alga *A. gracilis* e do microcrustáceo *D. birgei.*

Capítulo 1-

Metodologia e instalações empregadas na adequação do Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton para cultura em larga escala de *Ankistrodesmus gracilis* e *Diaphanosoma birgei*

Instalações do Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton

A cultura da Chlorophyceae *Ankistrodesmus gracilis* e do Cladocera *Diaphanosoma birgei* foi conduzida nas Instalações do Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton-Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, SP.

O laboratório possui dois setores, produção de fitoplâncton e produção de zooplâncton, ambos foram adaptados para cultivo em larga escala.

A área total construída do laboratório de produção de fitoplâncton é de 28,43m^2, sendo 16,05m^2 destinados ao cultivo em larga escala e 12,38m^2 mantidos em condições assépticas para manutenção de cepas de algas, repicagem e armazenamento de material estéril. A construção foi feita em alvenaria, com piso de cerâmica de cor gelo, paredes brancas, bancadas em concreto recobertas com epóxi e vala central de drenagem na sala de cultivo em larga escala (Figura 1).

O laboratório de produção de zooplâncton conta com uma área de 12 m^2 para cultura em larga escala (recipientes de 20 e 850L) e 3m^2 para cultivo em pequena escala (recipientes de 2L). A construção foi composta de uma estrutura metálica com base de concreto, paredes com armação metálica e fechamento em vidro (estufa) (Figura 1).

Sistemas de abastecimento: água, alga e ar

Após melhorias no sistema de abastecimento e tratamento de água, adicionou-se à estrutura um sistema de aeração por soprador e criadas linhas de abastecimento de água filtrada e alga (Figura 2).

A água utilizada na cultura foi proveniente de uma nascente localizada na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP - Campus Jaboticabal. Após a captação da água, a mesma foi armazenada em um reservatório de 5.000L (Figura 2). O reservatório também funciona como um tanque de decantação de possíveis sólidos oriundos da nascente e como reserva de água para funcionamento do laboratório em decorrência de alguma falha no sistema de captação e bombeamento.

Após o repouso no reservatório, a água passa por dupla filtragem (5 e 1μm) em estruturas montadas em paralelo (Figura 2), diminuindo a perda de pressão da água no processo. Esta fase do abastecimento pode ocorrer por gravidade ou bombeamento, se for necessário aumentar a vazão da água.

1

2

3

4

5

Figura 1 - Vista externa do Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton, (1) setor de produção de fitoplâncton e (2) setor de produção de zooplâncton. Detalhes dos setores de produção de fitoplâncton e zooplâncton: (3) sala asséptica para manutenção de cepas de algas, (4) vala central da sala de produção em larga escala de algas e (5) sala de cultivo em pequena escala de zooplâncton.

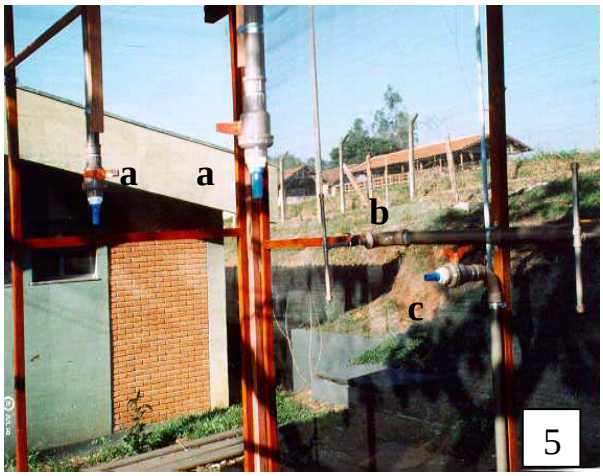


Figura 2 - Estruturas pertencentes ao Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton: (1) reservatório de água; (2) bateria paralela de filtros de cartuxo de 5 μm (a) e 1 μm (b). Detalhes do setor de produção de fitoplâncton: (3) abastecimento de água e (4 c) tubulação de água filtrada e (d) alga. Detalhes do setor produção de zooplâncton: (5 a) tubulação de água filtrada, (b) ar e (c) alga. Casa de máquinas com bombas e soprador (6).

No setor de produção de fitoplâncton, a tubulação do sistema que transporta água filtrada é fixada na porção mediana das paredes, com dois pontos de saída na sala. Na parte inferior, está a tubulação que conduz a cultura de alga, através de bombeamento, até a sala de criação de zooplâncton (Figura 2). Já no setor de produção de zooplâncton, a sala possui uma linha de água filtrada suspensa centralmente (dois pontos), uma de alga (dois pontos lateralmente) e linha de ar com quatro pontos (Figura 2).

Na adaptação para a cultura em larga escala foi feita a instalação de dois sopradores (3 e 4 HP), sendo um reserva, modificando o antigo sistema de abastecimento de ar, feito através de compressor. O compressor libera óleo junto com o ar, contaminando e matando as culturas. Foi necessário o aumento do diâmetro da tubulação anterior de ½ para duas polegadas, devido aos resíduos de óleo na tubulação antiga além do que, o novo aparelho trabalha com um volume de ar maior e necessita de uma tubulação de maior diâmetro. Os sopradores abastecem tanto o setor de fitoplâncton quanto o de zooplâncton (Figura 2).

Sistema de iluminação

No cepário, o sistema de iluminação montado permitiu a escolha do nível de intensidade luminosa desejada. Desta forma, pôde-se controlar a velocidade de crescimento das algas, seja para manutenção das cepas (lenta), seja para o cultivo (rápida). Isto foi possível devido ao tipo de prateleiras (vazada de modo a permitir a passagem de luz) e a disposição intercalada das luminárias. A intensidade luminosa pode variar de 2.000 a 6.000 lux, dependendo da posição da prateleira em relação ao ponto de iluminação. Este sistema permite experimentos com diferentes níveis de luminosidade (Figura 3).

A iluminação da sala de cultivo em larga escala localiza-se principalmente parte superior da cultura de algas, nos tanques maiores (850L), além desta área, foi adicionada iluminação para a porção lateral dos mesmos, aumentando a produtividade das algas cultivadas (Figura 3). A intensidade luminosa média dos tanques de 250 e 850L foi de 1.100 lux. O tanque próximo ao vitrô recebe uma iluminação de 1.400 lux na área voltada para a parede e 800 lux (dependendo da intensidade luminosa do dia) na área voltada para o vitrô. Esta diferença pode ser um fator de diferenciação de desempenho dos cultivos entre os tanques. Novas adaptações devem ser realizadas

1

2

3

4

5

6

Figura 3- Laboratório de Produção de Fitoplâncton: (1) pequena escala volumes de 11ml, 1,8L e 10,8L; (2) larga escala, volumes de 250 e 850L; (3) iluminação no cepário; (4) iluminação no volume de 250L; (5) iluminação lateral em 850L e (6) iluminação na parte superior do tanque e através de vitrô.

no laboratório para igualar as diferentes intensidades de luz na sala de cultivo em larga escala e aumentar a intensidade para 2.000 lux em todos os tanques.

Assepsia empregada na cultura

A contaminação da cultura de plâncton pode ser biológica ou química. Alguns cuidados com contaminação por outras espécies ou por componentes químicos residuais, rotineiramente utilizados no laboratório são descritos a seguir.

O acesso ao laboratório foi limitado às pessoas diretamente envolvidas no processo de produção, além de medidas assépticas com todo material utilizado.

A assepsia dos diversos materiais utilizados no laboratório foi realizada com a seguinte metodologia:

Vidraria (tubos de ensaio, balões, erlenmeyers, pipetas)

- Lavagem em água corrente;
- Lavagem com detergente neutro;
- Enxágüe em água corrente três vezes;
- Imersão em Ácido Clorídrico a 15% por 24 horas;
- Enxágüe em água corrente três vezes;
- Autoclavagem a 1 atm (120°C) por 20 minutos;

Béqueres

- Lavagem com água corrente;
- Lavagem com detergente neutro;
- Secagem e guardar;

Garrafão (10,8L)

- Lavagem em água corrente;
- Lavagem com detergente neutro;
- Enxágüe em água corrente três vezes;
- Preenchimento com hipoclorito de sódio (5mg.L^{-1}) por 24 horas;
- Enxágüe em água corrente três vezes;

Mangueiras e distribuidores de ar

- Lavagem com detergente neutro;
- Enxágüe em água corrente;

- Imersão em hipoclorito de sódio (5mg. L^{-1}) por 24 horas;
- Enxágüe em água corrente;
- Secagem e guardar em recipiente seco e com tampa;

Tanques de cultura (250 e 850L)

- Lavagem com máquina de limpeza a jato;
- Aplicação, com auxílio da máquina a jato, uma solução com água e detergente;
- Enxágüe.

A sala de cultivo foi lavada com hipoclorito de sódio e detergente diariamente após a finalização das atividades de laboratórios.

Metodologia de cultivo: *Ankistrodesmus gracilis*

A cepa da alga *Ankistrodesmus gracilis* foi proveniente da Universidade Federal de São Carlos, N º 005CH, isolada da Represa do Broa, São Paulo, Brasil.

O meio de cultura usado foi o Chu_{12} para manutenção do inóculo (11ml) e a solução de adubo comercial NPK (20:5:20) para os outros volumes. O cultivo em sistema estático foi feito nos seguintes volumes crescentes: 11ml, 500ml, 1,8L, 10,8L, 250L e 850L.

O setor de produção de fitoplâncton utilizou com dois ambientes de cultivo, para pequena (até 10,8L) e larga escala (250 e 850L), com diferentes condições de cultivo. As mensurações realizadas com luxímetro e termômetro de máxima e mínima mostraram que o setor de produção em pequena escala apresentou uma intensidade luminosa média de 4.000 lux e temperatura de 22±2ºC. Já o setor de produção em larga escala apresentou média de 1.100 lux e temperatura 24±2ºC.

O fotoperíodo das duas salas foi de 24 horas e foram utilizadas lâmpadas fluorescentes (Phillips daylight).

As culturas de algas foram aeradas continuamente com soprador, exceto nos volumes de 11ml e 500ml, as quais foram agitadas manualmente uma vez ao dia. Para o cultivo de fitoplâncton há três métodos: estático, contínuo e o semicontínuo. Neste estudo, o sistema utilizado foi o estático, por ser o mais simples, visando coletar as informações detalhadas, principalmente sobre crescimento algal, necessárias a implantação dos outros sistemas.

Os cultivos em pequena escala foram realizados em recipientes de vidro e aqueles em larga escala com volumes de 250L (três tanques) e 850L (três tanques), em tanques de fibra de vidro, translúcidos de fundo cônico. As repicagens entre os

diferentes volumes ocorreram sempre que a cultura atingia a fase exponencial de crescimento. O acompanhamento do crescimento algal foi diário a partir de contagens em câmara de Neubauer.

No cultivo em larga escala, os tanques de 250 e 850L recebiam um inóculo de 21,6L, sendo seus volumes complementados até 250L com água filtrada e com a adição de fertilizantes. Após 5 dias, o tanque de maior volume recebia nova fertilização e seu volume era novamente elevado, desta vez até 850L. A alga, em ambos os recipientes, podendo ser usada para alimentação após 5 dias.

Durante o ciclo de produção, o tanque de 250L poderia servir de inóculo para o tanque de 850L, sendo transferido através de bomba submersa instalada no tanque menor (Figura 4). Esta medida aumentou a produção de algas, fazendo com que os tanques maiores fossem utilizados apenas para produção de seu volume total (850L), reduzindo também o intervalo entre os cultivos. A diferença entre as capacidades dos tanques também permitiu comparações entre o desempenho de cultivo e crescimento nestes volumes.

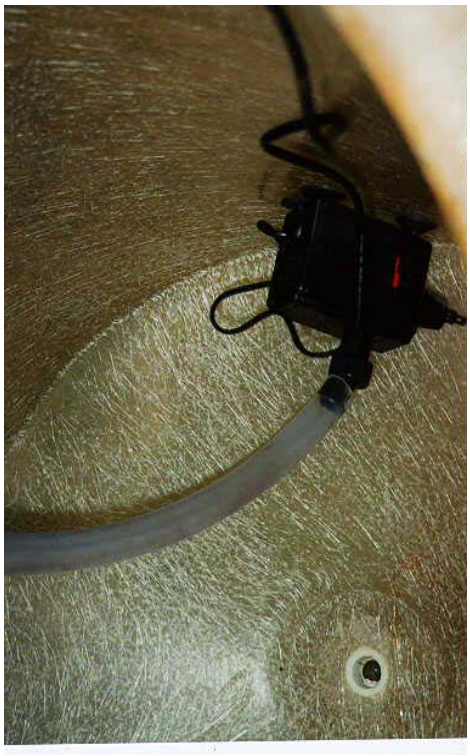
O tempo de produção a partir do primeiro ciclo (**I**) até o garrafão totalizou 26 dias. À medida que o ciclo de cultivo estava implantado, outra rota (**II**), iniciando-se com 1,8L levou a uma redução de 26 para 13 dias. Abaixo encontra-se esquematizada as duas rotas de produção no setor de produção de fitoplâncton.

