

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP - CAUNESP**  
**CAMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA MICROALGA *ANKISTRODESMUS GRACILIS* (REINSCH)  
KORSHIKOV CULTIVADA EM MEIO DE MACRÓFITAS NA ALIMENTAÇÃO DE  
*XIPHOPHORUS MACULATUS***

**GUSTAVO LARANJEIRA DE MELO SANTOS**  
**Biólogo**

**Jaboticabal**  
**São Paulo - Brasil**  
**2018**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP - CAUNESP**  
**CAMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA MICROALGA *ANKISTRODESMUS GRACILIS* (REINSCH)  
KORSHIKOV CULTIVADA EM MEIO DE MACRÓFITAS NA ALIMENTAÇÃO DE  
*XIPHOPHORUS MACULATUS***

**Mestrando: Gustavo Laranjeira de Melo Santos**

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

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), Campus de Jaboticabal como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Aquicultura.

**Jaboticabal**  
**São Paulo - Brasil**  
**2018**

Santos, Gustavo Laranjeira de Melo  
S237a      Avaliação da microalga *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch)  
Korshikov cultivada em meio de macrófita na alimentação de  
*Xiphophorus maculatus* / Gustavo Laranjeira de Melo Santos. --  
Jaboticabal, 2018  
x, 56 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro  
de Aquicultura da UNESP, 2018  
Orientadora: Lúcia Helena Sipaúba Tavares  
Banca examinadora: Silvano Bianco, Rodrigo Ney Millan  
Bibliografia

1. Microalga. 2. Meio de cultura. 3. Macrófitas. 4. Alimento. 5.  
Peixe-ornamental. I. Título. II. Jaboticabal- -Centro de Aquicultura da  
UNESP.

CDU 582.263.1:639.34

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Unidade Complementar - Jaboticabal

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** AVALIAÇÃO DA MICROALGA *ANKISTRODESMUS GRACILIS* (REINSCH) KORSHIKOV CULTIVADA EM MEIO DE MACRÓFITAS NA ALIMENTAÇÃO DE *XIPHOPHORUS MACULATUS*

**AUTOR:** GUSTAVO LARANJEIRA DE MELO SANTOS

**ORIENTADORA:** LÚCIA HELENA SIPAÚBA TAVARES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. LÚCIA HELENA SIPAÚBA TAVARES  
Laboratório de Limnologia / Centro de Aquicultura da UNESP

Prof. Dr. SILVANO BIANCO  
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. RODRIGO NEY MILLAN  
/ Universidade do Estado de Minas Gerais, UEMG, Frutal-MG

Jaboticabal, 16 de fevereiro de 2018

**Você ganha força, coragem e confiança  
através de cada experiência em que você  
realmente para e encara o medo de frente.**

**Eleanor Roosevelt**

## DEDICO:

*Aos meus pais Reinaldo e Rosana que sempre acreditaram em mim,  
me dando apoio, incentivo, amor e compreensão, aqueles que deram  
cada pedaço da pessoa que sou.*

*As minhas professoras da graduação Eliana e Andréia, que sempre  
acreditaram em mim mesmo depois de concluir a graduação e nunca  
me deixaram desistir, me motivando e dando todo suporte para que eu  
alcançasse meus objetivos.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado forças para continuar a enfrentar cada desafio, e sempre superá-los, erguendo a cabeça e acreditando que seria possível ter fé, mesmo nos momentos difíceis.

Acima de tudo aos meus pais e familiares pelo carinho, incentivo e apoio nas horas difíceis.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lúcia Helena Sipaúba Tavares, que se dispôs a me orientar fornecendo todo aparato para realização dos meus estudos e pela sua presença e ensino.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho do Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton, Bruno, Taise, Lorena, Aline, Mayara, Gislaine, Juliane e Giovana.

Ao professor Claudinei da Cruz, pela doação de parte das macrófitas utilizadas nesse experimento e parte dos peixes ornamentais utilizados.

As minhas professoras de graduação Andréia e Eliana, por todo incentivo e conhecimento passado, e pela ajuda nos momentos em que pensei em desistir.

A minha antiga chefe Josi por ter me incentivado aos estudos, e ter sempre me ajudado a conciliar o serviço e os estudos, tornando-se uma grande amiga.

Ao professor João Batista por conceder o Laboratório de Peixes Ornamentais para realização do experimento.

Ao pessoal do Laboratório de Peixes Ornamentais pela ajuda e disponibilidade em me ensinar.

Ao Thiago Matias Torres do Nascimento pela formulação da dieta para alimentação dos peixes, e auxílio no desenvolvimento do trabalho.

Ao CAUNESP e funcionários por disponibilizar ajuda durante a realização do experimento.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado (processo 134543/2016-5).

À Fapesp pelo apoio financeiro (processo nº 2014/24697-3).

Enfim, a todos que contribuíram com este trabalho, expresso meus sinceros agradecimentos

## SUMÁRIO

|                                                                                                                        |             |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>LISTA DE FIGURAS.....</b>                                                                                           | <b>vi</b>   |
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>                                                                                           | <b>viii</b> |
| <b>RESUMO.....</b>                                                                                                     | <b>ix</b>   |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                                                                  | <b>x</b>    |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                             | <b>1</b>    |
| <b>2. OBJETIVO .....</b>                                                                                               | <b>4</b>    |
| <b>3. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>                                                                                  | <b>5</b>    |
| 3.1. Meio de cultura para microalgas .....                                                                             | 5           |
| 3.2. Importância da microalga na alimentação de peixes ornamentais .....                                               | 8           |
| 3.3. Caracterização das espécies estudadas .....                                                                       | 11          |
| 3.3.1. <i>Ankistrodesmus gracilis</i> .....                                                                            | 11          |
| 3.3.2. <i>Lemna minor</i> e <i>Azolla caroliniana</i> .....                                                            | 12          |
| 3.3.3. <i>Xiphophorus maculatus</i> (Platy) .....                                                                      | 16          |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>                                                                                     | <b>19</b>   |
| 4.1. Cultivo da microalga .....                                                                                        | 19          |
| 4.1.1. Descrição do laboratório de cultivo .....                                                                       | 19          |
| 4.1.2. Preparo do meio de cultura .....                                                                                | 20          |
| 4.1.3. Delineamento experimental .....                                                                                 | 21          |
| 4.1.4. Variáveis do meio de cultura .....                                                                              | 23          |
| 4.1.5. Características da microalga .....                                                                              | 23          |
| 4.1.6. Composição bioquímica da microalga.....                                                                         | 24          |
| 4.1.7. Composição dos nutrientes das plantas aquáticas.....                                                            | 24          |
| 4.1.8. Análise estatística dos dados.....                                                                              | 24          |
| 4.2. Alimentação do peixe ornamental <i>Xiphophorus maculatus</i> .....                                                | 24          |
| 4.2.1. - Extração da biomassa da microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i> para ser adicionada ao alimento inerte. .... | 24          |
| 4.2.2. Preparo do alimento inerte .....                                                                                | 26          |
| 4.2.3. Preparo do alimento inerte com microalga .....                                                                  | 27          |
| 4.2.4. Delineamento experimental .....                                                                                 | 28          |
| 4.2.5. Variáveis limnológicas .....                                                                                    | 29          |
| 4.2.6. Desempenho zootécnico do peixe.....                                                                             | 29          |
| 4.2.7. Análise estatística dos dados.....                                                                              | 30          |

|                                                                         |           |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>                                  | <b>30</b> |
| 5.1. Cultivo da microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i> .....          | 30        |
| 5.2. Alimentação do peixe ornamental <i>Xiphophorus maculatus</i> ..... | 37        |
| <b>6. CONCLUSÃO.....</b>                                                | <b>42</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                              | <b>43</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Meio de cultura concentrado a partir da biomassa das macrófitas <i>Azolla caroliniana</i> e <i>Lemna minor</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 6  |
| <b>Figura 2.</b> A- Vista geral das células da microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i> (Reinch) Korshikov (aumento de 400X); B- vista em câmara de Neubauer (aumento de 400X). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 12 |
| <b>Figura 3.</b> <i>Azolla caroliniana</i> vista em seu ambiente natural: (A) a olho desarmado, (B) em estereomicroscópio binocular (aumento de 40X).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 13 |
| <b>Figura 4.</b> <i>Lemna minor</i> vista em seu ambiente natural: (A) a olho desarmado, (B) em estereomicroscópio binocular (aumento de 40X).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 15 |
| <b>Figura 5.</b> Foto do peixe ornamental <i>Platy Xiphophorus maculatus</i> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 16 |
| <b>Figura 6.</b> Vista panorâmica do cepário onde foi mantida a microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i> em erlenmeyers de 2 litros.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 19 |
| <b>Figura 7.</b> Meio de cultura feito com biomassa de macrófitas: A- <i>Lemna minor</i> e B- <i>Azolla caroliniana</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 20 |
| <b>Figura 8.</b> Diagrama esquemático do cultivo da microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i> em volume de 2L, onde A = cepa; B = transferência para erlen de 250 mL; C = cultivo inicial em 2L somente em meio NPK (20:5:20); D = experimento em sistema fototrófico com meio de macrófita <i>Azolla caroliniana</i> e <i>Lemna minor</i> .....                                                                                                                                                                                   | 22 |
| <b>Figura 9.</b> Processo de concentração do material para extração da biomassa de <i>Ankistrodesmus gracilis</i> , onde: (A) centrífuga, (B) vista do meio de cultura dentro da centrífuga, (C) biomassa da microalga concentrada, (D) biomassa da microalga liofilizada.....                                                                                                                                                                                                                                                    | 25 |
| <b>Figura 10.</b> (A) Biomassa da microalga liofilizada, (B) alimento inerte (ração) sem e com a microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i> adicionada, (C) alimento inerte sem microalga sendo preparado em moedor de carne, (D) alimento inerte com microalga sendo preparado em moedor de carne, (1, 2, 3) alimento inerte em peletes pronto para o consumo do peixe onde: 1- somente ração (controle), 2- ração com microalga em meio de <i>Azolla caroliniana</i> e 3- ração com microalga em meio de <i>Lemna minor</i> ..... | 25 |
| <b>Figura 11.</b> Preparo do alimento inerte onde: (A) pesagem dos ingredientes, (B) mistura dos ingredientes na extrusora, (C) mistura dos ingredientes com óleo e água, (D) moendo o alimento inerte, (E) secagem do alimento inerte, (F) quebra dos grânulos maiores, (G) passagem por peneira para padronização do tamanho do grânulo, (H) alimento inerte pronto para ser fornecido ao <i>Platy X. maculatus</i> . ....                                                                                                      | 26 |

**Figura 12.** Preparo do alimento inerte (ração) com a microalga *A. gracilis* onde: (A) moendo o alimento inerte (*A. caroliniana*), (B) moendo o alimento inerte (*L. minor*), (C) alimento inerte em grânulos sendo: 1- somente ração (controle), 2- ração com microalga em meio de *Azolla caroliniana* e 3- ração com microalga em meio de *Lemna minor* ..... 28

**Figura 13.** Delineamento experimental da alimentação do *Platy, Xiphophorus maculatus* utilizando o alimento inerte juntamente com a microalga *A. gracilis* cultivada em diferentes meios de cultura, onde AI= somente alimento inerte (controle), AAC= alimento inerte com microalga em meio de cultura com *Azolla caroliniana*, ALM= alimento inerte com microalga em meio de cultura com *Lemna minor* ..... 29

**Figura 14.** Curva de crescimento da microalga *Ankistrodesmus gracilis* em meio com macrófitas *Azolla caroliniana* e *Lemna minor* ..... 32