Tubo de ensaio (11ml) → Balão (0,4L) → Erlenmeyer (1,8L) → Garrafão (10,8L)
(**I**) ↓

Tanque (850L) ← Tanque (250L)

Erlenmeyer (1,8L) → Garrafão (10,8L) → Tanque (250L) → Tanque (850L)
(**II**)

1



2

Figura 4 - Setor de produção de fitoplâncton: (1) transferência de 250 para 850L; (2) bomba submersa usada na transferência de alga

Metodologia de criação: *Diaphanosoma birgei*

O Cladocera *Diaphanosoma birgei* foi coletado nos viveiros da Universidade Estadual Paulista com rede de plâncton com 58μm de abertura de malha. O isolamento foi feito com pipeta capilar em microscópico estereoscópio WILD (aumento de 9X) após três dias de aclimação as condições de laboratório.

Foi instalado um condicionador de ar de ciclo reverso, capaz de aquecer e refrigerar o ambiente, porém, o mesmo não foi capaz de controlar a temperatura no setor de produção de zooplâncton, evitando apenas oscilações bruscas da mesma.

A temperatura foi de 23,3±3,6°C, fotoperíodo natural e aeração suave. A cultura foi feita em béqueres com volumes de 100ml a 2L, baldes translúcidos de 20L e tanques cilíndricos cônicos com capacidade de 850L (fibra de vidro).

No laboratório de produção de zooplâncton, o sistema utilizado foi o semi-estático com uma colheita total. A população inicial variou de 50 a 100 indivíduos no volume de 100ml, aumentando-se o volume da cultura à medida que aumentava a população. As mudanças de volume ocorriam sempre que o cultivo atingia o pico de crescimento populacional (3000 ind.L^{-1}) (Figura 5).

Em todos os volumes foram feitas trocas parciais de água do cultivo sendo 5% por dia e 70% a 100% uma vez por semana. Renovações foram feitas sempre que foi constatada a presença excessiva de protozoários ou material em suspensão.

A renovação diária foi realizada nos tanques de 850L com drenagem da água do fundo dos tanques através de um registro instalado no final do cone e por sifonamento do fundo nos outros recipientes. A água coletada foi concentrada em baldes telados, à qual era adicionada água limpa e devolvida ao tanque de origem (Figura 5).

Os Cladocera foram alimentados com a alga *A. gracilis* na densidade de 25 x 10^4 cél.ml^{-1}. A concentração residual da alga na cultura foi verificada sempre pela manhã antes da troca de água. O residual da concentração de alga era sempre zero ou próximo de zero. Isto sugere que em culturas posteriores é aconselhável uma verificação da concentração de alimento no final da tarde, complementando com alga se necessário, aumentando assim a oferta de alimento durante todo o período de cultura. A divisão da alimentação em duas refeições evita o florescimento, que poderia ocorrer facilmente se fossem adicionadas grandes densidades algais ao tanque em uma só vez.

1

2

3

4

Figura 5 - Setor de produção de zooplâncton: (1) cultivo em pequena escala; (2) baldes translúcidos de 20L; (3) tanques de 850L e (4) balde telado para concentração de zooplâncton.

Capítulo 2-

Cultura em larga escala e análise da composição bioquímica da microalga (Chlorophyceae) *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korsikov, e do microcrustáceo (Cladocera) *Diaphanosoma birgei* (Korineck, 1981) em laboratório

Cultura em larga escala e análise da composição bioquímica da microalga (Chlorophyceae) *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korsikov, e do microcrustáceo (Cladocera) *Diaphanosoma birgei* (Korineck, 1981) em laboratório

Resumo: O objetivo deste trabalho foi analisar a viabilidade da cultura em larga escala e a composição bioquímica da alga Chlorophyceae *Ankistrodesmus gracilis* e do Cladocera *Diaphanosoma birgei* em laboratório. O experimento foi realizado no Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton do Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP). As algas foram cultivadas em meio Chu_{12} e NPK (20:5:20), sob iluminação contínua (4.000 e 1.100 lux para pequena e larga escala, respectivamente), aeração constante e temperatura controlada (24,0±2,0ºC). O tempo de produção das algas foi de 31 dias, concentração na fase exponencial variando de 68,50 a 358,38 x 10^4 células.ml^{-1} nos diferentes volumes de cultivo. A análise bioquímica revelou que a alga apresenta 32,6% de proteína, 20,0% de carboidrato, 8,0% de extrato etéreo, 18,3% de cinzas, 3,2% de fibras e 4.583 cal/g. O aminograma revelou que 58,7% da proteína era constituída por aminoácidos essenciais. A relação Ca:P foi aproximadamente 1:1. O Cladocera foi oriundo dos viveiros de piscicultura do CAUNESP, isolado e criado em volumes de 500ml a 850L, em sistema estático, alimentados com *A. gracilis*, em temperatura de 23,3±3,6ºC, fotoperíodo natural e aeração suave. O tempo de produção do Cladocera foi de 27 dias com densidade final de 2.500 indivíduos.L^{-1}. A análise bioquímica deste microcrustáceo revelou uma composição de 70,0% de proteína, 5,7% de carboidrato, 8,7% de extrato etéreo, 11,5% de cinzas, 4,3% de fibras e 4.627 cal/g. Os resultados apresentados sugerem que *Ankistrodesmus gracilis* e *Diaphanosoma birgei* são espécies com potencial para cultura e alimentação na aqüicultura.

Palavras-chave: plâncton, composição bioquímica, cultivo em larga escala, crescimento populacional.

Abstract: The objective of this work was to analyze in detail the viability of the culture and the biochemical composition of the Chlorophyceae algae *Ankistrodesmus gracilis* and of the Cladocera *Diaphanosoma birgei* in laboratory. The experiment was carried out in the Limnology Laboratory and Plankton Production in the São Paulo State Aquaculture Center at UNESP (CAUNESP). The algae were cultivated using a culture media of Chu_{12} and NPK (20:5:20), under continuous light (4000 and 1100 lux for massive and small scale, respectively), constant aeration and controlled temperature (24.0±2.0ºC). Algae production time was of 31 days, concentration during the exponential phase varied from 68.5 to 358.38 x 10^4 cells.ml^{-1} in different volumes of culture. Biochemical analyses revealed that the algae presents 32.6% of protein, 20.0% of carbohydrate, 8.0% ethereal extract, 18.3% of ashes, 3.2% of fibers and 4.583 cal/g. The aminogram revealed that 58.7% of the protein was made up of essential aminoacids. The Ca:P relation was of approximately 1:1. The cladoceran was derived from the CAUNESP fish culture ponds, isolated and produced in volumes of 500ml to 850L, in batch system, fed with *A. gracilis*, at temperatures of 23.3±3.6ºC, natural photoperiod and mild airing. Cladocera production time was of 27 days with final density of 2500 individuals.L^{-1}. The biochemical analyses of this micro-crustacean revealed a composition of 70.0% of protein, 5.7% of carbohydrate, 8.7% of ethereal extract, 11.5% of ashes, 4.3% of fibers and 4627 cal/g. The results here presented suggest that *Ankistrodesmus gracilis* and *Diaphanosoma birgei* are species with potential for culture and feeding in aquaculture.

Key Words: plankton, biochemical composition, massive culture, population growth.

Introdução

A cultura de algas e microcrustáceos em laboratório têm tomado um grande impulso nos últimos anos, embora a tecnologia empregada ainda não possa ser considerada ideal. Tal fato é praticamente evidente para os planctônicos de água doce, considerados como a fonte primária de alimento na larvicultura.

Atualmente diferentes espécies de algas marinhas são produzidas em escala comercial, favorecendo o desenvolvimento da aqüicultura, indústria farmacêutica, indústria alimentar, entre outros (Borowitzka & Borowitzka,1989). Em relação aos microcrustáceos, poucos estudos têm enfatizado aspectos de cultura em laboratório (Sipaúba-Tavares & Rocha, 1993; Sipaúba-Tavares *et al.*, 1994; 1999; Hardy & Castro, 2000; Macedo & Pinto-Coelho, 2000), porém análise sobre sua produção em larga escala têm sido inconsistentes.

O estudo do crescimento e do valor nutricional dos organismos planctônicos são aspectos de suma importância para incrementar o conhecimento biológico das diferentes espécies, favorecendo sua otimização de produção em ambientes controlados.

Nos últimos anos o interesse pela produção de algas em larga escala tem avançado no sentido de selecionar espécies com melhor potencial de crescimento, adaptação ao cultivo e valor nutricional. As algas são uma das principais fontes de alimento, por serem rapidamente renováveis e produzir mais biomassa que qualquer outro recurso por unidade de tempo (Arredondo-Figueroa *et al.*, 1998).

Entre as algas de água doce mais cultivada estão as Chlorophyceae, ressaltando o potencial de *Ankistrodesmus gracilis,* que tem mostrado excelente resultado em cultivos realizados em laboratório ou quando utilizada como alimento para larvas de peixes (Sipaúba-Tavares & Braga, 1999; Sipaúba-Tavares *et al.*, 1999)

Dentre os organismos zooplanctônicos criados em laboratório, os Cladocera destacam-se não só pela reprodução partenogenética e curto ciclo de vida, como por sua intensa produção em curto período de tempo (Sipaúba-Tavares *et al.*, 1994). *Diaphanosoma birgei* é a espécie de maior destaque por sua resistência ao manejo durante a cultura, alta taxa reprodutiva e preferência seletiva pelas larvas de peixes (Sipaúba-Tavares & Braga, 1999).

A concentração e qualidade do alimento têm um papel de extrema importância em estudos de alimentação, influenciando a dinâmica de uma espécie e afetando diretamente sua taxa de mortalidade.

A obtenção e disponibilidade de alimentos artificiais adequados para larvas de peixes são dificuldades persistentes na aqüicultura. Desta forma, acredita-se que a otimização produtiva do alimento natural seja um dos caminhos mais lógicos para o sucesso da criação de peixes no estágio inicial de desenvolvimento.

Assim, o presente trabalho visou obter maiores informações sobre a cultura da alga Chlorophyceae *Ankistrodesmus gracilis* e do Cladocera *Diaphanosoma birgei* em larga escala, a fim de contribuir para o desenvolvimento da piscicultura em uma das suas etapas mais críticas, a larvicultura.

Material e métodos

Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis*

O inóculo de *A. gracilis* foi proveniente da Universidade Federal de São Carlos, linhagem nº. 005CH, isolada da Represa do Broa (SP, Brasil). Posteriormente, foi cultivada no Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton (Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura) em sistema de estático cultivo não axênico, com aeração constante e temperatura de 24,0±2,0ºC. Foram utilizados os meio Chu_{12} e NPK (20:5:20) (Sipaúba-Tavares & Rocha, 1993). O fotoperíodo foi de 24 horas de luz, sob iluminação no topo da cultura com lâmpadas fluorescentes (Phillips daylight), sob intensidade média de 4.000 lux e 1.100 lux para pequena e largas escala, respectivamente. O volume em pequena escala variou de 11ml a 10,8L e em larga escala foram utilizados dois volumes, três recipientes de 250L e três recipientes de 850L. As repicagens entre os diferentes volumes ocorreram sempre que a cultura atingia a fase exponencial de crescimento, aproximadamente entre o 5^o e 6^o dia para pequena e larga escala, respectivamente. A água utilizada no cultivo foi proveniente de nascente, filtrada em filtros de 1μm e 5μm.

O método empregado no cultivo de *A. gracilis* foi baseado nos trabalhos de Sipaúba-Tavares & Rocha (1993) e Sipaúba-Tavares *et al.* (1999), adaptado para o cultivo em larga escala. O meio Chu_{12} foi utilizado apenas para manutenção da cultura em 11ml.

Na Tabela 1 encontra-se um resumo do método usado e o tempo entre as repicagens dos diferentes volumes.

Tabela 1 - Método utilizado no cultivo de *A. gracilis*, apresentando os valores médios dos intervalos entre as repicagens.

Volume da cultura	Volume do inóculo	Meio de cultura (volume)	Meio de cultura (meio)	Tempo de repicagem (dias)
11ml	1ml	0,007ml	Chu 12	7
500ml	80ml	0,5ml	NPK	6
1,6L	200ml	3ml	NPK	4
10,8L	2,8L	20ml	NPK	4
250L	21,6L	500ml	NPK	5
850L	250L	1,3L	NPK	-

Coleta e Criação de *Diaphanosoma birgei*

O Cladocera *D. birgei* foi coletado nos viveiros da Universidade Estadual Paulista (Jaboticabal, SP), utilizando rede de plâncton de 58μm de abertura de malha. Foram mantidas 50 fêmeas ovadas em cultura estoque no laboratório, isoladas em béqueres de 100ml para aclimação a uma temperatura de 23,3±3,6ºC, com fotoperíodo natural e aeração suave. As culturas foram realizadas inicialmente em béqueres de 2L, transferidos para baldes translúcidos de 20L e, finalmente, para tanques cilíndricos cônicos de fibra de vidro com capacidade de 850L. A variação do número de indivíduos por litro para cada recipiente é mostrada na Tabela 2. O sistema de cultura foi semi-estático e adaptado para larga escala de acordo com trabalhos realizados anteriormente (Sipaúba-Tavares & Rocha, 1993; Sipaúba-Tavares *et al.*, 1994). As mudanças de volume ocorreram sempre que a cultura atingia a fase exponencial, com 3.000 indivíduos.L^{-1}.