**Figura 15.** Variação semanal do teor de proteína e lipídio nos meios de cultura..... 36

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1-</b> Composição dos nutrientes nos meios de cultura e nas plantas das macrófitas <i>Azolla caroliniana</i> e <i>Lemna minor</i> para o cultivo de <i>Ankistrodesmus gracilis</i> .....                                                                                                 | 21 |
| <b>Tabela 2-</b> Ingredientes e formulações de tratamentos dietéticos onde: alimento inerte (AI) com <i>Ankistrodesmus gracilis</i> em meio de cultura com <i>Azolla caroliniana</i> (AAC) e <i>Lemna minor</i> (ALM) para juvenis de <i>Xiphophorus maculatus</i> em experimento de 90 dias ..... | 27 |
| <b>Tabela 3-</b> Características de <i>Ankistrodesmus gracilis</i> cultivada em meio de macrófita .....                                                                                                                                                                                            | 33 |
| <b>Tabela 4-</b> Variação de qualidade d'água, compostos nitrogenados e fósforo total nos meios de cultura <i>Azolla caroliniana</i> e <i>Lemna minor</i> para o cultivo de <i>Ankistrodesmus gracilis</i> .....                                                                                   | 34 |
| <b>Tabela 5-</b> Variação de qualidade d'água, compostos nitrogenados e fósforo total nos aquários, com dieta controle, <i>Azolla caroliniana</i> e <i>Lemna minor</i> , para o peixe ornamental <i>Xiphophorus maculatus</i> . ....                                                               | 38 |
| <b>Tabela 6-</b> Índices biológicos obtidos para juvenis de <i>Xiphophorus maculatus</i> alimentados com alimento inerte (controle) e dietas de macrófitas (alimento inerte com dietas de macrófitas <i>Azolla caroliniana</i> e <i>Lemna minor</i> ).....                                         | 40 |

## RESUMO

O estudo do cultivo de microalgas na aquicultura é importante para incrementar o conhecimento da biologia das espécies, favorecendo posterior produção em ambientes controlados. O objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento da microalga *Ankistrodesmus gracilis* em meio de cultura composto por biomassa de *Azolla caroliniana* e *Lemna minor* e utilizar a microalga na alimentação do *Xiphophorus maculatus* visando melhorar o desempenho zootécnico. O experimento com a microalga durou 28 dias em condições controladas e os parâmetros físicos e químicos foram mensurados semanalmente com a avaliação diária do crescimento. A planta *L. minor* apresentou melhores resultados para macro e micronutrientes, e o crescimento também foi maior no meio de cultura para a microalga *A. gracilis* ( $552 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup>) do que no meio de *A. caroliniana* ( $292 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup>). No meio de cultura de *L. minor* a microalga *A. gracilis* apresentou maiores teores de clorofila-*a*, taxa de crescimento, densidade celular média e máxima e fósforo total. O teor de lipídio foi maior no meio de *L. minor* e o de proteína foi igual em ambos os meios. O uso de microalga *A. gracilis* crescida no meio de macrófita, foi utilizada para a alimentação do peixe ornamental Platy (*X. maculatus*). Para preparação da ração a microalga crescida nos dois meios de cultura diferentes foi liofilizada e adicionada na ração na proporção de 10%. Os tratamentos foram alimento inerte, somente ração (controle); alimento inerte com microalga *A. gracilis* cultivada em meio de cultura *A. caroliniana* e alimento inerte com microalga *A. gracilis* cultivada em meio de cultura *L. minor*. Em relação ao desempenho zootécnico observou-se diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para o tratamento contendo microalga cultivada em meio de *L. minor* em relação ao peso final, ganho de peso, taxa de crescimento, consumo, peso inicial e sobrevivência, e o controle obteve o pior desempenho zootécnico. Dentre as duas macrófitas estudadas *L. minor* demonstrou ser mais eficiente promovendo elevada densidade celular, evidenciando que estas plantas podem ser uma nova ferramenta para o cultivo em laboratório desta microalga, em função do baixo custo, eficiência de produção e disponibilidade do recurso. Para o peixe ornamental *X. maculatus* a ração contendo a microalga cultivada em meio de cultura *L. minor* apresentou melhores resultados. Já no de *A. caroliniana* apesar de inferior a *L. minor* demonstrou ser melhor que o controle (somente ração), comprovando que as macrófitas além de servirem como meio de cultura para microalga, também podem ser um incremento em rações de peixes ornamentais.

**Palavras-chave:** Microalga; meio de cultura; macrófitas; alimento; peixe ornamental.

## ABSTRACT

Studies on the cultivation of microalgae are greatly relevant for in-depth analysis of species' biology and for highlighting production in controlled environments. Current analysis assesses growth of the *Ankistrodesmus gracilis* microalgae in a culture medium composed of *Azolla caroliniana* and *Lemna minor* biomass and to use a microalga in the feeding of *Xiphophorus maculatus* aiming to improve the zootechnical performance. Assay with microalga lasted 28 days in controlled conditions, and physical and chemical parameters were measured weekly, coupled to daily growth evaluation. Macrophyte *L. minor* had better results macro and micronutrients. and growth was also higher in the culture medium for microalgae *A. gracilis* ( $552 \times 10^5$  cell mL<sup>-1</sup>) than in *A. caroliniana* medium ( $292 \times 10^5$  cell mL<sup>-1</sup>). Microalga *A. gracilis* had higher rates of chlorophyll-*a*, growth and medium, maximum cell density rates and total phosphorus in this culture medium. Lipid rates were greater in *L. minor* medium. Protein rate was equal in the two media. The use of microalga *A. gracilis* grown in macrophyte medium was employed for the feeding of the ornamental fish *Platy* (*X. maculatus*). To prepare the feed the microalgae grown in the two different culture media were lyophilized and added to the ration in the ratio at 10%. Treatments consisted of inert feed, ration only (control); inert feed plus microalga *A. gracilis* cultivated in *A. caroliniana* medium; inert feed plus microalga *A. gracilis* cultivated in *L. minor* medium culture. In the case of animal performance, significant differences ( $p < 0.05$ ) were registered for treatment with microalga cultivated in *L. minor* medium with regard to final weight, weight gain, growth rate intake, initial weight and survival, and the control obtained the worst zootechnical performance. *L. minor* proved to be more efficient since it enhanced high cell density. This fact showed that these plants may be a new tool for laboratory culture due to low costs, production efficiency and availability. In the case of the ornamental fish *X. maculatus*, feed with the microalga cultivated in *L. minor* medium had the best results. In the case of *A. caroliniana*, albeit lower than *L. minor*, it proved to be better than control (feed only). Besides being employed as culture medium for microalgae, macrophytes may also constitute a partial increase in the ration of ornamental fish.

**Keywords:** Microalga; culture medium; macrophytes; feed; ornamental fish.

## 1- INTRODUÇÃO

O estudo do cultivo de microalgas na aquicultura é importante para incrementar o conhecimento da biologia das espécies, favorecendo posterior produção em ambientes controlados (HATTAB & GHALY, 2014). As microalgas são cultivadas e utilizadas para alimentação, para a produção de compostos úteis como biofiltros, para remover nutrientes e outros poluentes de águas residuais, na indústria cosmética e farmacêutica e na aquicultura. Além disso, microalgas são fontes potencialmente boas para a produção de biocombustíveis por causa de seu alto teor de lipídio e produção rápida de biomassa. A principal aplicação de microalgas na aquicultura está relacionada com seu uso para alimentação, sendo que atualmente 30% da produção mundial de microalgas é utilizada para alimentação (SIRAKOV et al., 2015).

A abordagem tradicional para identificar os fatores requeridos para uma elevada biomassa de microalga inicia com a utilização de um meio de cultura definido, o qual a adição de outros elementos contribuirá para o aumento do valor nutricional e consequentemente, o crescimento da microalga. A escolha do meio de cultura usado depende de vários fatores, como a presença de elementos necessários ao crescimento da microalga e, se estes elementos podem afetar a qualidade do produto final e custo benefício do meio utilizado (DALAY et al., 2007).

O procedimento mais comum para o cultivo de microalgas é o crescimento fotoautotrófico, possuindo maior eficácia na conversão de energia solar, podendo ser cultivadas em ambientes iluminados naturalmente ou artificialmente (PEREZ-GARCIA, 2011).

Estudos mostram a importância do meio de cultura no crescimento e valor nutricional das microalgas. Alguns fatores influenciam no crescimento das microalgas como luz, temperatura, nutrientes e qualidade do meio de cultura (FIORESI & SIPAÚBA- TAVARES, 2008; SIPAÚBA- TAVARES & PEREIRA, 2008).

Os meios de cultura vêm sendo desenvolvidos para diferentes cultivos de microalgas. A utilização de meio de cultura para as microalgas Chlorophyceae contendo biomassa de plantas aquáticas e NPK, pode servir de importante fonte alternativa por apresentar concentrações elevadas de nitrogênio e fósforo, essenciais ao desenvolvimento e crescimento da microalga apresentando baixo custo e contribuindo para a reciclagem de resíduos de produtos biológicos. (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2014).

As macrófitas como meio de cultura vêm sendo utilizadas no cultivo de microalgas Chlorophyceae com bons resultados (SIPAÚBA- TAVARES et al., 2009; 2017), principalmente em relação a *Eichhornia crassipes*.

No meio ambiente, as macrófitas assimilam preferencialmente nitrogênio e fósforo da água para seu crescimento e suas raízes servem de locais para colonização de microrganismos, liberando carboidratos, açúcar, aminoácidos, enzima e outros componentes. É bem conhecido que o nitrogênio e fósforo são componentes que incrementam o cultivo das microalgas e, o aproveitamento das macrófitas como meio de cultura, pode ter uma influência sobre a biomassa celular e sobre o processo metabólico das mesmas (GRABSKI & TUKAJ, 2008).

A composição química do meio de cultura com biomassa de macrófita, apresenta proporções de nutrientes adequadas, servindo de importante fonte alternativa de macro e micronutrientes contendo elevados teores de proteínas e lipídios com baixo custo de produção (SIPAÚBA- TAVARES, et al., 2009; 2017).

Estudos com utilização de microalgas como principal ingrediente alimentar merecem destaque uma vez que são a base da produção primária na cadeia alimentar aquática (PRIYADARSHANI et al., 2012).

Um dos principais problemas na criação de peixes ornamentais está relacionado com sobrevivência, custo dos ingredientes necessários para a preparação do alimento artificial (ração) e coloração das espécies (BAGRE et al., 2012).

Atualmente, na aquicultura, a criação de peixes ornamentais vem ganhando grande importância. Produtores de peixes ornamentais salientam a importância da suplementação de alimentos formulados com biomassa de microalgas, pois fornecem nutrientes que auxiliam no crescimento, na eficiência alimentar e nas respostas fisiológicas ao estresse e às doenças (BAGRE et al., 2012). As microalgas podem ser utilizadas na fabricação do alimento inerte após a liofilização, como alimento vivo ou via indireta por meio do zooplâncton alimentado com microalgas (ZATKOVA et al., 2011).

Shields e Lupatsch (2012) sugerem que paralelamente a estas aplicações bem estabelecidas para micro e macroalgas em viveiros de aquicultura, existe atualmente um impulso para exploração de algas como alimentos formulados para animais de ambientes aquáticos quanto para animais terrestres.

A piscicultura ornamental é um setor em plena expansão, visto que, no mercado destes peixes existe uma variedade de alimentos, porém poucos são adequados para satisfazer as exigências nutricionais das espécies. Assim, a utilização de biomassa de microalgas na alimentação de peixes é uma alternativa a ser explorada. Outro fator importante é a utilização de dietas que contenham pigmentos naturais que possam intensificar a coloração dos peixes ornamentais, fator que influencia a decisão na compra pelo consumidor (LANGER et al., 2011).