Foram alimentados diariamente com *A. gracilis*, utilizando sistema de bombeamento direto do tanque de cultivo de alga para o tanque de produção de *D. birgei.*

Em todos os volumes foram feitas trocas parciais da água de cultivo para a manutenção da qualidade da água, correspondendo a 5%.dia^{-1}. Além dessas trocas diárias foi necessário uma troca de 70 a 100%.semana^{-1}, o que também foi realizado na constatação de presença excessiva de protozoários ou material em suspensão na água de cultura dos recipientes.

Tabela 2 - Método utilizado no cultivo do Cladocera *D. birgei*

Volume (L)	População inicial (indivíduos.L^{-1})	Concentração algas (células.ml^{-1})	Tempo de repicagem (dias)	Volume do inóculo (L)
0,50	500	25 x 10 ^{4}	6	-
1,8	1.700	25 x 10 ^{4}	6	1
20	750	25 x 10 ^{4}	6	5
850	1.100	25 x 10 ^{4}	10	300 *

*Aumento gradual do volume do tanque de acordo com o crescimento da população.

Curva de Crescimento e Tempo de Produção

Para a alga *A. gracilis* a curva de crescimento foi determinada utilizando-se as concentrações médias das contagens diárias em câmara de Neubauer, ao longo do tempo de cultivo. Os dados foram utilizados na confecção de gráficos de dispersão, cujos pontos foram ajustados pela função exponencial ($y = a.e^{bx}$). O número de dias de cultivo amostrado variou em função da contagem, que foi interrompida com a queda ou estabilização da densidade de algas.

O mesmo procedimento foi adotado para o Cladocera *D. birgei* utilizando as concentrações médias por litro obtidas das contagens diárias realizadas ao longo do tempo de cultura. As coletas foram efetuadas com auxílio de uma pipeta invertida (3 réplicas de 10ml) e contadas em vidro de relógio com o auxílio de um microscópio estereoscópico.

Considerou-se como tempo de produção o intervalo compreendido desde o inóculo inicial (11ml e 500ml alga e Cladocera, respectivamente), até o volume máximo de cultura (850L).

Velocidade de crescimento e tempo de duplicação para *Ankistrodesmus gracilis*

A velocidade de crescimento foi obtida dos dados das amostras coletadas na fase exponencial, sendo representada pelo número de divisões celulares/dia, e calculada pela fórmula indicada por Stein (1973), a saber,

$$k = [3{,}322 / (T_2 - T_1)] \cdot [\log (N_2 / N_1)]$$

onde:

k= velocidade de crescimento

$(T_2 - T_1)$= intervalo de tempo em dias

N_1= concentração celular inicial

N_2= concentração celular final

3,322= constante

log= logaritmo em base 10

Taxa intrínseca de aumento e tamanho de *Diaphanosoma birgei*

A taxa intrínseca de aumento ou coeficiente instantâneo de crescimento populacional constitui um índice único que indica a capacidade inerente de crescimento de uma população. Este parâmetro propicia previsões sobre o tamanho de uma população em determinado tempo, para um conjunto específico de condições ambientais, conhecendo-se o tamanho inicial da população e o valor de r. Para o cálculo da taxa intrínseca pode-se empregar a seguinte fórmula (Birch, 1958):

$$r = (\ln N_t - \ln N_o) / t$$

onde: r = taxa intrínseca

N_t = número de indivíduos no tempo determinado

N_o = número inicial de indivíduos

t = duração do experimento

Foram coletados e mensurados de 55 a 60 animais de cada tanque de criação. As medidas de comprimento total dos Cladocera foram realizadas somente para o volume de 850L, medindo-se os animais da extremidade anterior à posterior, sem incluir os espinhos ou qualquer outro prolongamento (Botrell *et al.*, 1976). A medição foi feita com o auxílio de microscópio Leica (50X) acoplado a sistema de imagens por computador e as imagens analisadas pelo programa Image Pro Lite Plus - versão 4.0.

A temperatura e o oxigênio dissolvido da cultura de *D. birgei* foram monitorados diariamente utilizando um aparelho Orion mod. 810. O pH e a condutividade elétrica foram verificados em aparelho digital Corning PS 15 e CD 55, e, duas vezes por semana, o nitrato, nitrito, fósforo e ortofosfato pelo método de Golterman *et al.* (1978) e a amônia segundo Koroleff (1976).

Composição bioquímica

As amostras de *A. gracilis* foram concentradas em desnatadeira utilizando a cultura de três tanques num total de 1800L, provenientes dos tanques de 850 L. As

algas foram liofilizadas e tiveram alíquotas em duplicata empregadas para a execução de todas as análises de composição bioquímica. O extrato etéreo, minerais e fibras foram determinados segundo metodologia da A.O.A.C. (1984); a composição mineral segundo Bataglia *et al.* (1983); o teor de proteína em aparelho LECO mod. FP 528LC; e a energia bruta em bomba calorimétrica PARR mod. 1281. Para a determinação dos aminoácidos as amostras foram previamente desprovidas de gordura e sofreram hidrólise ácida (Moore *et al.* 1958) e alcalina (Lucas & Sotelo, 1980). Alíquotas entre 0,010 e 900ml foram aplicadas nas colunas de troca catiônica do analisador e eluídas por diferenças de pH e força iônica (Spackman *et al.* 1963). Após a separação cromatográfica, os aminoácidos eluídos da coluna reagiram com ninidrina a uma temperatura de aproximadamente 100ºC por 15 minutos e os produtos desta reação determinados colorimetricamente em dois comprimentos de onda: 440nm para a prolina e 570nm para os demais aminoácidos. A identificação foi realizada com base nos tempos de detenção de cada resíduo (Alonso & Hirs, 1968).

Para *D. birgei* cerca de 90g da biomassa total produzida no final do cultivo foi separada para as análises bioquímicas, concentradas em tela de 200μm de malha, seca em estufa e o material dividido em alíquotas em duplicata para todas as análises de composição bioquímica. As análises de proteína, estrato etéreo e cinzas foram determinadas segundo o método da A.O.A.C. (1984) e energia em bomba calorimétrica PARR mod. 1281.

Análise Estatística

Os pontos empíricos utilizados para avaliar o crescimento foram submetidos a uma análise de regressão, recebendo o ajuste pela função exponencial, com verificação do ajuste pelo coeficiente de determinação. Os pontos empíricos foram obtidos através da média dos dados de crescimento em triplicata, para cada volume de cultura.

Resultados

Crescimento de *Ankistrodesmus gracilis*

O crescimento da alga apresentou semelhança entre os diferentes volumes de cultivo, com a fase exponencial atingindo o pico entre o 4º e o 7º dia de cultivo,

estacionária a partir do 10º dia. A maior velocidade de crescimento foi para o volume de 11ml e a menor para 850L, porém as maiores densidades foram obtidas nos volumes de 1,6L para as fases exponencial e estacionária e 10,8L para a fase de indução. As menores densidades foram obtidas para o volume de 500ml (Tabela 3).

Os volumes de 250 e 850L apresentaram densidades semelhantes nas três fases de crescimento, porém no menor volume ocorreu maior velocidade de crescimento e um pico de abundância (9º dia) quando comparado ao volume de 850L, com k= 0,12 e pico de abundância no 13º dia (Tabela 3).

As curvas de crescimento (Figura 1), exibem somente a fase exponencial nos diferentes volumes, verificando-se os picos de abundância mais rápidos para os volumes de 11ml e 250L, ao redor do nono dia de experimento. Estes dois volumes não apresentaram as maiores densidades, porém demonstraram uma curva exponencial semelhante. Os demais volumes analisados geraram uma curva menos acentuada, mostrando certa tendência à estabilização.

Os volumes de 1,6L e 10,8L apresentaram as maiores densidades, tendendo a oscilar ao longo do tempo, com maior pico de abundância ao redor do 10º e 16º dia, respectivamente (Figura 1).

A densidade de algas no volume de 500ml apresentou uma curva pouco acentuada, crescimento lento e as menores densidades celulares quando comparados aos demais volumes (Tabela 3 e Figura 1).

Tabela 3 - Características da curva e velocidade de crescimento (k) de *A. gracilis*.

Volume do cultivo	Fase de crescimento	Densidade (x 10^4células.ml^{-1})	k
11ml	Indução		
	Exponencial	34,38	0,31
	Estacionária	102,50	
		187,50	
500ml	Indução		
	Exponencial	24,75	0,21
		68,50	
	Estacionária	86,50	
1,6L	Indução		
	Exponencial	103,00	0,17
		358,38	
	Estacionária	452,00	
10,8L	Indução		
	Exponencial	114,00	0,20
		249,50	
	Estacionária	470,67	
250L	Indução		
	Exponencial	40,35	0,15
		93,50	
	Estacionária	119,30	
850L	Indução		
	Exponencial	40,75	0,12
		101,38	
	Estacionária	121,50	

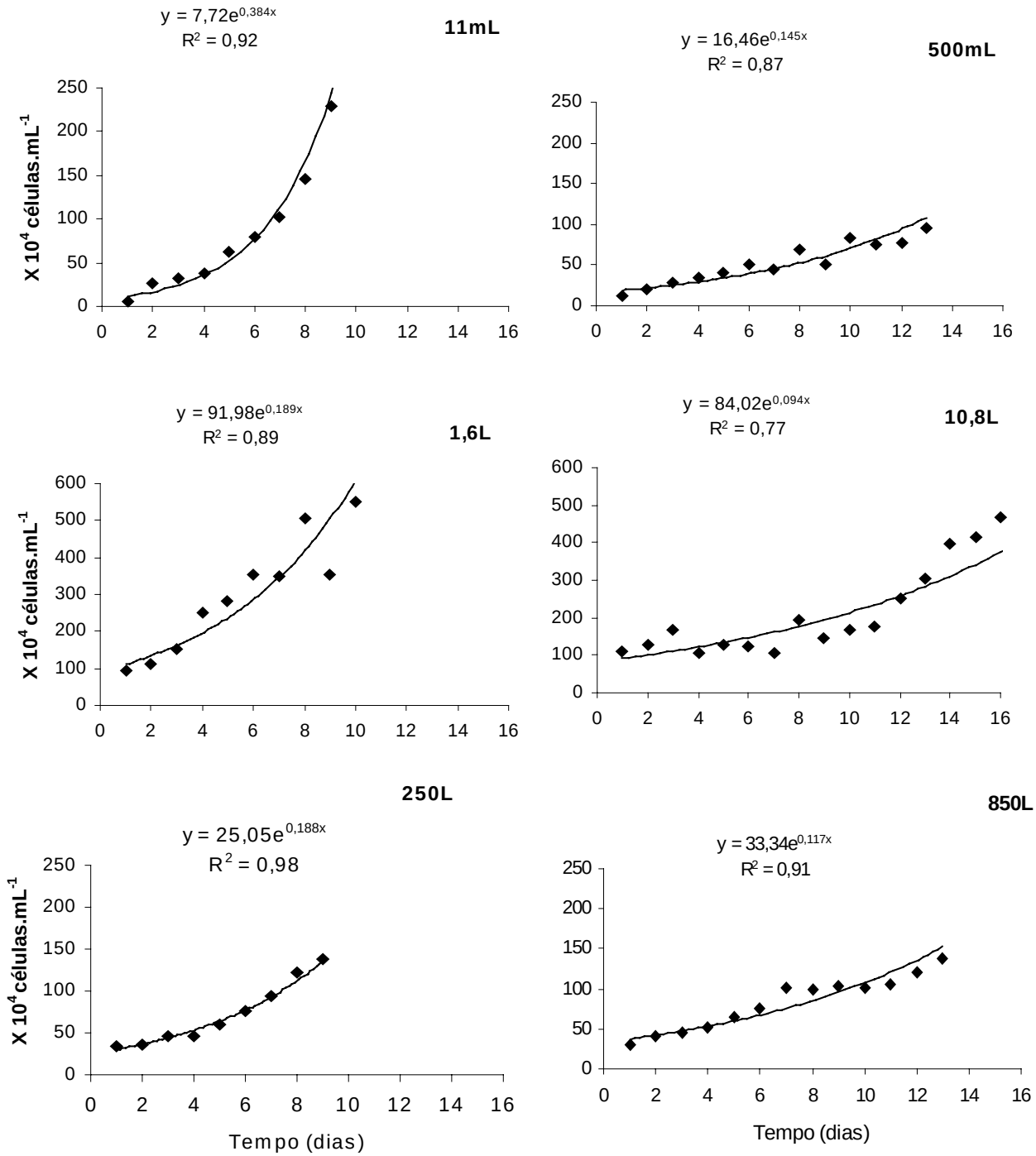


Figura 1 - Curva de crescimento de *Ankistrodesmus gracilis* em diferentes volumes de cultivo.

O tempo de produção a partir do primeiro ciclo com 11ml até 10,8L totalizou 31 dias, com os resultados obtidos nos volumes 1,6 e 10,8L. Foi possível reiniciar novos cultivos a partir do volume 1,6L, reduzindo o tempo de produção para 14 dias.

Criação e crescimento de *Diaphanosoma birgei*

A Figura 2 mostra as curvas exponenciais de crescimento para *D. birgei*, em volumes distintos, verificando-se a obtenção de um elevado número de indivíduos num curto espaço de tempo.

O pico de abundância mais rápido foi obtido no volume de 500ml ao redor do 5º dia com cerca de 767 indivíduos, porém a cultura em 20L (32.450 indivíduos); apesar de o pico ocorrer ao redor do 9º dia apresentou densidades bem mais elevadas (Figura 2).

O volume de 850L (A - 23,2±3,7ºC) apresentou um maior número de indivíduos, mantendo-se abaixo de 15.000 x 10^2 indivíduos até o 11º dia, a partir do qual mostrou uma retomada de crescimento até o 18º dia, com um máximo de 28.133 x 10^2 indivíduos. No volume de 850L (B) observou-se o efeito direto da temperatura (21,1±1,4ºC) no crescimento populacional de *D. birgei*, com a população mantendo-se abaixo de 6.500 x 10^2 indivíduos (Figura 2).

O crescimento populacional de *D. birgei* foi observado pela quantificação da taxa intrínseca de aumento, com r variando de 0,12 a 0,61. O maior valor de r ocorreu em 500ml, com 0,61, seguido pelo obtido no volume de 1,8L, 20L e os menores valores em 850L (A e B). Observa-se uma redução da taxa intrínseca à medida que o volume de cultura foi aumentando.

As médias de tamanho de *D. birgei* foram observadas para as diferentes fases de desenvolvimento. No volume de 850L (A), os adultos apresentaram 836,1μm de tamanho, 594,5μm para os jovens e 420,9μm para as neonatas. Em 850L (B) as médias de tamanho foram 1082,0μm para adultos e jovens 643,2μm. Nos meios em que a temperatura manteve-se mais baixa, o número de neonatas visualizado nas amostras foi pequeno e o tamanho dos adultos foi superior ao dos espécimes crescidos em 23,2±3,7ºC. Os tanques que iniciaram com maior temperatura (23,2±3,7ºC), apresentaram entre 25,5 e 37,9% de neonatas, 3,6 a 53,5% de jovens, e de 8,6 a 70,9% de adultos. Nos tanques que iniciaram em menor temperatura (21,1±1,4ºC) foram visualizadas poucas neonatas, enquanto jovens e adultos apresentaram percentuais variando de 8,3 a 37,9% e 62,1 a 81,7%, respectivamente.

O tempo de produção foi estimado em cerca de 27 dias para a obtenção de 850L de cultura, com densidade em torno de 2.500 indivíduos.L^{-1}. O período de cultivo foi cerca de 20 dias se iniciado com 1,8L e 14 dias a partir de 20L.

Algumas variáveis limnológicas foram observadas na cultura de *D. birgei* nos tanques de 850L (Tabela 4).

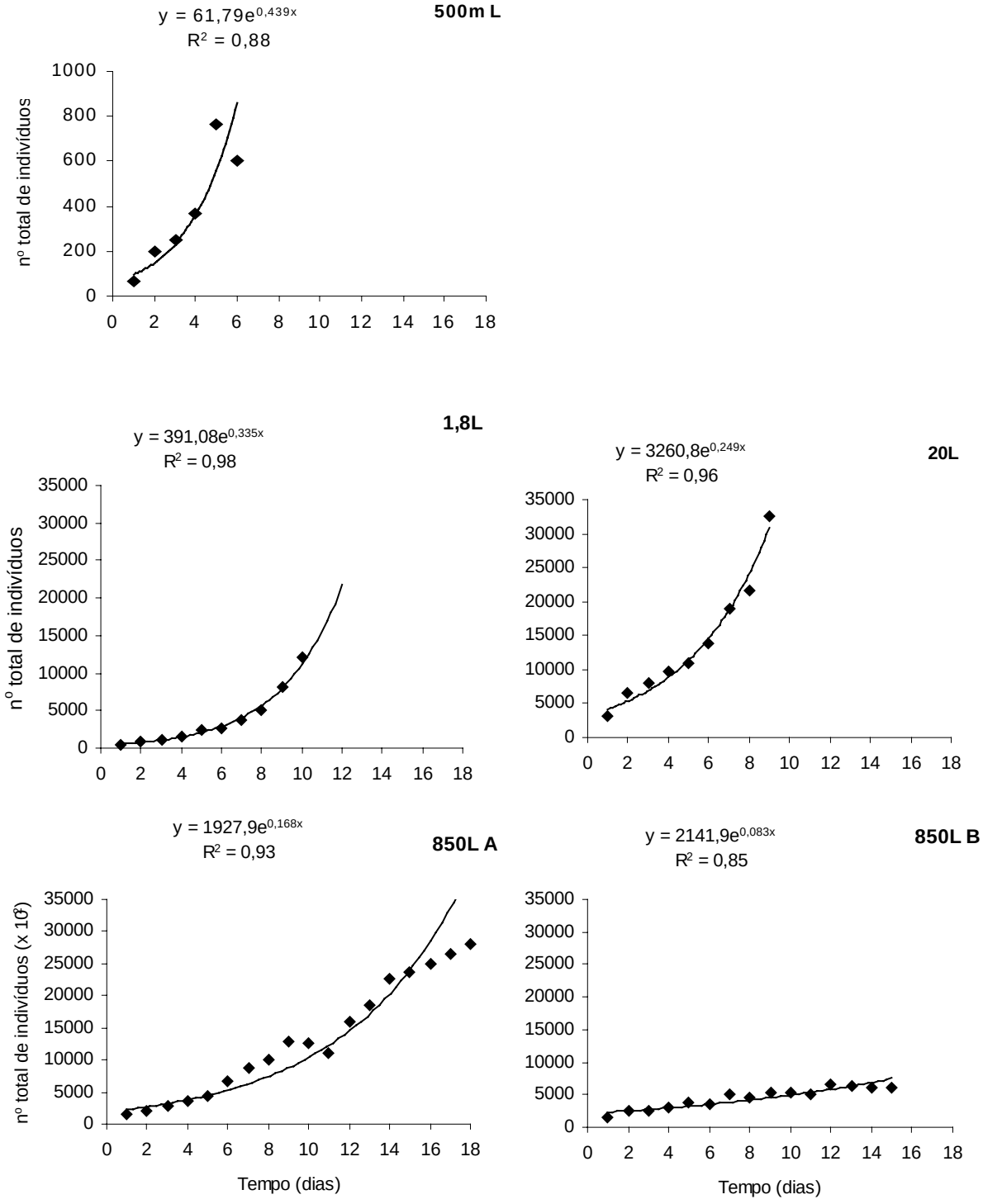
Em função da aeração, o oxigênio dissolvido manteve-se acima de 6 mg/L, o pH variou de ligeiramente ácido, 6,7 a alcalino variando de 7,3 a 7,7.

As maiores concentrações fósforo total e ortofosfato ocorreram nas réplicas A e menores nas réplicas onde ocorreram às menores temperaturas.

Tabela 4 - Valores médios e desvio padrão das características limnológicas da água de cultura de *Diaphanosoma birgei* durante o período experimental no volume de 850 L (A e B).

Características Limnológicas	Unidades	A		B	
		Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Réplica 4
Oxigênio	$mg.L^{-1}$	6,6 ± 1,4	7,1 ± 1,3	7,0 ± 1,0	6,4 ± 1,1
pH		7,6 ± 1,3	7,7 ± 1,4	7,3 ± 1,1	6,7 ± 0,4
Condutividade	$\mu.S.cm^{-1}$	97,5 ± 72,5	83,0 ± 57,0	94,5 ± 58,5	106,5 ± 51,5
Temperatura	^oC	22,9 ± 3,7	23,2 ± 3,7	22,1 ± 2,4	21,1 ± 1,4
Nitrito	$mg.L^{-1}$	357,8 ± 45,9	388,0 ± 15,7	335,0 ± 68,7	534,1 ± 130,4
Nitrato	$mg.L^{-1}$	1.415,9 ± 265,8	1.650,6 ± 31,1	1.500,4 ± 181,3	2.159,8 ± 478,2
Amônia	$mg.L^{-1}$	1001 ± 40,3	1045,8 ± 85,2	832,2 ± 128,5	963,6 ± 3
Fósforo total	$mg.L^{-1}$	733,4 ± 30,8	780,8 ± 16,6	694,4 ± 69,7	848 ± 83,8
Ortofosfato	$mg.L^{-1}$	360,2 ± 9,8	399,0 ± 29,1	331,4 ± 38,6	389,2 ± 19,3

A amônia, nitrito e nitrato apresentaram mudanças significativas após o 12º dia de cultura, com médias, até o 12º dia, de 230,84 $mg.L^{-1}$, 109,27 $mg.L^{-1}$ e 667,29$mg.L^{-1}$, respectivamente. A partir do 12º dia até o final da cultura, os valores médios foram 1.554,34$mg.L^{-1}$, 534,46 $mg.L^{-1}$ e 1.983 $mg.L^{-1}$.



Figuras 2 - Curvas de crescimento de *Diaphanosoma birgei* em 500ml a 850L. As curvas de crescimento 850L A e 850L B têm médias de temperatura diferentes (23,2± 3,7 e 21,1±1,4ºC, respectivamente).

Composição bioquímica

Para *A. gracilis,* as análises da composição bioquímica evidenciaram, em percentual de matéria seca, um teor de 50,5% de proteína bruta, 8,0% de extrato etéreo, 3,2% de fibra, 20,0% de carboidratos, 18,3% de cinzas e 4.583 cal/g. O nitrogênio protéico apresentou 32,6% de proteína na matéria seca.

O perfil de aminoácidos apresentou valores máximos para o ácido aspártico e ácido glutâmico. Todos os aminoácidos essenciais apresentaram valores superiores a 2% do total da proteína com valor máximo de 8,8% para fenilalanina e mínimo para metionina (1,7%). O triptofano apresentou teor elevado (Tabela 5).

O nitrogênio foi o composto em maior percentagem, seguido do fósforo e do cálcio. A composição mineral mostrou uma relação aproximada de 1:1 entre Ca e P. A alga também apresentou traços de boro, cobre e manganês (Tabela 5).

Tabela 5 - Perfil de aminoácidos (% na proteína) e composição mineral (matéria seca) de *Ankistrodesmus gracilis.*

Aminoácidos	*Ankistrodesmus gracilis*	Mineral	*Ankistrodesmus gracilis*
Ac. aspártico	10,7 ± 0,07	N (%)	7 ± 0,70
Ac. glutâmico	10,4 ± 0,07	P (%)	2,7 ± 0,60
Arginina*	7,5 ± 0,12	K (%)	0,8 ± 0,02
Cistina	0,7 ± 0,00	Ca (%)	2,6 ± 0,20
Fenilalanina*	8,8 ± 0,02	Mg (%)	0,4 ± 0,01
Glicina	6,4 ± 0,06	S (%)	0,5 ± 0,00
Histidina*	2,4 ± 0,01	Fe (%)	0,9 ± 0,01
Isoleucina*	3 ± 0,08	Zn (%)	0,03 ± 0,003
Leucina*	8,7 ± 0,04	B ($mg.kg^{-1}$)	27 ± 6,00
Lisina*	7,3 ± 0,19	Cu ($mg.kg^{-1}$)	115 ± 3,00
Metionina*	1,7 ± 0,01	Mn ($mg.kg^{-1}$)	153 ± 2,00
Prolina*	5,9 ± 0,04		
Serina	5,5 ± 0,06		
Treonina*	5,7 ± 0,02		
Triptofano*	3,8 ± 0,03		
Valina*	4 ± 0,06		

*aminoácidos essenciais

Para o *D. birgei*, as análises mostraram, em percentual de matéria seca, teores de 70,0% de proteína bruta, 8,7% de extrato etéreo, 4,3% de fibra, 5,5% de extrato não nitrogenado, 11,5% de cinzas e 4.627 cal/g.

Discussão

Crescimento

O meio NPK utilizado no cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* foi eficiente tanto em pequena como em larga escala, promovendo a fase exponencial em 5 dias. A velocidade de crescimento (k) foi semelhante entre os volumes, meios e condições de cultivo utilizadas, sendo a mais elevada em 11ml, provavelmente devido ao maior aproveitamento da luz neste pequeno volume. No volume de 500ml a baixa densidade pode ser explicada pela transição entre o meio de cultivo Chu_{12} e o NPK, sendo considerada como uma fase de adaptação da alga na mudança de um meio para o outro. Votolina *et al.* (1998) afirmaram que uma curta pré-aclimação a um novo meio é necessária para que as células desenvolvam-se normalmente no decorrer do cultivo.