De acordo com Soares (2008), o estudo de novas tecnologias e de diferentes meios alimentícios na aquicultura vem crescendo consideravelmente nos últimos anos, para obter o aumento da produção de peixes em larga escala diminuindo os gastos através de uma nutrição adequada, evitando assim o uso de alimentos com baixa qualidade nutricional e de procedência duvidosa. O extrativismo que no passado foi a principal fonte de peixes ornamentais, está sendo substituído pela produção em cativeiro e a forma de melhorar esta produção é o uso de alimento de alta qualidade e valor nutricional com baixo custo de produção, tornando-se fundamental na criação de peixes. O conhecimento da preferência alimentar bem como, as condições ambientais para a produção de indivíduos de boa aparência para venda no mercado, são fatores de grande importância na comercialização de peixes ornamentais. É essencial desenvolver técnicas de reprodução, nutrição, alimentação, comportamento e manejo das espécies de peixes, já que a falta de entendimento provoca dificuldades no desenvolvimento de tecnologias adequadas para o cultivo correto e sustentável de espécies ornamentais (RIBEIRO et al., 2007).

Neste enfoque, este trabalho visa utilizar a microalga Chlorophyceae *Ankistrodesmus gracilis* cultivada em meio de cultura com biomassa de macrófitas, *Lemna minor* e *Azolla caroliniana*, para seu crescimento e posteriormente, utilizá-la como proteína vegetal na alimentação de juvenis de *Xiphophorus maculatus*, conhecido popularmente como Platy. Essas duas plantas aquáticas ainda não foram utilizadas como meio de cultura para *A. gracilis*, sendo uma alternativa que poderá ser adotado no desenvolvimento da biotecnologia de cultivo de microalgas, além de incremento como alimento natural para peixes ornamentais.

## 2- OBJETIVO

- 1- Avaliar o crescimento da microalga *Ankistrodesmus gracilis* em meio de cultura composto por biomassa de *Azolla caroliniana* e *Lemna minor*.
- 2- Utilizar a microalga na alimentação do *Xiphophorus maculatus* visando melhorar o desempenho zootécnico.

### **3- REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1. Meio de cultura para microalgas**

O ambiente aquático apresenta uma diversidade muito elevada de microalgas. A distribuição de espécies de microalgas depende não só dos fatores físico-químicos do ambiente, mas também da capacidade do organismo em colonizar um determinado local. Para o isolamento e cultivo das diversas espécies de microalgas, vários meios de cultura vêm sendo desenvolvidos e utilizados como forma de manutenção de microalgas de água doce em laboratório. Alguns meios são modificações de formulações anteriores para atender a um propósito específico, outros são derivados da análise da água no habitat nativo, alguns são formulados após estudo detalhado sobre o requerimento de nutrientes do organismo e outros, são estabelecidos após considerações de parâmetros ecológicos (ANDERSEN, 2005).

O meio de cultura é uma preparação química que possui nutrientes necessários para que microrganismos se multiplique e se desenvolva de forma adequada, permitindo seu estudo, identificação e análise. As principais considerações para o desenvolvimento de um meio de cultura são: a concentração total de sal, fonte de carbono, fonte de nitrogênio, concentração de outros elementos principais como potássio, fósforo, magnésio, sódio, sulfato, microelementos e a adição de componentes orgânicos e de substâncias que promovam o crescimento (LOURENÇO, 2006). Muitos meios de cultura têm sido desenvolvidos para diferentes cultivos de microalgas. Quando se trata de meio de cultura para microalgas, o mais utilizado e que apresenta resultados satisfatórios é o meio líquido, já o meio de cultura em estado sólido é utilizado para crescimento e desenvolvimento de macrorganismos (BAUMGARTNER, 2011).

O meio de cultura é uma ferramenta para a manutenção e o desenvolvimento de microalgas. A crescente demanda por microalgas e o alto custo da síntese química têm estimulado a procura por produção de outros meios alternativos. O maior interesse de todos os envolvidos na cultura das microalgas é a máxima produção e minimização de custos (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2015a). Assim, o meio de cultura acaba sendo um dos componentes mais dispendiosos para o cultivo de microalgas, neste sentido, o uso de meios de cultura alternativos como fertilizante inorgânico (NPK) e meio de cultura de macrófita (Figura 1), são ferramentas que podem ser adotadas na aquicultura (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009).



**Figura 1-** Meio de cultura concentrado a partir da biomassa das macrófitas *Azolla caroliniana* e *Lemna minor*.

Meios à base de fertilizante inorgânico como o NPK (20:5:20), têm sido proposto como uma alternativa de baixo custo mostrando resultados satisfatórios quando comparados aos meios comerciais, como o CHU<sub>12</sub>, promovendo alta biomassa de microalgas com elevado valor nutricional (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 1993; HARDY & CASTRO, 2000; SIPAÚBA-TAVARES & PEREIRA, 2008; SIPAÚBA-TAVARES et al., 2011, 2015a).

A utilização de meios alternativos (NPK e macrófitas) de baixo custo que promovam alta biomassa e valor nutricional, tem estimulado investigações sobre produção de microalgas na aquicultura que são amplamente utilizadas como alimento para peixes e por apresentarem nutrientes essenciais para a manutenção, sobrevivência e crescimento dos organismos cultivados (SIPAÚBA- TAVARES & ROCHA, 2001).

Várias permutações ou tentativas inteiramente novas, podem ser necessárias para estabelecer meios de cultura adequados para algumas espécies de microalgas e, estes meios são muitas vezes baseados no requerimento necessário para crescimento e desenvolvimento das microalgas de acordo com requisitos de nutrientes específicos (ANDERSEN, 2005).

Estratégias vem sendo aplicadas para melhorar o crescimento, a pigmentação e a composição bioquímica das microalgas, incluindo a otimização dos componentes do meio de cultura (por exemplo, tipo de fonte de carbono, vitaminas, sais e nutrientes, etc.), parâmetros físicos (por exemplo, pH, temperatura e intensidade da luz) e tipo de metabolismo (por exemplo, fototrófico, heterotrófico, mixotrófico e crescimento foto-heterotrófico) (MATA et al., 2010).

O êxito de um cultivo de microalgas depende de uma série de fatores ambientais destacando-se a luminosidade e nutrientes. Os meios de cultura são preparados de modo a fornecer nutrientes em quantidade suficiente para as espécies cultivadas (LOURENÇO, 2006).

Uma abordagem comum para determinar os fatores para uma boa produção de biomassa é começar a partir de um meio conhecido e associá-lo com outros elementos que otimizam o crescimento de microalgas e valor nutritivo (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2015b). Um dos elementos para otimizar o meio são as vitaminas (B1, B12 e H). Muitas microalgas precisam apenas de uma ou duas das vitaminas mas, parece não haver danos causados pela adição de uma vitamina não essencial junto ao meio (PROVASOLI & CARLUCCI, 1974).

Os meios de cultura vêm sendo desenvolvidos para diferentes cultivos de microalgas. Quando se trata de meio de cultura sintético, o alto custo dos nutrientes pode representar fator limitante para uma produção (BAUMGARTNER, 2011). A utilização de meio de cultura para a microalga *Chlorophyceae* contendo biomassa de plantas aquáticas e NPK, pode servir de importante fonte alternativa por apresentar concentrações elevadas de nitrogênio e fósforo, essenciais ao desenvolvimento e crescimento com baixo custo, contribuindo para a reciclagem de resíduos de produtos biológicos (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2015a), além de serem amplamente disponíveis, dissolvem-se facilmente e têm uma composição definida com alta taxa de nitrogênio e fósforo e pH neutro (TEW et al., 2006).

O cultivo de microalgas ainda apresenta altos custos, sendo um dos principais os relacionados aos reagentes químicos utilizados na preparação dos meios de cultura comerciais (SIPAÚBA-TAVARES & PEREIRA, 2008; FERRELL & SARISKY- REED, 2010; KRUSE & HANKAMER, 2010). A descoberta de outros meios de cultura alternativos mais baratos para a cultura de microalgas poderia contribuir para o desenvolvimento de biodiesel, alimentação animal, outras indústrias e campos relacionados (ROFIDI, 2017).

Estudos vêm sendo realizados com o intuito de avaliar o crescimento das microalgas cultivadas em diferentes meios de cultura alternativos, pois são baratos, facilmente obtidos e são ricos em nutrientes necessários para o crescimento e desenvolvimento de microalgas. Os meios alternativos são produzidos através de diferentes fontes orgânicas e inorgânicas, como efluentes municipais, industriais, de agricultura, biodigestores, extrato de solo, dentre outras (DALRYMPLE et al., 2013; ALMEIDA, 2007; PIÑA et al., 2007; FIORESI & SIPAÚBA-TAVARES, 2008). Biomassa seca de macrófitas aquáticas, por sua riqueza de micro e macronutrientes, também foram sugeridas como fertilizantes orgânicos de solo, de piscicultura e como meio de cultura para microalga (SAMPAIO & OLIVEIRA, 2005; SIPAÚBA-TAVARES & BRAGA, 2007; SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009).

Mandalam e Palsson (1998), verificaram que a variação na composição do meio de cultura altera a composição bioquímica das microalgas que pode ser explorada para a produção de lipídios, carboidratos, proteínas e pigmentos. Diferentes meios de cultura têm quantidades diferentes de nutrientes que podem alterar significativamente a quantidade de biomassa produzida durante o cultivo. Portanto, é importante otimizar a composição do meio para alcançar o maior rendimento de produtos de valor agregado às microalgas.

### **3.2- Importância da microalga na alimentação de peixes ornamentais**

A necessidade de fontes nutricionais que são mais seguras do que os produtos tradicionais de origem animal, tem renovado um grande interesse em plantas e em microalgas (SHIELDS & LUPATSCH, 2012). Dhargalkar e Verlecar (2009), relataram que as microalgas também desempenham um papel fundamental na alimentação animal de alta qualidade, principalmente na aquicultura. As microalgas usadas em pequenas quantidades em alimentos, têm sido creditadas com a melhoria do sistema imunológico, metabolismo lipídico, atividade antiviral e antibacteriana, função intestinal melhorada e resistência ao estresse (SHIELDS & LUPATSCH, 2012).

Aumento das necessidades de proteínas e o alto custo da farinha de peixe nos últimos anos levou à busca de novas alternativas, como fontes de proteína animal e vegetal para as necessidades nutricionais do peixe, sendo as microalgas um componente alimentar acessível respondendo a este desafio (SIRAKOV et al., 2015).

O cultivo de microalgas em laboratório tem crescido principalmente quanto ao uso na nutrição de organismos aquáticos, mas ainda há resistência devido ao custo desse tipo de produção, então todas as alternativas para que se possa baratear esses custos devem ser estudadas com exaustão (SIPAÚBA- TAVARES et al., 2015a). Nas últimas quatro décadas, várias centenas de espécies de microalgas foram testadas como alimento, mas provavelmente menos de vinte foram amplamente utilizadas na aquicultura (PRIYADARSHANI et al., 2012).

De acordo com Hemaiswarya et al. (2011), as microalgas possuem um alto valor nutritivo e propriedades físicas apropriadas e podem proporcionar um ambiente de criação saudável para o sistema de aquicultura. Shields e Lupatsch (2012), indicam que a biomassa de microalgas como alimento apresenta um bom potencial para a nutrição associada aos alimentos formulados, no entanto, sua viabilidade comercial futura dependerá da quantidade, qualidade (composição) e custo disponíveis em relação aos materiais de consumo utilizados.

Avaliações nutricionais e toxicológicas abrangentes demonstraram a adequação da biomassa de microalgas como um valioso suplemento alimentar ou substituto para as fontes

convencionais de ração animal (DHARGALKAR & VERLECAR, 2009). Porém, os estudos nutricionais que avaliam as microalgas como principal ingrediente alimentar para os peixes são poucos, devido a grande quantidade de biomassa necessária. Assim, na maioria dos estudos a biomassa de microalgas não é considerada como uma fonte de alimento essencial mas sim, para reforçar formulações de alimentos "padrão" (SHIELDS & LUPATSCH, 2012).

A incorporação de microalga na dieta de peixe seria altamente benéfica, mas atualmente várias pesquisas mostram que seu uso na aquicultura ainda está engatinhando devido ao alto custo de produção em laboratório e tempo necessário. Para promover o seu uso, é preciso encontrar uma dieta eficaz e rentável com microalgas, nesse aspecto, o lema deve ser testar diferentes microalgas com altos teores de pigmentos e outros perfis bioquímicos, na formulação de uma alimentação potencial de peixes com base em microalga (MUKHERJEE et al., 2015).

Informações para a gestão eficaz da alimentação de peixes são necessárias na produção de alimentos vivos para larvas de peixe, como por exemplo: ingredientes para rações, fontes alimentares convencionais comuns, fontes animais e vegetais de alimentos não convencionais para cultivo de peixes, formulação de alimentos e métodos de alimentação (ABOWEI & EKUBO, 2011). O aumento do custo e demanda de proteína a partir de recursos convencionais exige que os piscicultores de países subdesenvolvidos incorporem ingredientes baratos e localmente disponíveis nas rações para peixes (PANIGRAHI et al., 2014).

O principal fator que influencia a atividade de alimentação dos peixes é a qualidade e o sabor da dieta, com o aumento do teor de carne do peixe e, essa contendo todas as proteínas necessárias, carboidratos, lipídios, água, vitaminas e minerais (CHO et al., 2005). Segundo Vaidehi (2011) peixe pode comer mais alimento, quando estimulado o seu apetite e tornando o alimento atraente, adicionando sabor adequado

Os peixes ornamentais são beneficiados quando alimentados com microalgas, pois aumentam a digestibilidade, a atividade fisiológica, resposta ao estresse e resistência as doenças promovendo melhores condições de saúde bem como, o fortalecimento do sistema imunológico (JU et al., 2012; KHATOON et al., 2010).

Na busca por rações de mínimo custo, os alimentos de origem animal vêm sendo substituídos por ingredientes alternativos de origem vegetal (FRANCIS et al., 2001). A farinha de peixe, embora altamente nutritiva e saborosa, é um ingrediente alimentar relativamente caro em comparação com outros ingredientes ricos em proteínas de baixo custo, tais como farelo de soja, pupas de bicho da seda, minhocas, entre outros (LANGER et al., 2011).

São limitados a avaliação da nutrição no desenvolvimento da criação de peixes ornamentais (AZIMIRAD et al., 2016). Principais conceitos, ideias, materiais e ingredientes

alimentares utilizados na alimentação de peixes ornamentais foram inicialmente transferidos da aquicultura convencional, sendo a farinha de peixe o principal ingrediente de alimentos para peixes ornamentais (SICURO, 2017).

Considerando que a aquicultura ornamental se origina da nutrição convencional dos peixes de corte, há uma diferença substancial que deve ser levada em consideração: a finalidade da ração. O principal alvo dos criadores de peixe ornamental é o aprimoramento da cor e do bem-estar dos peixes. Um exemplo simples é a diferença de cores entre os peixes criados no interior de estufas e dos criados livres, que interfere também no preço de venda, enquanto que o crescimento do peixe depende do alimento digerido (SICURO, 2017).

Sendo a alimentação um fator importante durante o desempenho e o crescimento de peixes ornamentais, é importante investigar novas fontes proteicas de origem natural para a criação de peixes, sendo as microalgas fonte interessante de nutrientes de alta qualidade e baixo custo (CORREDOR & GIRALDO, 2017). Uma boa nutrição na base da produção animal é essencial para produzir economicamente um produto saudável e de alta qualidade (NEKOUBIN & SUDAGAR, 2012). Para operações de cultivo de peixes ornamentais bem sucedidas, são necessárias dietas nutricionalmente bem equilibradas e uma alimentação adequada (ADEROLU et al., 2010).

Vários estudos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de maximizar a lucratividade no cultivo de peixes ornamentais, com o intuito de reduzir mortalidade, melhorar a conversão alimentar e aumentar o desempenho no cultivo intensivo. Porém, ainda hoje, pode ser visto o uso generalizado de rações de peixes de corte na produção de peixes ornamentais, que não suprem adequadamente as exigências nutricionais dessas espécies. É necessário o desenvolvimento de pacotes tecnológicos, com o estabelecimento de índices zootécnicos e o desenvolvimento de dietas que atendam às exigências nutricionais para as diversas espécies cultivadas para a aquariofilia (ZUANON et al., 2011).

A frequência adequada na alimentação de espécies de peixes ornamentais ainda não foi claramente definida e isso levou à incerteza nas rotinas de alimentação utilizadas por muitos aquaristas. Tanto sobre a alimentação como a subalimentação podem ser prejudiciais para a saúde dos peixes podendo causar uma deterioração acentuada na qualidade da água, redução do peso, má utilização dos alimentos e aumento da suscetibilidade à infecção (NEKOUBIN & SUDAGAR, 2012).

Se a biomassa de microalgas será adotada no futuro como alimento em massa para fornecer proteína e energia em rações animais, ou permanecerá apenas como suplemento, dependerá da disponibilidade, composição e custo de biomassa. Para que isso aconteça é

necessário um esforço em assegurar uma composição mais consistente da biomassa de microalgas, para que os fabricantes possam facilmente incorporar este novo alimento aos ingredientes existentes nas rações formuladas (SHIELDS & LUPATSCH, 2012).

### 3.3- Caracterização das espécies estudadas

#### 3.3.1- *Ankistrodesmus gracilis*

O gênero *Ankistrodesmus* agrupa espécies de células raramente solitárias, geralmente reunidas em colônias sob a forma de tufo (menos organizados) ou de feixes frouxos (mais organizados). Não existe mucilagem para manter as células juntas, elas se torcem espiraladamente umas sobre as outras para formar o feixe. Esse gênero inclui onze espécies que já foram coletadas em quase todas as regiões do mundo, o que o caracteriza como um dos gêneros mais comuns em coletas de plâncton (BICUDO & MENEZES, 2006).

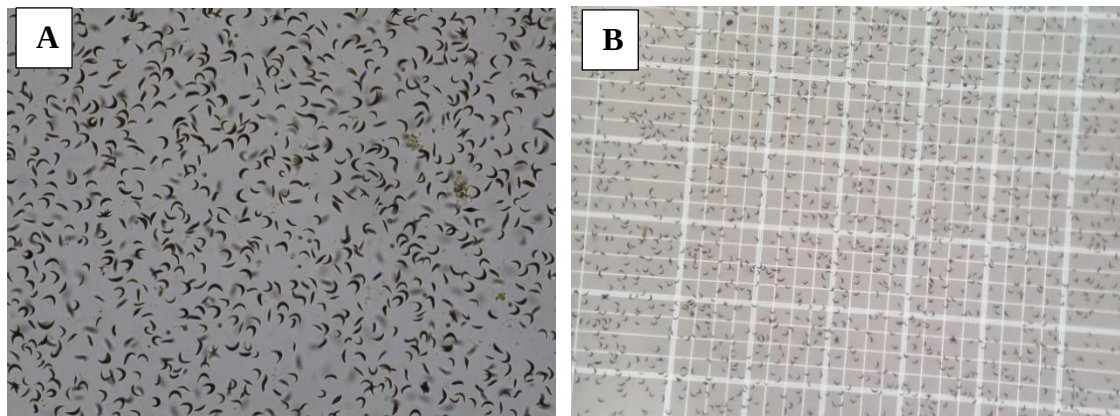
Esta microalga faz parte do fitoplâncton de lagos e lagoas e, do metafiton de lagos e lagoas. É um dos gêneros de microalgas mais comuns entre as algas verdes. Possuem forma alongada, ou estreitamente afilada nas extremidades. A célula apresenta-se, geralmente, em forma curvada, podendo ser reta (SHUBERT, 2003). O cloroplasto é parietal podendo apresentar ou não pirenoide. A reprodução assexuada ocorre por clivagem da célula parietal em 1-16 autoesporos que são liberados pela ruptura da parede celular da célula parietal. Estágio flagelar ou reprodução sexuada são desconhecidos (GRAHAM & WILCOX, 2000).

Possui a cor verde intenso por conta das clorofilas a e b que mascaram os carotenos e xantofilas (REYNOLDS, 1984). Esta microalga caracteriza-se por ser unicelular imóvel e não produz zoósporos (BOLD & WYNNE, 1985).

*Ankistrodesmus gracilis* (Figura 2) foi relatada como uma fonte importante de lipídios, pigmentos, polissacarídeos (DO NASCIMENTO et al., 2013; KILHAM et al., 1997; CHU et al., 1995) e também como organismo modelo para estudar o crescimento e a divisão celular, são fotoautotróficas e unicelulares (KOBAYASHI & ITO, 1977).

*Ankistrodesmus* habita corpos de água doce rasos, naturais ou tanques artificiais efêmeros e periodicamente cheios com água de chuva. Em culturas de laboratório, ao longo do seu ciclo de vida podem ocorrer diferentes mudanças na quantidade de células na cultura e no crescimento (GONZÁLEZ et al., 2009). *Ankistrodesmus* habita corpos de água doce rasos, naturais ou tanques artificiais efêmeros e periodicamente cheios com água de chuva. Em culturas de laboratório, ao longo do seu ciclo de vida podem ocorrer diferentes mudanças na quantidade de células na cultura e no crescimento (GONZÁLEZ et al., 2009). Além disso, são

microscópicas crescem normalmente suspensas em água usando a fotossíntese para converter luz solar, água, CO<sub>2</sub> e nutrientes inorgânicos (N, P, K, etc.) em oxigênio e uma biomassa rica em proteínas, vitaminas, antioxidantes e outros nutrientes requeridos por humanos e animais (CHEN et al., 2016).



**Figura 2.** A- Vista geral das células da microalga *Ankistrodesmus gracilis* (Reinch) Korshikov (aumento de 400X); B- vista em câmara de Neubauer (aumento de 400X).

*A. gracilis* (Figura 2) pode acumular conteúdo lipídico total de 24% a 47%, 70% de proteína e mais de 5% de carboidrato. Muitas vezes, essas composições nutricionais podem ser alteradas com o ajuste de nutrientes e meio de cultura (SUKKROM et al., 2014). Em sistema de cultivo “indoor” esta microalga apresenta elevado valor nutricional acima de 45% de proteína (SIPAÚBA-TAVARES & PEREIRA, 2008). Sob diferentes maneiras de cultivo, foi registrado um valor de teor lipídico de 24 a 31% da massa seca para esta microalga (MATA et al., 2010).

Os esforços realizados para substituir as microalgas por dietas inertes na aquicultura, ainda depende da produção e uso de alimentos vivos, assim a microalga de água doce *A. gracilis* (Reinsch) Korshikov, vem sendo utilizada como alimento vivo mais frequentemente em aquicultura (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2011).