O cultivo em 1,6L apresentou resultados semelhantes aos obtidos por Bachion (1996), com densidade de 5,08 x 10^6 células.ml^{-1} e superiores aos obtidos por Sipaúba-Tavares *et al.* (1999) com 2,4 x 10^6 células.ml^{-1}.

A curva de crescimento em 250 e 850L pode ter sido influenciada pelas condições da sala em relação à iluminação, que foi lateral e superior no tanque de 850L e somente superior para o tanque de 250L. Assim, a iluminação poderia ser a causa da semelhança entre as densidades nestes volumes em todas as fases de crescimento (indução, exponencial e estacionária), bem como em relação à velocidade de crescimento.

Delincé (1992) afirmou que a taxa de crescimento específico depende dos nutrientes externos e da concentração de nutrientes internos, além da luz e temperatura do meio. A interação da luz e limitação de nutrientes é complexa e o efeito de cada fator não pode ser analisado de maneira compartimentalizada. Porém, a limitação de luz tem um efeito maior que a limitação de nutriente, uma vez que eles não podem ser utilizados se a energia fornecida for insuficiente para sua assimilação.

Para o Cladocera *Diaphanosoma birgei,* a temperatura foi um fator que influenciou diretamente o crescimento, sugerindo certa preferência por temperaturas mais elevadas.

Davidson Jr. *et al.*(1998), pesquisando sobre variáveis ambientais e abundância de Cladocera, informaram sobre uma íntima relação entre a temperatura de superfície da água e abundância das espécies, entre as quais figurava *D. birgei*.

Neste estudo foi clara a relação entre o aumento do volume de cultivo e a diminuição da taxa de crescimento, provavelmente devido ao aumento do sombreamento nos maiores volumes, diminuindo a disponibilidade de luz para a microalga. Bachion (1996) trabalhando com *D. birgei* observou que ao aumentar o volume da cultura o r diminuiu de 0,37 em 2L para 0,18 em 5L, verificando que estes organismos apresentaram um período de adaptação às novas condições de cultura. Efeito semelhante foi encontrado por Sipaúba-Tavares *et al.* (1994) trabalhando com *Daphnia similis*, com r diminuindo de 0,48 (2L) para 0,27 (250L).

A diminuição da taxa intrínseca com o aumento do volume da cultura demonstra que as condições para o desenvolvimento da espécie tendem a decrescer, principalmente em função da temperatura. O ponto mais evidente foi a diferença entre nos tanques de 850L (A e B) empregando o mesmo sistema, mesmo manejo, porém em temperaturas diferentes, r de 0,17 nos tanques com temperatura mais alta e 0,12 no tanques com temperatura mais baixa. Amarasinghe *et al.* (1997) observaram que o r de *Diaphanosoma excisum* aumentou com a elevação da temperatura

Bachion (1996) obteve densidades de 6.000 indivíduos.L^{-1} em 10 dias em recipientes de 2L, com um máximo de 5.000 indivíduos.L^{-1} em 5L. Neste estudo dados semelhantes foram obtidos, atingindo uma densidade de 6.800 indivíduos.L^{-1} em 12 dias para 1,8L.

A temperatura influenciou a densidade populacional, com valor máximo de 6.480 x 10^2 indivíduos para 850L em temperatura de 21,1$\pm$1,4ºC e atingindo 28.133 x 10^2 indivíduos em temperaturas de 23,2$\pm$ 3,7ºC.

A temperatura também influenciou o tamanho de *D. birgei*; inverso ao ocorrido com o crescimento, os maiores tamanhos foram obtidos na temperatura mais baixa para as diferentes fases de desenvolvimento.

Neste estudo, as espécies produzidas em baixa temperatura permaneceram aclimatadas por um período maior do que aquelas que estavam em temperatura mais alta, influenciando assim no tamanho dos indivíduos. No ambiente natural, os

organismos são afetados pela quantidade, qualidade do alimento e pelas constantes mudanças nas condições ambientais. Sob condições de laboratório, estes fatores podem ser minimizados favorecendo um maior crescimento das espécies cultivadas.

A temperatura também influenciou a maior e menor abundância de organismos nas diferentes fases de desenvolvimento, ocorrendo uma redução no número de neonatas e jovens nos tanques em baixa temperatura, sugerindo provavelmente uma diminuição do processo reprodutivo, priorizando o gasto energético para o crescimento.

A qualidade da água de cultura também influenciou no crescimento dos organismos em sistemas de produção. No experimento de *D. birgei* os nutrientes estiveram elevados, com tendência a aumentar com o tempo, apresentando um pico ao redor do 10º ao 12º dia de experimento, quando a população atingiu 16.000 x 10^2 indivíduos. Uma possível fonte para o aporte de nutrientes ao meio foi o fertilizante NPK (20:5:20) utilizado como meio de cultura da alga, fornecida como alimento.

O manejo utilizado para manutenção de *D. birgei* nos tanques de 850L, ou seja, a retirada semanal de 100% da água, aeração constante, temperatura do ar controlada entre outros, favoreceu o controle das características limnológicas da água de cultura.

Composição bioquímica

A composição bioquímica das algas varia em função das condições de cultura, da composição do meio, fase de crescimento, além do tamanho da célula, digestibilidade e toxidade (Fábregas *et al*., 1998).

As características bioquímicas da microalga *A. gracilis* foram semelhanteses em proteína bruta e carboidrato quando comparada a *Chlorella vulgaris* (47,2% e 20,8%) (Tacon, 1987) e *Scenedesmus quadricauda* (43,6%, 24,4%) (FAO, 1983). Habib *et al.* (1997) utilizando meio POME para *C. vulgaris* encontraram valor de proteína ao redor de 26,45%, inferior ao obtido por *A. gracilis* neste estudo.

Geralmente as Chlorophyta são consideradas de baixo valor nutricional por serem deficientes em ácidos graxos poli-insaturados (Brown *et al.*, 1989).

Foi encontrados, neste trabalho, extrato etéreo semelhante ao obtido por Tacon (1987) para *C. vulgaris* (7,4%) e inferior ao encontrado para *S. obliquus* (13%).

A porção mineral da alga indicada pelas cinzas mostrou que o conteúdo foi semelhante ao encontrado por Habib *et al.* (1997) para *C. vulgaris* (18,6%) e superior a de *S. quadricauda* (7,4%) (FAO, 1983).

A fibra constitui o resíduo orgânico insolúvel, geralmente considerado como o carboidrato não disponível numa dieta ou alimento (Tacon, 1987). A fibra apresentou um valor (3,2%) inferior ao encontrado pela FAO (1983) para *C. vulgaris* (8,0%) e *S. quadricauda* (6,3%).

Estimar o valor calórico é um dos requisitos importantes na avaliação de um alimento. O valor de energia foi superior ao encontrado por Khan *et al.* (1996) para as Chlorophyceae *Spirogyra sp., Hydrodictyon sp.* e *Pithophora sp.* com 3.970; 3.790 e 3.700 cal/g, respectivamente e superior às algas *C. vulgaris* (3.086 cal/g) e *S. obliquus* (3.679 cal/g) (FAO, 1983).

Brown & Jeffrey (1992) ao analisar o perfil de aminoácidos da *Chlorella prototheco*ides, verificaram alta concentração de arginina e histidina, porém mais baixas de leucina, lisina, triptofano, alanina e ácido aspártico, quando comparadas a outras espécies marinhas.

A alga *A. gracilis* apresentou teor de histidina próximo ao de *C. prototheco*ides (3%) e as concentrações dos outros aminoácidos foram semelhanteses às encontradas para muitas espécies marinhas.

O triptofano é um dos aminoácidos encontrados em menor concentração com pico de 3,9%. O teor obtido para *A. gracilis* foi bem elevado, comparado aos encontrados nas diatomáceas (1 a 3,3%) por Brown *et al.* (1997).

Fábregas & Herrero (1986) verificaram que as exigências nutricionais *Cyprinus carpio* e *Salmo gairdneri* poderiam ser supridas com todos os minerais existentes na alga *Chlorella stigmatophora* com exceção do P, que nesta alga é ao redor de 0,6%; *A. gracilis* apresenta aproximadamente quatro vezes mais P que *C. stigmatophora.*

O alto teor de Ca e P torna *A. gracilis* uma fonte importante destes elementos na alimentação, apresentando teores bem mais elevados que *S. quadricauda* com 0,6% Ca e 0,4% de P (FAO, 1983) e *S. acutus* com 0,2% de Ca e 1,8% de P (Tacon, 1987).

O Fe é indispensável ao transporte de oxigênio. Comparando *A. gracilis* com macroalgas como *Eisenia bicyclis e Hijikia fusiforme* usadas na alimentação humana, a composição mineral foi maior em Fe, Zn, Ca, P, Cu e Mn sendo a *H. fusiforme* superior apenas em Mg (0,6%). (Kolb *et al.*, 1999).

Khan *et al.* (1996), avaliando macroalgas de água doce para alimentação conseguiram dados médios de K (0,3%), P(0,03%), Fe (0,01%), Mg (0,01%), Ca (0,002%), Zn (0,001%), Cu (0,0001%) todos inferiores aos obtidos para *A. gracilis*.

A vantagem de *A. gracilis* apresentar altas concentrações de minerais a identifica como uma espécie adequada como alimento para os organismos aquáticos, inclusive diretamente utilizada para peixes água doce que possuem exigências maiores de minerais que os marinhos.

Em relação aos organismos zooplanctônicos, a composição bioquímica pode variar com as estações do ano e com os níveis de nutrientes na água. O percentual de proteína encontrado para *D. birgei* neste estudo foi superior ao encontrado por Peña (1998) para *Diaphanosoma celebensis*, ao redor de 55,1% e o teor de cinzas para estas duas espécies foi o mesmo, 11,5%.

Tacon (1987) e Kibria *et al.* (1997), trabalhando com os gêneros *Moina* e *Daphnia* obtiveram um percentual de proteína abaixo do encontrado neste estudo. Já o percentual de cinzas foi maior para o gênero *Daphnia* com 20% e 12,7% e menor para *Moina* 6,8%, quando comparado ao de *D. birgei*.

A composição bioquímica das espécies estudadas pode variar em função das condições intrínsecas das espécies e do recurso alimentar.

Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que a Chlorophyceae *Ankistrodesmus gracilis* e o Cladocera *Diaphanosoma birgei* são bem adaptados as condições de cultivo em larga escala em meio de baixo custo (NPK), com produção elevada de biomassa em curto período de tempo. O perfil bioquímico obtido neste trabalho para as espécies produzidas demonstra que elas podem ser uma opção para uso como alimento de organismos aquáticos ou como suplemento no uso de dietas artificiais.

Referências bibliográficas

Alonso, N.; Hirs, C.H.W. Automation Of Sample Application In Amino Acid Analysers, *Anal. Biochem*., *23*:272-278, 1968.

A.O.A.C. Association Of Official Agriculture Chemists, Washington, *Official Methods Of Analysis Of The Association Of Agriculture Chemists*, Arlington, 1984.

Amarasinghe, P.B.; Boersma, M.; Vijverberg, J. The effect of temperature, food quality on the growth and development rates in laboratory-cultured copepods and cladocerans from a Sri Lankan reservoir, *Hydrobiologia, 350*:131-144, 1997.

Arredondo-Figueroa, J. L.; Lara-Isassi, G.; Alvarez-Hernandez, S. Liquid manure as a culture medium for three species of *Chlorella* (Chlorophyta), *Cryptogamie, Algol.*, *19*(3):229-235, 1998.

Bachion, M.A. *Estudo do crescimento e desenvolvimento de três espécies zooplanctônicas submetidas a diferentes dietas alimentares,* Jaboticabal, 1996. (Master's Thesis) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista.

Bataglia, O.C.; Furlani, A.M.C.; Teixeira, J.P.F.; Gallo, J.R. *Métodos de análise química de plantas,* Campinas: Instituto Agronômico, Boletim Técnico n. 78, 1983.

Birch, L.C. The intrinsic rate of natural increase of na insect population, *J. Animal Ecol., 17*:15-26, 1958.

Borowitza, M.A.; Borowitza, L.J*. Micro-algal, biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1989.

Bottrell, H.H.; Duncan, A.; Gliwicz, Z.M.; Grygierek, E.; Herzig, A.; Hillbricht-Ilkowska, A.; Kurasawa, H.; Larsson, P.; Weglenska, T. A review of some problems in zooplankton production studies. *Norw. J. Zool*, *24*:419-456, 1976.

Brown, M.R.; Jeffrey, S.W.; Garland, C.D. *Nutritional aspects of microalgae used in mariculture; A literature review*, CSIRO Mar. Lab. Rep.**,** n. 2205, 1989.

Brown, M.R.; Jeffrey, S.W. Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 1. Amino acids, sugars and pigments, *Aquaculture, 161*:91-113, 1992.

Brown, M.R.; Jeffrey, S.W.; Volkman, J.K.; Dunstan, G. A. Nutritional properties of microalgae for mariculture, *Aquaculture*, *151*:315-331, 1997.

Davidson Jr., N.L.; Kelso, W.E.; Rutherford, D.A. Relation between enviromental variables and the abundance of cladocerans and copepods in Atchafalaya River Basin, *Hydrobiologia, 379*:175-181, 1998.

Delincé, G. *The ecology of the fish pond ecossistem,* Dordrecht: Kluter Academic, 1992.

Fábregas, J.; Herrero, C. Marine microalgae as a potential source of minerals in fish diets, *Aquaculture*, *51*:237-243, 1986.

Fábregas, J.; Otero, A.; Morales, E.D.; Arredondo-Veja, B.O.; Patiño, M. Modification of the nutritive value of *Phaeodactylum tricornutum* for *Artemia* sp. in semicontinuous cultures, *Aquaculture*, *169*:167-176, 1998.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *Fish feeds and feeding in developing countries*, Rome: FAO, 1983.

Golterman, H.L.; Clymo, R.S.; Ohnstad, M.A. *Methods for physical and chemical analysis of freshwater* IBP, London: Blackwell Sci. Pulb., 1978.

Habib, M.A.B.; Yusoff, F.M.; Phang, S.M.; Ang, K.J.; Mohamed, S. Nutritional values of chironomid larvae grown in palm oil mill effluent and alga culture, *Aquaculture, 158*:95-105, 1997.

Hardy, E.; Castro, J.G.D. Qualidade nutricional de três espécies de clorofíceas cultivadas em laboratório, *Acta Amazonica*, 30(1):39-47, 2000.

Khan, A.R.; Begun, Z.N.T.; Rahin, A.T.M.A.; Salamatullah, Q. A comparative study on proximate composition and minerals contents of three fresh water green algae. *Bangladesh J. Bot.*, *25*(2):189-196, 1996.

Kibria, G.; Nugegoda, D.; Fairclough, R.; Lam, P.; Bradly, A. Zooplankton: Its biochemistry and significance in aquaculture. *Naga The ICLARM Quarterly,* april-june, p.9-15, 1997.

Kolb, N.; Vallorani, L.; Stocchi, V. Chemical composition and evaluation of protein quality by amino acid score method of edible brown marine algae Arame (*Eisenia bicyclis)* and Hijiki (*Hijikia fusiforme*), *Acta alimentaria*, *28*(3):213-222, 1999.

Koroleff, F. Determination of Nutrients. In: Grasshof, K. (ed.). *Methods of Seawater Analysis*. Verlay Chimie Wenheim, 1976. p. 117-181.

Lucas, B.; Sotelo, A. Effect of diferent alkalies, temperatures and hydrolises times on tryptophan determination of pure proteins and foods, *Anal. Biochem*., *109*(1):192-197, 1980.

Macedo, C.F; Pinto-Coelho, R.M. Taxas de filtração de *Daphnia laevis* e *Moina micrura* em relação às clorofíceas *Scenedesmus quadricauda* e *Anlistrodesmus gracilis*, *Acta Limnol. Bras*., *12*:1-10, 2000.

Moore, S.; Spackman, D.H.; Stein, W.H. Chromatography of amino acid on sulfonated polystyrene resins, *Anal. Chem., 30*(7):1185-1190. 1958.

Peña, M.R.; Fermin, A.C.; Lojera, D.P. Partial replacement of *Artemia* sp. by the brackishwater caldoceran, *Diaphanosoma celebensis* (Stingelin), in the larval rearing of the sea bass*, Lates calcarifer*, *The Israeli Journal of Aquaculture- Bamidgeh, 50*(1):25-32, 1998.

Sipaúba-Tavares, L.H.; Braga, F.M. Study on feeding habits of *Piaractus mesopostamicus* (Pacu) larvae in fish ponds, *Naga, The ICLARM Quartely, 22*(1):24-30, 1999.

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*, *6*(1):93-106, 1993.

Sipaúba-Tavares, L.H.; Pelicioni, L.C.; Olivera, A. Use of inorganic (npk) and the chu12 medium for cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* in laboratory, *Brazilian Journal of Ecology*, *3*(1), Não paginado, 1999.

Sipaúba-Tavares, L.H.; Bachion, M.A ; Rocha, O. Estudo do crescimento populacional de três espécies zooplanctônicas em laboratório e o uso do plâncton na alimentação de alevinos de *Oreochromis niloticus* (tilápia) e *Astyanax scabripinis paranae* (lambari), *Rev. UNIMAR*, *16*(3):189-201, 1994.

Spackman, D.H.; Stein, W.H.; Moore, S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem., 30*(7):1190-1206,1963.

Stein, J. *Handbook of phycological methods; Culture methods and growth measurements*, Cambridge: University Press, 1973.

Tacon, A.G.J. *The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp- A training manual 2. Nutrient sources and composition.* Brasília: FAO, 1987.

Votolina, D.; Nieves, M.; Navarro, G.; Oliva, T.; Peraza, D. The importance of acclimation for evaluation of the alternative media for microalgae growth, *Aquaculture Engeneering*, *19*:7-15, 1998.

Capítulo 3-

Aspectos econômicos da cultura em larga escala da Chlorophyceae *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korsikov, e do Cladocera *Diaphanosoma birgei* (Korineck, 1981) em laboratório

Aspectos econômicos da cultura em larga escala da Chlorophyceae *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korsikov, e do Cladocera *Diaphanosoma birgei* (Korineck, 1981) em laboratório

Resumo: O objetivo deste trabalho foi determinar o custo operacional de produção em larga escala da Chlorophyceae *Ankistrodesmus gracilis* e do Cladocera *Diaphanosoma birgei* em laboratório. A cultura foi realizada no Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton do Centro de Aqüicultura da UNESP (Jaboticabal - SP). A alga e o cladócero foram produzidos em sistema estático, com volumes que variaram de 11ml a 850L. As algas foram cultivadas em meio de cultura Chu_{12} e solução de adubo NPK (20:5:20) sob fotoperíodo de 24 horas. Os Cladocera foram alimentados com *A. gracilis* e criados em temperatura de 23,3±3,6ºC com fotoperíodo natural. Foi testada a concentração da alga por centrifugação e sedimentação, obtendo resultados semelhantes de aproveitamento de 20% das células. Obteve-se um custo de R$ 0,05 por litro de alga ou Cladocera produzido. Os itens que mais pesaram no custo de produção do plâncton foram mão-de-obra e energia elétrica.
Palavras-chave: plâncton, cultivo em larga escala, custo de produção

Abstract: The objective of this work was to determine in detail the operational cost of large scale culturing of the Chlorophyceae *Ankistrodesmus gracilis* and of the Cladocera *Diaphanosoma birgei* in laboratory. The culture was carried out at the Limnology Laboratory and Plankton production at the Aquaculture Center UNESP (Jaboticabal - SP). The algae and the Cladocera were cultured in batch systems with volumes varying from 11ml to 850L. The algae were cultivated by Chu_{12} e NPK (20:5:20) means with a light photoperiod of 24 hours. The Cladocera were fed with *A. gracilis* and cultured at 23,3±3,6ºC temperature with a natural photoperiod. The algae concentration was tested by centrifugation and sedimentation, thus attaining a similar utilization result of 20% of the cells. It was obtained a cost of R$ 0,05 per liter of algae or cladoceran produced. The largest part of the expenses on the plankton production was spent on hand labor and electricity.
Keywords: plankton, massive culture, production cost

Introdução

Para o estabelecimento de um sistema de cultura de plâncton, além de aspectos biológicos e nutricionais dos organismos cultivados, é importante avaliar o local e o tipo de material a ser utilizado, pois podem interferir no desenvolvimento dos meios, afetando ou favorecendo o crescimento das diferentes espécies planctônicas. Além disso, outros fatores como aeração, temperatura, penetração de luz e período de iluminação são de extrema relevância, podendo ser ajustados de acordo com o objetivo da cultura (Sipaúba-Tavares & Rocha, 2001).

Dados que evidenciem a importância relativa dos diversos fatores que contribuem para o alto custo da produção de alimento vivo para a criação de larvas aquáticas são escassos, devido à falta de avaliação individual e informações mais precisas. Contudo, os custos são variáveis em função de cada instalação de produção, localização geográfica e suprimentos entre outros (Votolina *et al.*, 1998).

O plâncton é uma fonte valiosa de proteínas, aminoácidos, lipídios, ácidos graxos, minerais e enzimas, sendo um substituto de baixo custo, quando comparado à farinha de peixe e *Artemia,* contendo elementos essenciais ao crescimento do peixe (Kibria *et al.*, 1997).

A produção controlada de fitoplâncton e zooplâncton marinhos e de água salobra já é bem conhecida, principalmente em países como Japão, França, Espanha, Estados Unidos, Peru entre outros, mas em relação ao plâncton de água doce ainda são necessários estudos voltados para a produção em larga escala com a utilização de espécies regionais de fácil obtenção de inóculo (Sipaúba-Tavares & Rocha, 2001).

A necessidade de utilização de organismos planctônicos de água doce como alimento natural para as larvas de peixe já é bem conhecida, porém até o presente momento, não há uma escala comercial de produção destes organismos (Sipaúba-Tavares & Rocha, 2001).

O plâncton pode ser oferecido como alimento em forma líquida ou em pasta. Na primeira, o alimento é fornecido no meio em que foi produzido. Na segunda, o alimento é concentrado, podendo ser congelado ou liofilizado. A cultura líquida pode tornar-se uma fonte de doenças bacterianas (Esquivel & Votolina, 1996) e variar sua qualidade de acordo os diferentes lotes de cultura oferecidos, prejudicando as larvas alimentadas. A conservação e armazenamento de microalgas podem assegurar uma disponibilidade imediata e constante de alimento com boa qualidade (Cañavate & Lubinn, 1995).

Vários métodos de concentração de microalgas estão disponíveis, entretanto a seleção de muitos depende, fundamentalmente, do uso específico de células algais e dos organismos zooplanctônicos além de uma avaliação do custo e da eficiência do processo.

Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar o custo de produção em larga escala da Chlorophyceae *Ankistrodesmus gracilis* e do Cladocera *Diaphanosoma birgei* em laboratório e avaliar o rendimento da concentração da alga por sedimentação e por centrifugação.

Materiais e métodos

Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis*

A cepa de *Ankistrodesmus gracilis* foi proveniente da Universidade Federal de São Carlos, nº 005CH, isolada da Represa do Broa (SP, Brasil). Posteriormente, foi cultivada no Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton (Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura - Jaboticabal, SP) em sistema de cultivo estático, não axênica, com aeração constante e temperatura de 24±2ºC . Foram utilizados os meio Chu_{12} e NPK (20:5:20) (Sipaúba-Tavares & Rocha, 1993). O fotoperíodo foi de 24 horas, sob lâmpadas fluorescentes (Phillips daylight) com intensidade média de 4.000 lux e 1.100 lux para pequena e larga escala, respectivamente. O volume em pequena escala variou de 11ml a 10,8L (recipientes em vidro) e em larga escala de 250 e 850L (tanques cilíndrico-cônicos em fibra de vidro). As repicagens entre os diferentes volumes ocorreram sempre que a cultura atingia a fase exponencial (Tabela 1). O acompanhamento do crescimento algal foi diário, com contagem da densidade numérica das algas em câmara de Neubauer, utilizando-se três repetições de contagem para cada volume testado.

Separação da alga no meio de cultura

Foram testadas duas maneiras de se separar a biomassa da alga *Ankistrodesmus gracilis* do meio de cultivo: por centrifugação e por sedimentação. Na primeira foi utilizada uma desnatadeira modelo GR-35 com capacidade de processamento 225L/hora e recipiente de armazenamento em inox. Foram processados 600 L de três tanques diferentes, com densidade celular semelhante na

fase exponencial de cultivo. O concentrado foi contado, verificado o volume, liofilizado e pesado para cálculo do rendimento da centrifugação.

Tabela 1 - Sistema de cultivo em larga escala de *Ankistrodesmus gracilis*

Volume da cultura	Volume do inóculo	Meio de cultura (volume)	(meio)	Intensidade Luminosa (Lux)	Dias entre repicagens
11ml	1ml	0,007ml	Chu_{12}	4.000	7
500ml	80ml	0,5ml	NPK	4.000	6
1,6L	200ml	3ml	NPK	4.000	4
10,8L	2,8L	20ml	NPK	4.000	4
250L	21,6L	500ml	NPK	1.100	5
850L	250L	1,3L	NPK	1.100	-

Na sedimentação, foi utilizado para floculação da microalga Chitosan, conforme recomendado por Morales *et al.* (1985), Lubiàn (1989), Chen *et al.* (1998), sendo realizados ensaios para determinação da melhor concentração para a sedimentação da alga *A. gracilis*. Após diluição do Chitosan em ácido acético a 1% (Buelma *et al.,* 1990), foi utilizada uma concentração do floculante de 5mg/L, considerada, segundo testes prévios, a mais eficiente para esta espécie de alga. A densidade média da alga foi de 13,2 $x10^5$ células.ml^{-1}, no final da fase exponencial, com pH 5,8±0,1 e temperatura de 25±2,0ºC.