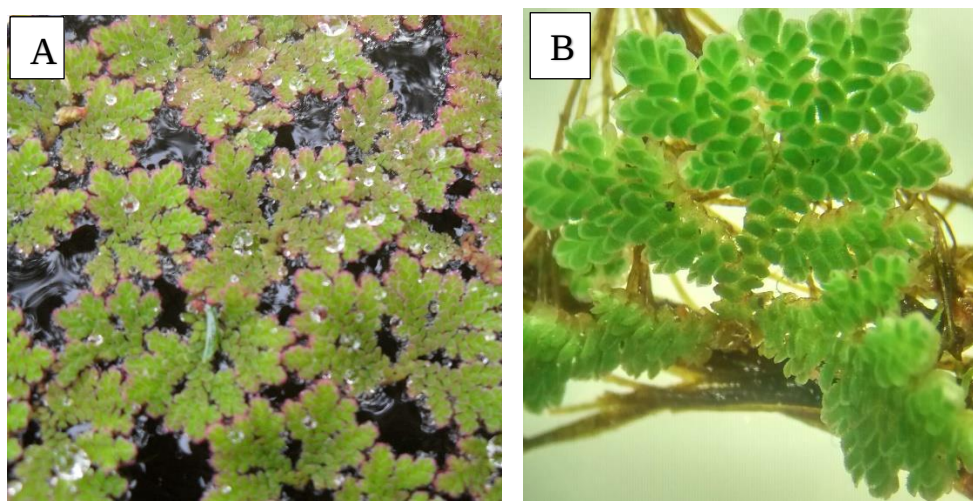
### 3.3.2- *Azolla caroliniana* e *Lemna minor*

A pteridófita aquática *Azolla* conhecida como samambaia d’água ou samambaia mosquito, é um excelente biofertilizante e adubo verde com distribuição global (YADAV et al., 2014). O nome *Azolla* é derivado das duas palavras gregas, *Azo* (para secar) e *Ollyo* (para matar), refletindo assim que a samambaia é morta pela seca. *Azolla* é um gênero de seis espécies de samambaias aquáticas, o único gênero na família Azollaceae. Crescem naturalmente em água

estagnada em canais, lagoas, rios e corpos de água, incluindo terras pantanosas, com faixa de temperatura entre 15 - 35°C (CHATTERJEE et al., 2013). São pequenas macrófitas flutuantes, com uma distribuição global em diferentes tipos de água. *Azolla* pode ser encontrada nas lagoas, lagos, rios e mares, e pode tolerar uma alteração das condições ambientais. A taxa de duplicação em *Azolla* é de aproximadamente 2- 4 dias (PABBY et al., 2004)

A *Azolla caroliniana* (Figura 3) é uma planta delicada, pequena e triangular ou em forma poligonal (YADAV et al., 2014).

A floração de *Azolla* ocorre quando as condições ambientais (luz, temperatura, fotoperíodo, nutrientes, etc.) são ideais e, o crescimento excessivo pode formar tapetes densos e grossos (PEREIRA & VASCONCELOS, 2014). São plantas de fácil propagação e se adaptam bem aos diferentes climas e nutrientes. A viabilidade de pesquisa com esta planta é alta, uma vez que não exige tecnologias complicadas estando disponível para produtores agrícolas (CARLOS et al., 2016).



**Figura 3.** *Azolla* vista em seu ambiente natural: (A) a olho desarmado, (B) em estereomicroscópio binocular (aumento de 40X)

A macrófita *Azolla* é rica em diversos micronutrientes promotores de crescimento e minerais, sendo considerada uma rica fonte de proteínas e aminoácidos essenciais contendo vitamina A, vitamina B-12 entre outras (PARASHURAMULU et al., 2013). Apresenta baixo teor de lignina tornando-as em geral, uma alimentação nutritiva e útil para animais. Essa macrófita é rica em fósforo e nitrogênio, e tem sido utilizada com sucesso na adubação de campos de arroz na Ásia e África (SHIOMI & KITOH, 2001). Segundo Gouri et al. (2012), *Azolla* pode ser usada como fonte alimentar devido ao alto teor de nutrientes e também, como alimento para bovinos, ovinos, caprinos, suínos, coelhos e peixes.

Devido ao seu fácil cultivo em massa, a macrófita *A. caroliniana* é mais explorada como alimento animal do que como alimento para os seres humanos. Na China no entanto, tem sido sugerido que após a esterilização por vapor, a samambaia aquática pode ser usada como salada ou recheio em alimentos (LIU et al., 2008). Além disso, devido a produção rápida de biomassa, *Azolla* é amplamente utilizada como ferramenta de fitorremediação para águas superficiais (RAI, 2007; FERDOUSHI et al., 2008; LETERME et al., 2009).

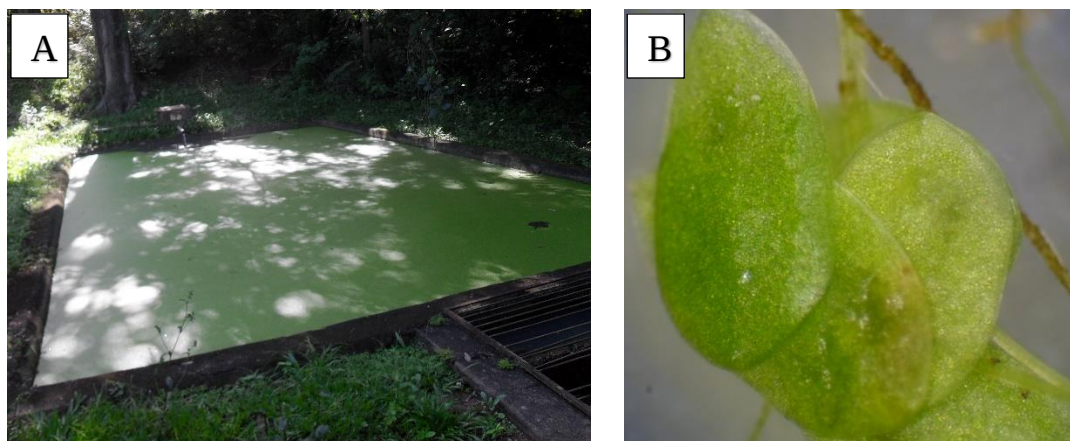
Pott e Pott (2000) destacam como características da *Azolla*, o fato de serem fonte de nitrogênio em arrozal irrigado, pois fixa esse componente nitrogenado através da alga azul Cyanobacteria *Anabaena azollae*, com a qual vive em simbiose, no interior dos folíolos. São plantas forrageiras para peixe e aves, rica em proteína; habitat de invertebrados aquáticos; despoluidora, serve para tratamento de água e esgoto, sendo capaz de retirar metais tóxicos; a folha seca tem aroma almiscarado, usada como afrodisíaco. Além disso, crescem em populações de diferentes plantas e vegetação aquática, onde não é levada pela correnteza; fica arroxeadada ao ar livre, sendo que a dispersão é por aves aquáticas, transportando as plantas vivas, sendo uma planta invasora (POTT & POTT, 2000).

A macrófita *Azolla* mesmo com suas atrativas qualidades nutricionais e relativa facilidade de produção em lagoas e campos de arroz, os relatórios sobre o uso de *Azolla* na aquicultura ainda são extremamente limitados (PANIGRAHI et al., 2014). Tendo em vista a importância da aquicultura orgânica hoje em dia o uso de *Azolla* é encontrado para ser uma das maneiras mais baratas para aumentar a produção de peixe na piscicultura biológica (RAI et al., 2012).

A família Lemnaceae, geralmente reconhecida como a família das lentilhas de água, consiste em 38 espécies que são classificadas em cinco gêneros, incluindo *Lemna*, *Spirodela*, *Landoltia*, *Wolffia* e *Wolffiella* (WANG et al., 2010). São frequentemente confundidas com algas, mas pertencem às angiospermas que compreendem a divisão Anthophyta. São monocotiledôneas aquáticas flutuantes, consideradas as menores plantas vasculares com flores do mundo (RAVEN, 2001).

*Lemnaceae* são plantas aquáticas, flutuantes emergentes ou simplesmente submersas sob a superfície da água, muito pequenas, simples, não apresentam pelos, tricomas ou estruturas similares na sua superfície externa, não ramificadas e de cor verde intensa. Raízes ausente ou presente, filiformes, brancas, com notável coifa apical. Flores imperfeitas, desencapadas, reduzidas a um gineceu simples, com o ovário unicarpelar, e 1-2 estames solitários, todos geralmente protegidos por uma espátula cristalina (NOVARA, 2014).

A espécie *Lemna minor* (Figura 4) da família Lemnaceae, é uma espécie representativa de corpos de água lânticos, e são as menores plantas vasculares do mundo, além de serem espécies vegetais que se adaptaram ao ambiente aquático ao longo de seu processo evolutivo (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004).



**Figura 4.** *Lemna* vista em seu ambiente natural: (A) a olho desarmado, (B) em estereomicroscópio binocular (aumento de 40X)

A *L. minor*, é uma pequena planta aquática cuja haste e folhas são modificadas e funcionam tanto na fotossíntese como na reprodução vegetativa. As lentilhas d'água são usadas na pesquisa científica básica e propostas em várias aplicações como o monitoramento de metais em recursos hídricos e de outros tipos de poluentes, para o uso em testes de toxicidade em função do seu pequeno tamanho, estruturas simples e rápido crescimento (WANG et al., 2010). Além disso, é um eficaz agente de fitorremediação utilizado para corpos d'água contaminados (MKANDAWIRE & DUDEL, 2007). Adapta-se facilmente as diversas condições aquáticas em lagoas estagnadas ou riachos de correntes lentas (MOVAFEGHI et al., 2013).

Pott e Pott (2000) descrevem *Lemna* como uma planta que pode sobreviver vários dias em solo úmido, o banco de sementes deixado no solo na seca, germina na enchente, numa explosão de plântulas que cobrem grande parte do corpo d'água, quando dominante sombreiam as submersas. Também é indicadora de água eutrofizada, espalhou-se pelo mundo através da cultura do arroz irrigado, considerada despoluidora de água e alimento de aves aquáticas, de pequenos peixes e organismos aquáticos, preferindo água lântica, parcialmente sombreada, e com teor de nutrientes médio a alto (POTT & POTT, 2000).

*Lemna* se destaca por ser uma fonte alimentar alternativa, apresentando concentrações elevadas de proteínas e baixo teor de fibras (BEKCAN et al., 2009). Bejarano (1998) confirma

que a biomassa de Lemnaceae, constitui-se em ótima matéria-prima, oferecendo subsídios para incrementar as dietas alimentares para diversos animais.

O peixe *Barbonymus gonionotus* alimenta-se de macrófitas, incluindo a lentilha d'água (*Lemna spp.*) e a samambaia mosquito (*Azolla spp.*) (AHMED et al., 2015). Noor et al., (2000) avaliaram a adequação da lentilha-d'água como substituto alimentar na farinha de peixe de *B. gonionotus* e descobriram que 10% da proteína dietética da farinha de peixe poderia ser substituída pela *Lemna* na dieta. Azim e Wahab (2003) descobriram que a *Lemna* tem um efeito significativo na taxa de crescimento de *B. gonionotus* tailandesa exótica, da carpa comum e do peixe catla indígena.

Da mesma forma que a *Lemna*, a biomassa de *Azolla* tem sido usada como alimento para animais. *Lemna* e *Azolla* tem um grande potencial como uma fonte barata de alimento de peixe. Muitos trabalhos já foram realizados com *Lemna* como alimento para peixe, mas não há nenhum trabalho até agora que tenha realizado o desempenho de crescimento comparativo do peixe alimentando com lentilha d'água e samambaia d'água (AHMED et al., 2015), principalmente como meio de cultura para microalga Chlorophyceae.

### 3.3.3 *Xiphophorus maculatus* (Platy)

O peixe Platy, *Xiphophorus maculatus* (Figura 5), é uma espécie de peixe ornamental comercialmente importante que pertence à família Poeciliidae. Estes pequenos peixes de água doce (aproximadamente 5 cm), são ovovivíparos, coloração corporal presente é variável (JORDAN, 1963), e distribuídos do sul dos Estados Unidos para a América do Sul (NELSON, 2006).



**Figura 5.** Foto do peixe ornamental Platy *Xiphophorus maculatus*

O *Platy X. maculatus* (Figura 5), possui expressiva significância para a piscicultura ornamental, vive em grupo, é caracterizado principalmente por ser ovovivíparo, ou seja, os ovos se desenvolvem no ventre da fêmea e seus filhotes, ao nascerem, já saem formados com características fenotípicas de adulto. Sua reprodução é muito fácil de ocorrer e o dimorfismo sexual da família é acentuado, em sua maioria, os machos adultos são menores que as fêmeas e possuem nadadeira anal modificada em gonopódio, que é introduzido no oviduto da fêmea para a fertilização (LIMA, 2003).

O gênero *Xiphophorus* é composto por 26 espécies de pequenos peixes de água doce chamados de espadachim ou Platy. Esses peixes formam um grupo altamente diversificado predominantemente no México e exibem uma grande quantidade de variação nas partes genitais masculinas (MARCUS & MCCUNE, 1999). São chamados de caudas de espadas devido às barbatanas análogas modificadas como uma espada nos machos, algumas das quais formam o gonopódio que serve como um órgão de transferência de esperma e é usado na fertilização interna de fêmeas (JONES et al., 2016).

Os Platys são peixes populares de aquário, mas também estão sujeitos a pescarias (ABASALI & MOHAMAD, 2011). Os peixes do gênero *Xiphophorus* têm sido utilizados como modelo de pesquisa desde a década de 30 e, foram estudados em áreas que vão desde ecologia, evolução, genética e genômica até a sistemática (KANG et al., 2013; SCHARTL et al., 2013).

Platys são onívoros, com uma dieta que geralmente consiste de insetos terrestres e aquáticos, crustáceos aquáticos e matéria vegetal (ARTHINGTON, 1989), aceitando bem alimentos em flocos, dáfnias, algas, entre outros (LIMA, 2004).

Através da sua distribuição, os Platys também mostram uma variação nos traços morfológicos diferentes, como a “espada” caudal extravagante no macho, a cor do corpo e o padrão de pigmento vertical em barras, alguns dos quais são considerados importantes na escolha do parceiro (MORRIS & CASEY 1998; MARCUS & MCCUNE, 1999; KINGSTON et al., 2003). Por exemplo, Darwin reconheceu que as longas extensões coloridas da barbatana caudal ventral, ou espada, exibidas por machos de algumas espécies desses peixes, poderiam ter surgido por seleção sexual, e essas espadas mais longas mostram ser preferidas pelas fêmeas (BASOLO, 1990).

O *Platy (Xiphophorus)*, é um peixe pequeno, sexualmente dimórfico, nativo de lagoas, rios, riachos e outros ambientes aquáticos (MILLER et al., 2005). É comum no comércio ornamental, apresenta muitas variantes de cores e é produzido em instalações de aquicultura (TUCKETT et al., 2016).

As caudas das fêmeas podem armazenar espermatozóides viáveis nas dobras de seus ovidutos para fertilizar ovos maduros quando necessário. Isso significa que as linhagens subsequentes de ovos nas fêmeas podem ser fertilizados muito depois do contato com um macho. Uma única copulação pode fornecer espermatozóides viáveis para fertilização por até dois anos, com uma fêmea tendo de cinco a nove ninhadas consecutivas de um único evento de acoplamento (AXELROD & WISCHNATH, 1991).

As temperaturas ideais para a reprodução dos *Platys* são relatadas entre 22 e 26 °C, já o período de gestação varia de 26 a 30 dias (DAWES, 1991). A exigência em temperatura depende da espécie de peixe e fase de desenvolvimento em que se encontra (ovo, larva pós-larva ou juvenil). As espécies tropicais normalmente apresentam ótimo crescimento a temperaturas de 28 a 30°C. Temperaturas mínimas e máximas da água devem ser conhecidas de modo a determinar a viabilidade do cultivo de uma espécie em particular (KUBITZA, 1999). As investigações sobre as atividades reprodutivas de populações de *Platys* criadas soltas em rios na Austrália, revelaram que a temperatura também pode ser um fator no número de filhotes produzido por fêmea por gestação (TAMARU et al., 2001).

São peixes muito comuns em aquários de produtores iniciantes, por serem considerados peixes tolerantes as variações, como pH, salinidade e nutrientes (LIMA, 2004). Os peixes só se reproduzem quando submetidos aos parâmetros de qualidade da água ideais, desde que alimentos adequados principalmente em relação ao tamanho e composição alimentar, estejam disponíveis e as temperaturas apropriadas sejam mantidas (TAMARU et al., 2001).

Embora os requisitos nutricionais para os *Platys* não estejam bem documentados, todas as espécies discutidas são consideradas onívoras, no entanto, alguns preferem uma dieta contendo mais material vegetal (DAWES, 1991). Estudos sobre o conteúdo estomacal do *Platy* indicam que os insetos terrestres e aquáticos são consumidos juntamente com o fitoplâncton e algumas macroalgas (ARTHINGTON, 1989).

Muitos dos pigmentos de cor usuais do *Platy* são derivados do fitoplâncton natural e do zooplâncton consumido quando são cultivados em lagoas. Os carotenóides são um grupo de pigmentos solúveis em lipídios que ocorrem principalmente nos vegetais e fitoplâncton. Estes pigmentos são responsáveis pela grande diversidade de cores vistas na natureza. Enquanto, plantas e algas podem sintetizar esses pigmentos, os animais não conseguem produzi-los naturalmente e devem obtê-los dos alimentos ingeridos. Durante o último mês de crescimento, recomenda-se que os alimentos contendo potenciadores de cor ou pigmentos devam ser oferecidos para produzir a cor completa do peixe (AKO & TAMARU, 1999).

## 4- MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1- Cultivo da microalga

#### 4.1.1- Descrição do Laboratório de Cultivo

A área total construída do laboratório de cultivo de microalga é de 28,43 m<sup>2</sup> sendo 16,05 m<sup>2</sup> destinado ao cultivo em larga escala; 12,38 m<sup>2</sup> mantidos em condições assépticas para repicagem e armazenamento de material estéril; uma sala de cultivo (cepário) onde a cultura de *Ankistrodesmus gracilis* é armazenada num sistema com condições artificiais de temperatura, aeração e iluminação (Figura 6).



**Figura 6.** Vista panorâmica do cepário onde foi mantida a microalga *Ankistrodesmus gracilis* em erlenmeyers de 2 litros.

Na sala de cultivo a temperatura é mantida entre  $21 \pm 2^\circ\text{C}$ , contendo prateleiras do tipo vazada de modo a permitir a passagem de luz, sendo iluminada com lâmpadas fluorescentes na intensidade de  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e foto-período de 24h. A iluminação por lâmpadas fluorescentes evita a interferência na temperatura do local e são distribuídas de forma intercalada atingindo todos os ângulos do cepário. A refrigeração é mantida de forma constante por um ar condicionado e a aeração é fornecida por um sistema artificial de compressores e filtros de ar diminuindo o risco de contaminação das culturas. A sala do cepário é revestida com cerâmica cor de gelo. A aeração é abastecida por um sistema artificial de compressores que permite diminuir o risco de contaminação das culturas.

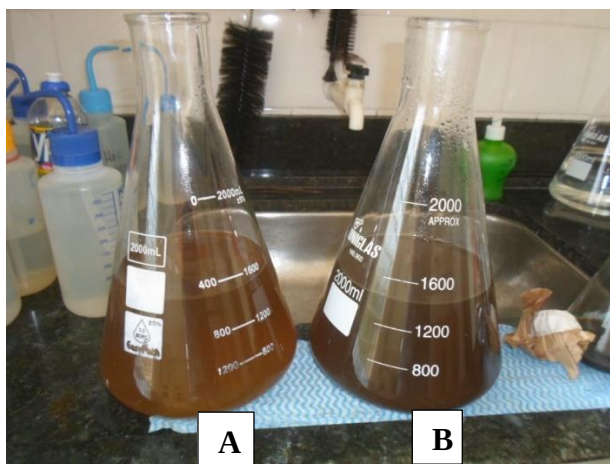
O laboratório é abastecido com água proveniente de nascente, localizada na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP- Campus de Jaboticabal, onde após a captação d'água é armazenada em reservatório, atuando como um tanque de decantação de particulados sólidos. Antes de abastecer o laboratório,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

tubulações por onde a água passa (canos/torneiras) é de materiais plásticos para evitar possíveis contaminantes.

#### 4.1.2- Preparo dos meios de cultura

Neste trabalho foi utilizada uma espécie de microalga, *Ankistrodesmus gracilis*, proveniente da Represa do Broa (São Carlos, SP), linhagem nº 005CH, e cultivada no Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton (Caunesp/ Unesp) posteriormente colocada em erlenmeyers de 2 litros, em sistema estático (“batch”) não axênico (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 1993).

Neste estudo foram utilizados dois meios de cultura com biomassa de macrófitas, um contendo *Azolla caroliniana* e outro com *Lemna minor*, e estes foram preparados um por vez, devido ao tamanho da sala de cultivo (cepário). Os meios de cultura foram preparados baseados na metodologia de Sipaúba- Tavares et al., (2009) (Figura 7).



**Figura 7.** Meio de cultura feito com biomassa de macrófitas: A- *Lemna minor* e B- *Azolla caroliniana*.

Para o preparo do meio de cultura com macrófita cinco quilos de planta foi seca e triturada. Posteriormente, o pó obtido da macrófita foi fervido em água destilada por uma hora, filtrado e autoclavado a 120°C durante 20 minutos (SIPAÚBA- TAVARES et al., 2009). Após o resfriamento 70 mL deste concentrado de macrófita foi retirado e completado para 1,4 L de água destilada, ao crescimento foi adicionado 2,5 mL de NPK e 140 mL do inóculo da microalga *A. gracilis*, cultivada em meio NPK. No caso da macrófita *A. caroliniana* a diluição foi maior adicionando 35 mL para 1,4 L de água destilada, em função da intensa coloração escura que prejudicaria a absorção de luz e crescimento da microalga. O meio NPK (20:5:20) é um fertilizante químico composto por uréia (fonte de nitrogênio), super-fosfato simples (fonte

de fósforo) e sulfato de potássio (fonte de potássio). Cerca de 70 g de fertilizante químico NPK (20:5:20) foi pesado, posteriormente triturado, diluído em 1,4 L de água destilada e autoclavado a 120°C durante 20 minutos, e adicionado junto aos meios de cultura de macrófitas (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 1993). Vitaminas do complexo B na proporção de 0,01 gL<sup>-1</sup> (7mg – B<sub>1</sub>; 7mg – B<sub>2</sub>; 5mg – B<sub>6</sub>; 33µg – B<sub>12</sub>) mais vitamina H (0,01mg) num total de 0,021 g para cada erlenmeyer.

Na Tabela 1 é apresentado as diferentes composições dos meios utilizados neste estudo e também das plantas aquáticas.