Especialmente para os testes com sedimentação, foram utilizados recipientes transparentes de fundo cônico com capacidade de 1,8L e o material depositado foi coletado por sifonagem no fundo dos recipientes. O tempo de sedimentação foi verificado a cada 30 minutos. O material concentrado foi seco em estufa a 60ºC até a estabilização do peso e calculado o teor de umidade da amostra.

Testes posteriores verificaram eficiência da floculação das algas através da diferença entre a densidade ótica inicial e final, medida em espectrofotômetro a 678nm (Stein, 1983). Esta medida teve como objetivo a avaliação da eficiência do Chitosan na floculação da alga, independentemente do sucesso do método de coleta da biomassa concentrada utilizado.

Criação de *Diaphanosoma birgei*

O Cladocera *D. birgei* foi coletado nos viveiros da Universidade Estadual Paulista com rede de plâncton de 58μm de abertura de malha, isolados e cultivados no Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton (LLPP), Centro de Aqüicultura (Jaboticabal, São Paulo). Para o cultivo foram utilizados béqueres de 100ml, baldes translúcidos graduados de 20L e finalmente tanques cilíndricos cônicos com capacidade de 850L (fibra de vidro). O sistema de cultura (Tabela 2) foi semi-estático, com volume variando de 100ml a 850L. Os organismos foram alimentados diariamente com a alga *A. gracilis* na densidade de 25 x 10^4 cel.ml^{-1}. Este sistema foi adaptado para larga escala baseado em trabalho anterior (Sipaúba-Tavares & Rocha, 1993).

Tabela 2- Sistema de cultivo de *Diaphanosoma birgei*

Volume (L)	População inicial (indivíduos.L^{-1})	Alimento		Intervalo entre repicagens (dias)
		Tipo	Quantidade (células.ml^{-1})	
0,1	750	*A. gracilis*	25 x 10^4	5
0,5	500	*A. gracilis*	25 x 10^4	6
1,8	1.700	*A. gracilis*	25 x 10^4	6
20	750	*A. gracilis*	25 x 10^4	6
850	1.100	*A. gracilis*	25 x 10^4	10

Peso seco de *Diaphanosoma birgei*

O peso seco foi determinado usando balança Meltler de precisão (10,1μg) de acordo com a metodologia de Berberovic & Pinto-Coelho (1989). Ao atingirem o pico de crescimento populacional em quatro tanques de 850L, estes foram esvaziados e os organismos concentrados em balde com tela de 200μm. Foram retiradas 3 amostras de organismos e contados em microscópio estereoscópio Wild-Leitz M-5. Foram coletados 150 organismos dos cultivos, divididos em grupos de 50 e colocados em papel filtro previamente pesados e secos para a determinação do peso seco e umidade.

Análise econômica

Para análise econômica foi utilizada a metodologia do custo operacional de produção descrito em Matsunaga *et al.* (1976). A estrutura do custo operacional de produção considera os dispêndios em dinheiro e a depreciação dos bens duráveis

empregados diretamente no processo produtivo. Nesta estrutura, a remuneração dos fatores de produção é dada pela diferença entre a receita e o custo operacional total.

No custo operacional efetivo, foram considerados os dispêndios com mão-de-obra (um técnico e um profissional de nível superior trabalhando meio período), geral (luz e telefone), insumos (fertilizantes, vitaminas), materiais de consumo e outros usados na limpeza, manutenção dos equipamentos e do laboratório (5% ao ano sobre o valor do bem). Em outros custos foi inserida a depreciação das instalações, equipamentos, materiais de laboratório e de escritório, calculada pelo método linear que consiste de:

Depreciação/ano = (Valor do bem novo – Valor residual)/ Vida útil (anos)

Para a determinação do custo e da produção, foram considerados para *Ankistrodesmus gracilis*, 15 tanques (850L) de produção de alga para o período de 12 meses de produção e na produção, de *Diaphanosoma birgei* foram considerados 15 tanques (850L) de produção no período de 8 meses, levando-se em conta as temperaturas médias da região e a faixa de conforto de temperatura do organismo (26-30^{o}C). A produção de plâncton geralmente encontra-se agregada a um outro produto (larvicultura de peixes, camarões), não possuindo no momento um preço de mercado. Neste estudo, compararam-se os dados obtidos com alguns semelhantes no mercado, como: *Artemia* em flocos, plâncton artificial, algas usadas como suplemento alimentar e probióticos na indústria farmacêutica.

Resultados

Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* e *Diaphanosoma birgei*

De acordo com os dados obtidos no sistema de cultivo empregado para *A. gracilis*, a estimativa seria uma produção média de 45.000L de alga por mês (12 meses de produção) com densidade média de 12,6 x 10^5 cel.ml^{-1}. A produção anual estimada foi de 540.000L.ano^{-1} (aproximadamente 635 tanques de 850L.ano^{-1}), sendo utilizados cerca de 97.750L na alimentação do zooplâncton.

Foram necessárias 6 horas de trabalho ininterruptas da desnatadeira para processar 600L de cultura, com perda de 77% das células na centrifugação.

Nos testes com chitosan foram necessárias 10 horas para sedimentação das

células algais, com aproveitamento de 20% das células. Nos dois sistemas, a produção média foi de 42,5g (peso seco) por tanque de 850L, ou seja, ou 50 mg/L de cultura. A umidade do material foi de 99,6±0,1%.

As diferenças entre as densidades ópticas, antes e depois da adição de chitosan, mostraram uma eficiência de 92% da floculação com este agente. Porém, a contagem da densidade da biomassa concentrada revelou um rendimento de apenas 33% das células.

Após os três primeiros meses de adaptação do sistema (90 dias), a produção do laboratório foi de dois tanques de 850L de *D. birgei* por dia. A densidade média destas culturas foi de 2.500 indivíduos.L^{-1}. O total da produção mensal (8 meses de produção) foi de 4,8 x 10^8 indivíduos criados, totalizando 190.000L de produção anual (aproximadamente 224 tanques de 850L/ano). As amostras mostraram um percentual de umidade de 94,0 ± 2,2% e as médias do peso seco foram 4,1μg; 2,7μg; 6,0μg e 6,6μg em quatro tanques, respectivamente e o peso seco médio considerando todos os tanques foi 4,8μg.

Análise econômica

Na Tabela 3 estão apresentados os dados relativos ao custo de produção da alga e do Cladocera. O custo operacional total para a produção de 730.000L.ano^{-1} foi de R$ 34.011,48, sendo que deste total, R$ 18.216,00 são para a manutenção de um técnico especializado trabalhando meio período e um auxiliar em período integral.

Os gastos em itens gerais foram bem elevados (R$ 5.760,00). A maior parte deste custo foi representado pela energia elétrica devido à utilização de lâmpadas 24 horas por dia para o crescimento da cultura algal e de aparelhos que funcionam 24 horas, como o soprador responsável pela aeração constante das culturas. O custo de manutenção de equipamentos, materiais de laboratório e a depreciação são fatores importantes nos custos. Os equipamentos neste sistema de produção estão sujeitos a trabalhar muitas horas seguidas e funcionar em ambiente úmido. O uso de fertilizantes alternativos apresentou baixo custo, contribuindo muito pouco para o custo operacional total.

Portanto, através dos dados de produção e biomassa obtidos neste estudo tem-se os seguintes custos unitários: no caso da alga nos tanques de 850L obteve-se a produção de 42,5g de peso seco com um custo de R$ 0,05.L^{-1}, totalizando R$ 42,50 por tanque ou R$1,00.$g^{-1}$ de alga seca.

Para o Cladocera, nos 850L de tanque, obteve-se a produção de 10,3g de peso seco com um custo de R$ 0,05.L^{-1}, totalizando R$ 42,50 por tanque ou R$ 4,13.g^{-1} de Cladocera seco.

O custo obtido neste estudo, por litro do plâncton foi R$ 0,05 (cinco centavos) semelhante ao comumente utilizados na alimentação de peixes.

Tabela 3 - Custo de produção de 730.000L de *A. gracilis* e *D. birgei* em Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton (LLPP), em R$ (Reais).ano^{-1} de fevereiro de 2001.

1-Custo Operacional Efetivo (C.O.E.)		R$/ano	%
Mão de obra		18.216,00	53,56
Nível superior, técnico			
Gerais		5.760,00	16,94
Luz, telefone			
Insumos		80,00	0,24
Fertilizantes, complexo vitamínico			
Materiais Diversos		157,47	0,46
Esponjas, vassouras...			
Manutenção do Equipamento		1.176,00	3,46
Microscópios, balanças, bombas..			
Manutenção das Instalações		1.864,75	5,49
Instalações, captação de água			
	Subtotal	**28.094,22**	**-**
2-Outros Custos - Depreciação			
Instalações		2.522,73	7,42
Laboratório, bomba de captação de água			
Equipamentos		2.633,43	7,74
Microscópios, balanças, bombas			
Materiais de Laboratório		1.582,95	4,65
Vidraria			
Diversos		18,15	0,04
Mobília, botijão de gás			
	Subtotal	**6.757,26**	**-**
3-Custo Operacional Total (C.O.T.)		**34.011,48**	100,00
	(C.O.T./ Litro)	**0,05**	

Discussão

Cultura de *Ankistrodesmus gracilis* e *Diaphanosoma birgei*

Os resultados deste estudo quanto ao número de algas produzidas foram adequados, porém adaptações e mudanças no sistema, tais como aumento da intensidade luminosa e maior transparência dos tanques, poderiam incrementar a densidade em maiores volumes, aumentando o número de células produzidas,

semelhante ao conseguido em menor escala por Sipaúba-Tavares & Rocha (1993) e Bachion (1996).

Olivera & Sipaúba-Tavares (2000), trabalhando com *Tetraselmis tetrathele* cultivada em pequena escala (10L) obtiveram um número de células mais elevado do que quando cultivada em escala maior (2.000L) com cerca de 418 x 10^4 células.ml^{-1} e 44 x 10^4 células.ml^{-1}, respectivamente.

O crescimento da alga é afetado por inúmeros fatores abióticos como luz, carbono inorgânico, nutrientes, água, temperatura, além de fatores como o tipo e a forma do sistema de cultivo.

Além do cultivo em meio líquido e seu oferecimento direto aos organismos zooplanctônicos e na larvicultura de peixes, pode-se também obter uma pasta algal utilizada diretamente como alimento ou congelada ao longo do ano e posteriormente oferecida na criação de organismos aquáticos.

Em experimentos com crio-preservação, Cañavate & Lubinn (1995) relataram que *Tetraselmis chuii, Nannochloris atomus* e *Nannochloris gaditana* apresentaram alta tolerância ao congelamento, com médias de viabilidade de 97,9%, 80,5% e 61,1%, respectivamente.

Esquivel & Votolina (1996), após analisarem amostras de algas conservadas dois meses após a coleta, constataram que a alga congelada em freezer (-20ºC) possuía composição bioquímica mais próxima da alga fresca, quando comparada às amostras liofilizadas e secas em estufa.

Para a produção de uma pasta, o manejo e a técnica empregada são fatores primordiais para qualidade e quantidade adequadas. Neste estudo, a centrifugação pode ter sido prejudicada pela desnatadeira, uma vez que este aparelho é adequado para leite, mais denso que a cultura de algas. Assim, adaptações na velocidade da mesma talvez possam no futuro torná-la mais eficaz.

Maccausland *et al*. (1999) utilizou uma centrífuga modificada "Sharples" na produção de pasta de alga e constatou que apesar de uma perda no valor nutricional no processo de concentração e armazenagem quando comparada a alga viva, seu uso obteve bons resultados na alimentação de larvas de animais aquáticos.

Chen *et al*. (1998) concentraram *Scenedesmus quadricauda* usando um coletor aniônico e obtiveram uma eficiência de 90% na floculação em pH de 8±0,1, justificando que as algas estão positivamente carregadas quando o pH está abaixo de 8,0, aumentando as alterações eletrostáticas e tornando a separação da alga mais efetiva.

Neste estudo a temperatura variou de 25 a 27ºC e o pH (5,8±0,1) manteve-se dentro da faixa recomendada. Os testes posteriores mostraram a eficiência de chitosan como floculante, com resultados semelhantes ao encontrados por diferentes autores utilizando o mesmo composto (Morales *et al.*, 1985; Lubiàn, 1989; Buelma *et al.,* 1990).

Estes dados sugerem que a falha do processo de sedimentação pode estar relacionado a ineficiência do sistema de coleta (sifonamento) da alga, ou ao sistema de contagem das células. O chitosan faz com que as células fiquem aglomeradas e falhas na contagem podem sobreestimar a densidade contada.

O tempo de floculação foi elevado, muito superior ao encontrado por Buelma *et al*. (1990), de 40 minutos.

Novos testes com o objetivo de reduzir o tempo de floculação e aumentar a eficiência dos métodos para coleta e contagem da biomassa concentrada devem ser testados e avaliados em trabalhos posteriores.