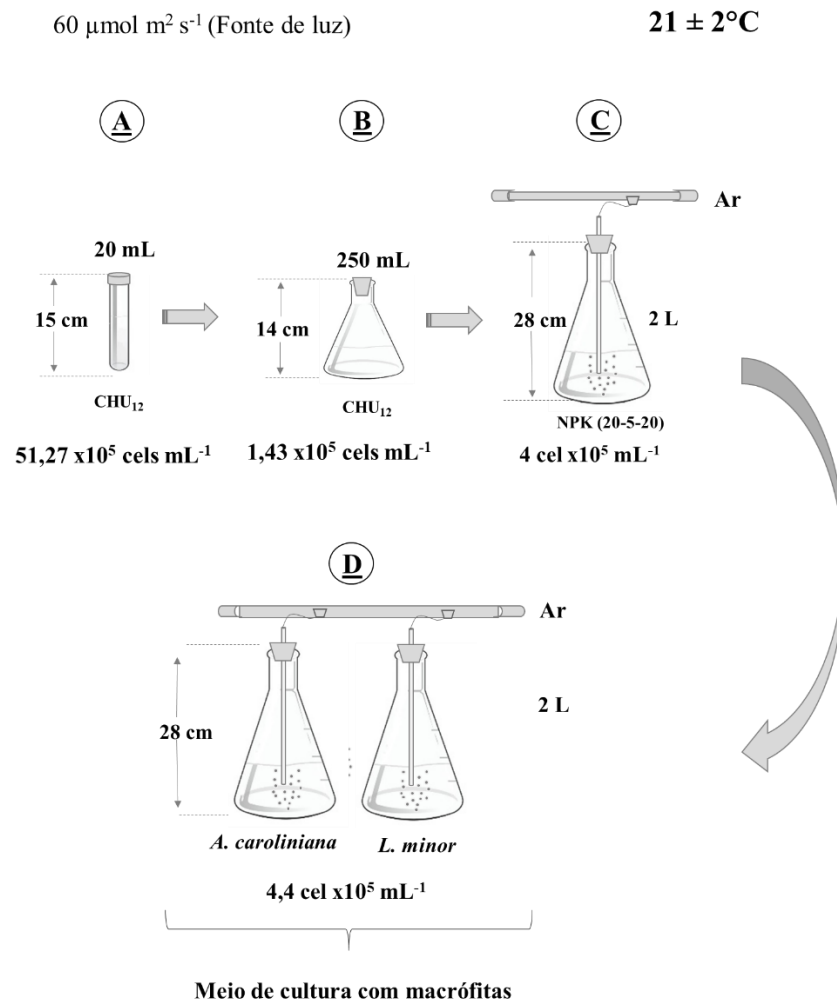
**Tabela 1-** Composição dos nutrientes nos meios de cultura e nas plantas das macrófitas *Azolla caroliniana* e *Lemna minor* para o cultivo de *Ankistrodesmus gracilis*

| Componentes                | Meios de cultura             |                                               |                                               |                              |                                               |                                               |
|----------------------------|------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|
|                            | <i>Azolla caroliniana</i>    |                                               |                                               | <i>Lemna minor</i>           |                                               |                                               |
|                            | Planta (g Kg <sup>-1</sup> ) | Meio de cultura sem alga (g L <sup>-1</sup> ) | Meio de cultura com alga (g L <sup>-1</sup> ) | Planta (g Kg <sup>-1</sup> ) | Meio de cultura sem alga (g L <sup>-1</sup> ) | Meio de cultura com alga (g L <sup>-1</sup> ) |
| C                          | 459,9                        | 1,2                                           | 2,641                                         | 486,6                        | 2,401                                         | 3,601                                         |
| Ca                         | 50,89                        | 0,518                                         | 0,963                                         | 39,67                        | 0,549                                         | 0,629                                         |
| Fe                         | 4,98                         | 0,00053                                       | 0,05608                                       | 4,13                         | 0,00064                                       | 0,06928                                       |
| K                          | 32,54                        | 2,265                                         | 0,155                                         | 25,61                        | 2,028                                         | 0,183                                         |
| Mg                         | 7,85                         | 0,165                                         | 0,154                                         | 5,92                         | 0,194                                         | 0,174                                         |
| Mn                         | 0,1                          | 0,000002                                      | 0,06478                                       | 0,01                         | 0,000003                                      | 0,06008                                       |
| N                          | 28,43                        | 0,103                                         | 0,085                                         | 30,24                        | 0,281                                         | 0,128                                         |
| P                          | 7,81                         | 0,049                                         | 0,076                                         | 9,36                         | 0,2                                           | 0,099                                         |
| Thiamina (B <sub>1</sub> ) | -                            | -                                             | 0,007                                         | -                            | -                                             | 0,007                                         |
| Vit B <sub>2</sub>         | -                            | -                                             | 0,007                                         | -                            | -                                             | 0,007                                         |
| Vit B <sub>6</sub>         | -                            | -                                             | 0,005                                         | -                            | -                                             | 0,005                                         |
| Vit B <sub>12</sub>        | -                            | -                                             | 33 µg                                         | -                            | -                                             | 33 µg                                         |
| Vit H                      | -                            | -                                             | 0,01 mg                                       | -                            | -                                             | 0,01 mg                                       |
| MO                         | 792,6                        | 2,069                                         | 4,551                                         | 838,6                        | 4,138                                         | 6,206                                         |

#### 4.1.3- Delineamento experimental

O experimento foi realizado em sistema estático em triplicata durante 28 dias, totalizando 18 recipientes para cada meio de cultura e as variáveis foram mensuradas semanalmente. O volume inicial do inóculo utilizado para manutenção das culturas foi de 20 mL na densidade de 51,27 x10<sup>5</sup> cels mL<sup>-1</sup> contendo meio CHU<sub>12</sub>, este inóculo foi repicado até

totalizar os 18 erlenmeyers em triplicata; após 7 dias o conteúdo foi transferido para erlenmeyer de 250 mL contendo ainda meio CHU<sub>12</sub> na densidade de  $1,43 \times 10^5$  cels mL<sup>-1</sup>. Posteriormente, este conteúdo após 7 dias, foi transferido para erlenmeyer de 2L na densidade de  $4 \times 10^5$  cels mL<sup>-1</sup> em meio NPK. Quando as culturas alcançaram a fase exponencial na densidade de  $4,4 \times 10^5$  cels mL<sup>-1</sup> foram transferidas para recipientes de vidro de 2L, contendo o meio de macrófita conforme observado na Figura 8.



**Figura 8.** Diagrama esquemático do cultivo da microalga *Ankistrodesmus gracilis* em volume de 2L, onde A = cepa; B = transferência para erlen de 250 mL; C = cultivo inicial em 2L somente em meio NPK (20:5:20); D = experimento em sistema fototrófico com meio de macrófita *Azolla caroliniana* e *Lemna minor*.

Após serem transferidas para os erlenmeyers de 2L contendo meio de cultura de macrófita, as características da microalga e métodos analíticos foram analisados semanalmente (1, 7, 14, 21 e 28 dias) durante todo o período de estudo.

#### 4.1.4- Variáveis do meio de cultura

A temperatura (°C), pH, oxigênio dissolvido (mg L<sup>-1</sup>) e condutividade elétrica (μS cm<sup>-1</sup>) foram mensurados com uma sonda multiparâmetros YSI 556 MPS. Amônia (μg L<sup>-1</sup>), nitrito (μg L<sup>-1</sup>), nitrato (μg L<sup>-1</sup>) e fósforo total (μg L<sup>-1</sup>) foram determinados de acordo com Koroleff (1976) e Golterman et al. (1978).

#### 4.1.5- Características da microalga

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

A taxa de crescimento (k) foi obtida utilizando as fases da curva de crescimento representada pelo número de divisões celulares por dia, através da seguinte fórmula:

$$k = (3,322/t_2 - t_1 \times \log N_2/N_1)$$

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

O tempo de duplicação ou tempo de divisão celular ou tempo de geração, foi calculado a partir dos resultados obtidos da taxa de crescimento, através da fórmula:

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

Onde Td = tempo de duplicação; 1k<sup>-1</sup> = divisões por dia (GUILLARD, 1973).

O peso seco (pg cel<sup>-1</sup>) foi determinado em triplicata após filtrar 10 mL de amostra de cada meio de cultura em filtros de fibra de vidro (GF/C 0,7 mm de tamanho de poro), previamente pesados. Posteriormente, o filtro foi seco em estufa a 60°C e submetidos a pesagem até peso constante, segundo metodologia proposta por Vollenweider (1974). A determinação do conteúdo de cinzas (pg cel<sup>-1</sup>) da microalga foi obtida incinerando os filtros em mufla a 500°C, por 4 horas. A clorofila-a foi determinada por análise colorimétrica utilizando espectrofotômetro (Femto 700 plus), após extração em etanol 90% (NUSH 1980).

Para avaliação do comprimento total (μm) cerca de 50 células foram medidas em microscópio Leica modelo- DFC 295 com o sistema de análise de imagens Las Core (LAS

V<sub>3.8</sub>), com ocular micrométrica, em um aumento de 40 vezes. O volume celular foi obtido através do cálculo do tamanho médio das células, utilizando a forma geométrica mais correspondente (forma de dois cones acoplados) de acordo com Vollenweider (1974) e Bottrel et al., (1976).

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

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

Onde: C = teor de carbono em pg.célula<sup>-1</sup>; V = volume celular

#### **4.1.6- Composição bioquímica da microalga**

Para determinação da proteína e lipídio a biomassa da microalga foi centrifugada e liofilizada baseada na metodologia proposta por AOAC (1990).

#### **4.1.7- Composição dos nutrientes das plantas aquáticas**

Para as duas macrófitas utilizadas, a biomassa das plantas foi primeiramente seca ao ar livre, posteriormente, secas a 60°C até peso constante. Os teores de nutrientes dos meios de cultura (C, Ca, Fe, K, Mg, Mn, N e P), foram analisados segundo Bataglia et al. (1983

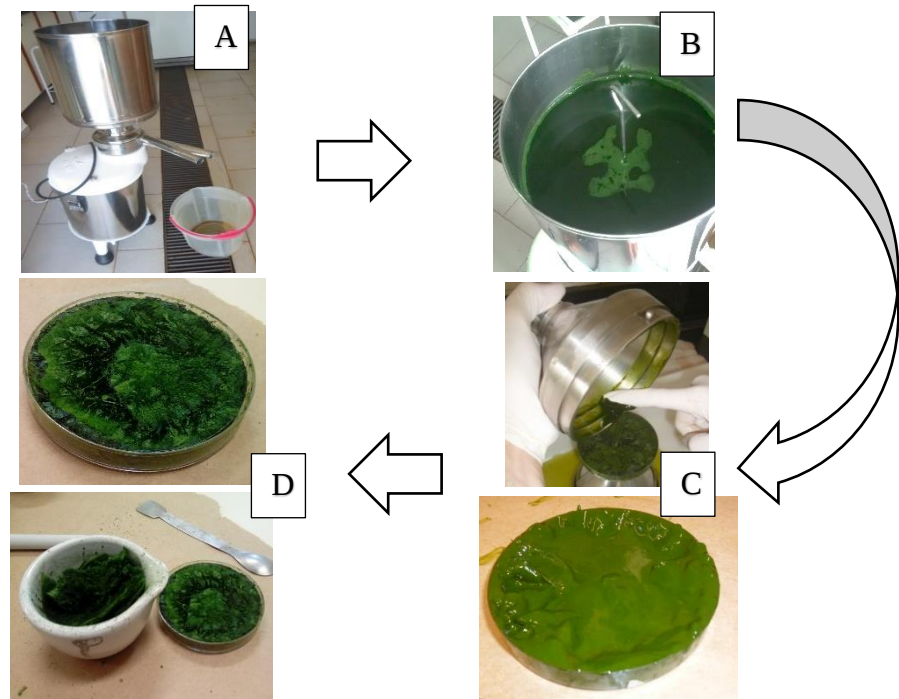
#### **4.1.8- Análise estatística dos dados**

Para as características algais foi aplicada para simples verificação entre os meios de cultura a análise ANOVA. Na ocorrência de diferenças entre as médias foi aplicado o teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram feitas com auxílio do programa STATISTICA versão 8.0 (STATSOFT, 2007).