Neste estudo, os dados referentes a peso seco foram superiores àqueles encontrados por Bachion (1996) com a mesma espécie e condições similares de cultivo.

A baixa biomassa alcançada por *D. birgei* pode ser solucionada com o aumento na densidade de cultura, uma vez que a tecnologia em larga escala está em processo de aperfeiçoamento. Neste trabalho, alguns tanques de cultivo atingiram a densidade de 3.500 indivíduos. L^{-1}, em geral com média de 2.500 indivíduos.L^{-1}.

Bachion (1996), trabalhando em pequena escala (5L) com esta espécie, obteve picos de densidades entre 4.000 e 5.000 indivíduos.L^{-1} com 10 dias de crescimento, indicando que a espécie é promissora.

Análise econômica

Os itens que mais contribuíram com o custo foram mão-de-obra e energia elétrica. Para reduzir os gastos com pessoal, poderiam ser analisados métodos que necessitassem menos intervenção humana; porém este fator é difícil e implica em usar um sistema extensivo de baixa produtividade ou um sistema superintensivo podendo encarecer ainda mais, necessitando de estudos mais detalhados destas possibilidades.

O consumo de luz poderia ser reduzido de três formas distintas: 1) usos de tanques externos para cultivo aproveitando a luz solar, neste caso cuidados devem ser tomados para evitar a contaminação dos cultivos por insetos aquáticos; 2) mudança de sistema de tanques do tipo fibra de vidro para sacos de polietileno, com culturas em

menor volume atingindo maiores densidades e aproveitando melhor a luz; 3) redução do período de luz (atualmente 24 horas). A utilização de um sistema que tivesse semelhança ao fotoperíodo natural, poderia reduzir o consumo de energia sem prejudicar a produção de fitoplâncton.

Pesquisas vêm sendo desenvolvidas utilizando fertilizantes como meio de cultura a fim de diminuir os custos, uma vez que os meios de cultura utilizados são caros. O fertilizante alternativo demonstrou ser eficiente para a produção em larga escala e o período de tempo entre as diferentes fases de crescimento foi semelhante àqueles obtidos em pequena escala por Sipaúba-Tavares & Rocha (1993) e Hardy & Castro (2000).

A maior parte do custo anual com insumos (60%) deve-se ao meio Chu_{12} embora usado em pequenas quantidades para manutenção de cepas. Sua reposição periódica faz-se necessária devido à perda da qualidade do produto, resultante de longos períodos de armazenamento dos componentes químicos em uso. Ao comparar o custo de produção em larga escala entre os meios NPK e Chu_{12}, verificou-se que seriam necessários 60kg do primeiro, com um custo de R$ 30,00 para produzir os 540.000L de cultura de alga; enquanto utilizando o meio Chu_{12} seriam necessários 45,7kg com um custo de R$ 456,45.

Para avaliar o valor da alga e do Cladocera utilizaram-se produtos que pudessem ser comparados com função semelhante, estabelecendo como base algas utilizadas como medicamento e ração na larvicultura de organismos aquáticos.

No sistema de cultivo proposto neste trabalho, a alga *Ankistrodesmus gracilis* (R$ 1.000,00.kg^{-1}) apresentou um custo semelhante ao da alga *Aphanizomenon flos-aquae* (R$ 800,00.kg^{-1}) e maior que a Chlorophyceae *Chlorella* sp. (R$ 55,00.kg^{-1}), ambas usadas com fins medicinais. O alimento não deve ser avaliado apenas pelo seu custo, mas também por sua composição bioquímica. Em estudos de composição bioquímica, *A. gracilis* foi considerada de alto valor nutricional quando comparada a *Scenedesmus quadricauda*.

A cianobactéria, *A. flos-aquae* e *Chlorella* sp., uma Chlorophyceae, podem produzir toxinas; a primeira nociva ao consumo humano e a segunda em altas concentrações pode produzir a clorelina, que afeta diretamente a população zooplanctônica (Pratt & Fong, 1944).

O custo da produção de algas representa de 14% a 18% dos custos de produção de uma larvicultura (Silva, 1997). Desta forma, o maior desafio dos

pesquisadores em algas é a redução destes custos, estabilização e manutenção da qualidade de produção.

De acordo com os dados obtidos neste estudo, o custo por litro de cultura produzida foi R$ 0,05, porém este valor que é bastante elevado quando considerado o peso seco por kg de produto (R$ 1.000,00.kg^{-1} e R$ 4.130,00.kg^{-1}), foi influenciado principalmente pelo baixo rendimento na obtenção da biomassa de algas e zooplâncton. O aproveitamento de 20% das células foi muito baixo, caso fossem aproveitados 80% das células da cultura, o custo por kg cairia para R$ 250,00.

Este valor seria inferior ao encontrado por Coutteau & Sorgeloos (1992) com a produção de alimento vivo, representando um custo de R$ 600,00 a 1.200,00.kg^{-1} para pequenas larviculturas. O uso de alimento vivo como suplemento alimentar aumentou em 2 a 3% no custo de produção das larviculturas, porém, a sobrevivência e qualidade dos animais criados compensaram a elevação do custo.

O alto custo para a produção de zooplâncton poderia ser reduzido de R$ 4,13.g^{-1} para R$ 2,95.g^{-1} se a densidade média das culturas fosse de 3.500 indivíduos.L^{-1}.

Na concentração (floculação) de 600L de alga seriam necessárias 3g de chitosan com um custo de R$ 0,07. O mesmo volume utilizando desnatadeira e considerando apenas o consumo de energia, representaria R$ 5,42, aproximadamente oitenta vezes mais caro que com o chitosan.

Estes resultados estão de acordo com os de Janelt *et al*.(1997), que verificaram ser a sedimentação um processo espontâneo de baixa manutenção, baixo custo e utiliza pouca mão-de-obra, quando comparado à centrifugação.

Borowitzka (1999) afirmou que o sucesso de uma produção em larga escala depende de muitos fatores e um deles é o desenvolvimento a baixo custo, sendo um processo gradual, que necessita ainda de aperfeiçoamento.

Este trabalho demonstrou o custo elevado da produção de alimento natural em laboratório e quais os seus principais causadores. Mais estudos a fim de melhorar as técnicas para obtenção de concentrações de *Ankistrodesmus gracilis* e *Diaphanosoma birgei* em larga escala com custo e manutenção mais baixos podem ser obtidos.

Portanto, é necessária uma tecnologia de produção em larga escala adequada aos sistemas artificiais além do conhecimento da biologia e do valor nutricional dos organismos produzidos, para garantir êxito na produção final.

Referências bibliográficas

Bachion, M.A. *Estudo do crescimento e desenvolvimento de três espécies zooplanctônicas submetidas a diferentes dietas alimentares.* Jaboticabal, 1996. (Master's Thesis) - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista.

Berberovic, R.; Pinto-Coelho, R.M. Dry first, measure later: a new procedure to preserve and measure zooplankton for ecophysiological studies, *J. Plankton Res*. *11*:1109-1116, 1989.

Borowitza, M.A. Comercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters, *J. of Biotechnology*, *70*:331-321, 1999.

Buelma, G.; Bhattarai, K.K.; De La Noüe, J.; Taiganides, E.P. Evaluation of various flocculants for the recovery of algal biomass grown on pig waste, *Biological Wastes, 31*:211-222, 1990.

Cañavate, J.P.; Lubinn, L.P. Some aspects on the cryopreservation of microalgae used as food for marine species, *Aquaculture*, *136*:277-290, 1995.

Chen, Y.M.; Liu, J.C.; Ju, Y. Flotation removal of algae from water, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *12*:49-55, 1998.

Coutteau, P.; Sorgeloos, P. The use of algal substitutes and the requiriment for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: na international survey, *J. Shellfish Research*, *11*:467-476, 1992.

Esquivel, B.C.; Votolina, D. Nutritonal value of preserved microalgae for subadult *Mytilus galloprovincialis*, *J. World Aquac. Soc*., *27*:113-118, 1996.

Hardy, E.; Castro, J.G.D. Qualidade nutricional de três espécies de clorofíceas cultivadas em laboratório, *Acta Amazonica*, *30*(1):39-47, 2000.

Janelt, G.; Bolt, P.; Gerbsch, N.; Buchholz, R.; Cho, M.G. The lamellar settler - a low cost alternative for separating the micro-alga *Chlorella vulgaris* from cultivation broth?, Appl. *Microbiol. Biotechnol*., *48*:6-10, 1997.

Kibria, G.;Nugegoda, D.; Fairclough, R. Lam, P.; Bradly, A. Zooplankton: Its biochemistry and significance in aquaculture, *Naga*, april-june, p.8-14, 1997.

Lubián, L. Concentrate cultured marine microalgae with Chitosan, *Aquaculture, 8*:257-265, 1989.

Maccausland, M. A.; Brown, M. R.; Barret, S. M.; Dicmar, J. A.; Heasman, M. P. Evaluation of live microalgal pastes as suplementary food for juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*), *Aquaculture*, *174*:323-342, 1999.

Matsunaga, M.; Bemelmans, P.F.; Toledo, P.E.N.; Dulley, R.D.; Okawa, H.; Pedroso, I.A. Metodologia do curso de produção utilizada pelo IEA, *Agricultura em São Paulo*, *23*(1):123-139, 1976.

Morales, J.; De La Noüe, L.; Picard, G. Harvesting marine microalgae species by Chitosan flocculation, *Aquacultural Engeneering*, *4*:257-270, 1985.

Olivera, A.; Sipaúba-Tavares, L.H. Composição bioquímica das microalgas Chaetoceros calcitrans e tetraselmis tetrathele utilizados na larvicultura de Farfantepenaeus paulensis. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQÜICULTURA, 11, 2000, Forianópolis, SC, *Anais....*, Florianópolis: SIMBRAQ, 2000. Não paginado, CD-ROM.

Pratt, R.; Fong, J. Chlorelline, an antibacterial substance from Chlorella, *Science*, *99*:351-352, 1944.

Silva, R. *Sistema de custos para o projeto de cultivo de camarões marinhos do laboratório de camarões marinhos da UFSC*. Florianópolis, 1997 (Monografia), Universidade Federal de Santa Catarina.

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*, *6*(1):93-106, 1993.

Sipaúba-Tavares, L.H.; Rocha, O. *Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos.* São Carlos: FAPESP / RIMA, 2001.

Stein, J.R. *Handbook of phycological Methods. Culture methods and growth measurement.* Cambridge: Cambridge University Press, 1983.

Votolina, D.; Nieves, M.; Navarro, G.; Oliva, T.; Peraza, D. The importance of acclimation for evaluation of the alternative media for microalgae growth, *Aquaculture Engeneering*, *19*:7-15, 1998.

Conclusões

Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que:

- As adaptações e estruturas implantadas no Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton foram adequadas a cultura das espécies produzidas neste trabalho, não apresentando contaminação nos cultivos de algas e facilitando alimentação do zooplâncton, através do intercâmbio entre os setores, com o uso de bombeamento e tubulações especialmente para este fim. Os tanques maiores (850L) apresentaram dificuldade para manejo e, no cultivo de algas, estes necessitaram de iluminação no topo da cultura e na porção lateral para uma densidade celular semelhante ao menor volume (250L). O controle de temperatura das salas de cultura foi deficiente, sofrendo grande influência da temperatura externa, principalmente no setor de produção de zooplâncton.
- A Chlorophyceae *Ankistrodesmus gracilis* e o Cladocera *Diaphanosoma birgei* adaptaram-se as condições de cultivo em larga escala empregados neste trabalho. Essas espécies apresentaram, em laboratório, rápido crescimento, atingindo altas densidades, além de suportarem o manejo envolvido no sistema. O perfil bioquímico demonstrou alto valor nutricional, sugerindo que podem ser utilizadas diretamente como alimento para organismos aquáticos ou como suplemento no uso de dietas artificias.
- Neste estudo, a produção de alimento natural em laboratório possui um custo elevado e os principais responsáveis são mão-de-obra e gasto gerais, principalmente energia elétrica, responsável por 70% do custo de produção anual. A utilização de um meio de cultura alternativo (NPK) pode reduzir custo em 93% quando comparado a outro meio mais tradicional (Chu_{12}). Os sistemas empregados neste trabalho para a concentração de algas necessitam de maiores estudos, apresentando problemas quanto ao rendimento e coleta do material concentrado.

Sugestões de trabalhos futuros

- Estudos referentes a fotoperíodo da alga *Ankistrodesmus gracilis*.
- Testes com diferentes métodos de concentração e coleta de alga.
- Pesquisas com outras algas clorofíceas para alimento de animais aquáticos
- Técnicas alternativas para produção de *Diaphanosoma birgei* em densidades superiores ao executados neste trabalho.
- Pesquisas com cultivo em larga escala de outros Cladocera que possam ser utilizados como alimento de animais aquáticos
- Uso de outros recipientes na produção de algas como sacos plásticos, por exemplo, analisando os custos e a densidade de algas alcançada.