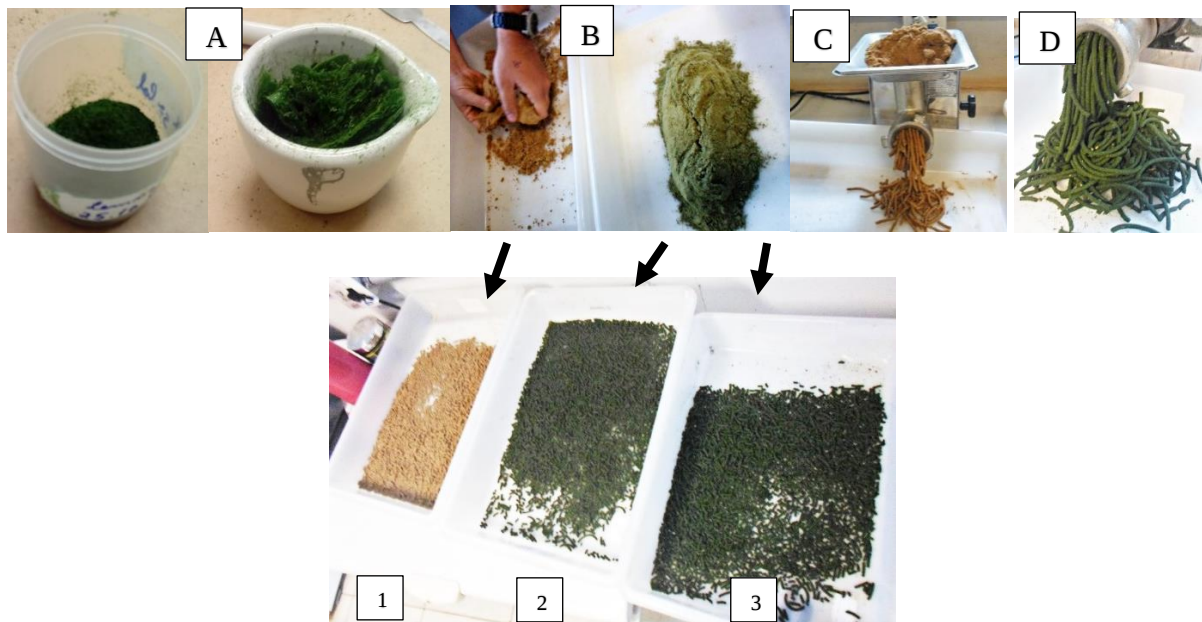
### **4.2- Alimentação do peixe ornamental *Xiphophorus maculatus***

#### **4.2.1- Extração da biomassa da microalga *Ankistrodesmus gracilis* para ser adicionada ao alimento inerte.**

Para utilização da biomassa de *Ankistrodesmus gracilis* nos dois meios de cultura utilizados, foi verificada a curva de proteína e aos 14 dias foi obtido o maior teor e assim, foi escolhido este tempo da curva de crescimento para utilizar a biomassa de *A. gracilis* junto ao alimento inerte do peixe (Figura 9). Posteriormente, a biomassa da microalga foi concentrada em centrífuga para desidratar o material e liofilizada. A biomassa liofilizada foi moída até virar pó e adicionada ao alimento inerte na quantidade de 10% (Figura 10).



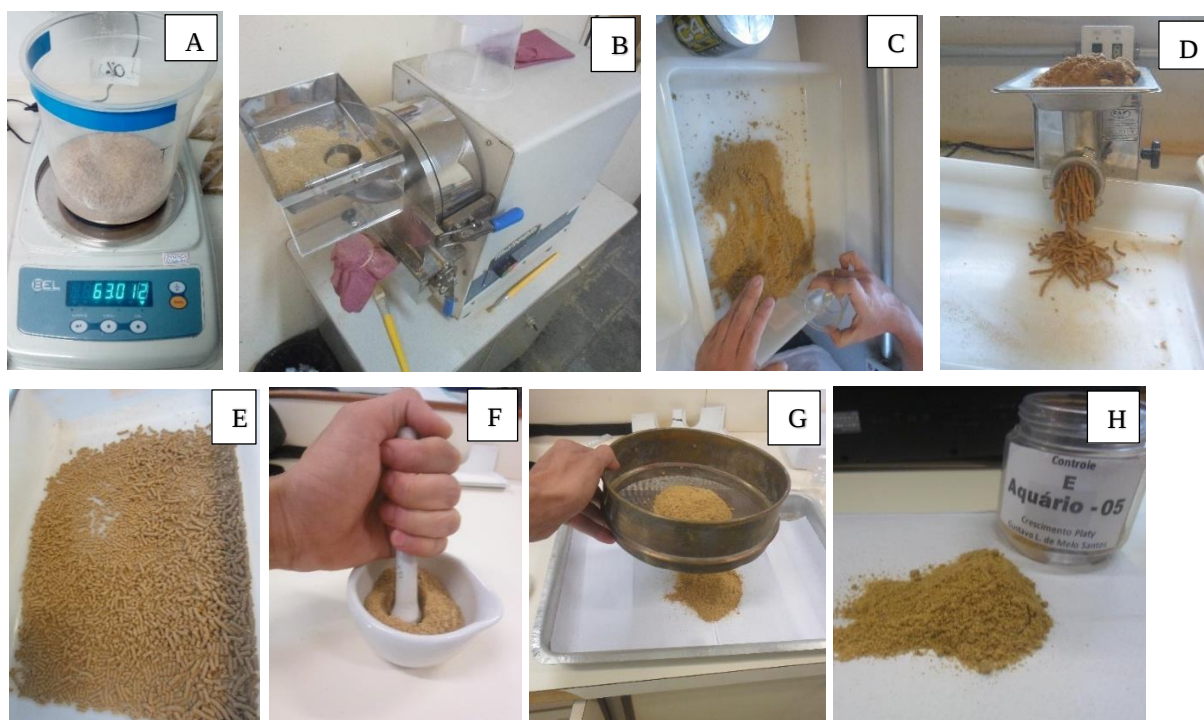
**Figura 9.** Processo de concentração do material para extração da biomassa de *Ankistrodesmus gracilis*, onde: (A) centrífuga, (B) vista do meio de cultura dentro da centrífuga, (C) biomassa da microalga concentrada, (D) biomassa da microalga liofilizada.



**Figura 10.** (A) Biomassa da microalga liofilizada, (B) alimento inerte (ração) sem e com a microalga *Ankistrodesmus gracilis* adicionada, (C) alimento inerte sem microalga sendo preparado em moedor de carne, (D) alimento inerte com microalga sendo preparado em moedor de carne, (1, 2, 3) alimento inerte em peletes pronto para o consumo do peixe onde: 1- somente ração (controle), 2- ração com microalga em meio de *Azolla caroliniana* e 3- ração com microalga em meio de *Lemna minor*

#### 4.2.2- Preparo do alimento inerte

O alimento inerte (ração) foi formulado contendo 32% de proteína bruta, 4,866 cal/g de energia bruta e 13,3% de lipídio, produzido e preparado na Unidade de Rações do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP) de acordo com Tamaru e Ako (1999). Os ingredientes que compõem o alimento inerte foram pesados, homogeneizados e misturados com água. Posteriormente, o alimento inerte foi peletizado em moedor de carne e seco ao ar livre por 24 horas. Para reduzir o tamanho das partículas fornecidas como alimento aos peixes, os pélletes foram processados por meio de moagem e peneirados até obtenção de grânulos de 0,005- 0,05 mm de diâmetro geométrico médio (DGM) (Figura 11).



**Figura 11.** Preparo do alimento inerte onde: (A) pesagem dos ingredientes, (B) mistura dos ingredientes na extrusora (C) mistura dos ingredientes com óleo e água, (D) moendo o alimento inerte, (E) secagem do alimento inerte, (F) quebra dos grânulos maiores, (G) passagem por peneira para padronização do tamanho do grânulo, (H) alimento inerte pronto para ser fornecido ao *Platy X. maculatus*.

#### 4.2.3- Preparo do alimento inerte com microalga

Para cada dieta, foi analisada a composição química-bromatológica do alimento inerte (ração) referente ao conteúdo de matéria seca, fibra bruta, proteína bruta, extrato etéreo, energia bruta determinada segundo a metodologia proposta pela A.O.A.C. (1990). Na Tabela 2 observa-se a composição das 3 dietas alimentares utilizadas.

**Tabela 2.** Ingredientes e formulações de tratamentos dietéticos onde: alimento inerte (AI) com *Ankistrodesmus gracilis* em meio de cultura com *Azolla caroliniana* (AAC) e *Lemna minor* (ALM) para juvenis de *Xiphophorus maculatus* em experimento de 90 dias

| Ingredientes (g kg <sup>-1</sup> )    | Dietas tratamento |                      |        |
|---------------------------------------|-------------------|----------------------|--------|
|                                       | Alimento inerte   | Dietas de macrófitas |        |
|                                       | AI                | AAC*                 | ALM*   |
| Farelo de soja                        | 87,36             | 70,59                | 67,9   |
| Milho                                 | 111,22            | 116,1                | 118,92 |
| Farinha de peixe                      | 101,11            | 124,24               | 113,17 |
| Farinha de trigo                      | 58,12             | 65,88                | 63,38  |
| Óleo de soja                          | 31,75             | 30,12                | 27,16  |
| Lisina                                | 4,04              | 4,71                 | 4,53   |
| Calcário                              | 2,43              | 2,35                 | 2,72   |
| Metionina                             | 2,02              | 2,35                 | 2,26   |
| Mix de vitaminas minerais§            | 2,02              | 2,35                 | 2,26   |
| Sal                                   | 2,02              | 2,35                 | 2,26   |
| Antifúngico £                         | 1,21              | 1,41                 | 1,36   |
| Fosfato                               | 1,01              | 0,94                 | 1,36   |
| BHT ¶                                 | 0,12              | 0,14                 | 0,14   |
| <i>Azolla caroliniana</i> +microalga* | 0                 | 47,06                | 0      |
| <i>Lemna minor</i> +microalga *       | 0                 | 0                    | 45,27  |

| Composição                           | Dietas tratamento |                      |        |
|--------------------------------------|-------------------|----------------------|--------|
|                                      | Alimento inerte   | Dietas de macrófitas |        |
|                                      | AI                | AAC*                 | ALM*   |
| Matéria seca (%)                     | 95                | 94,8                 | 94,6   |
| Cinzas (%)                           | 24,8              | 17,8                 | 21,1   |
| Proteína bruta (%)                   | 32                | 33,1                 | 32,3   |
| Fibra bruta (%)**                    | 4,36              | 4,91                 | 6,11   |
| Extrato etereo (%)                   | 13,3              | 13,2                 | 12,5   |
| Energia bruta (J.g <sup>-1</sup> ) ‡ | 20.362            | 20.600               | 20.463 |

\* Microalga *Ankistrodesmus gracilis* + macrófitas, *Azolla caroliniana* e *Lemna minor*, obtidas localmente.

‡Energia bruta: calculado pelo calorímetro da bomba de oxigênio.

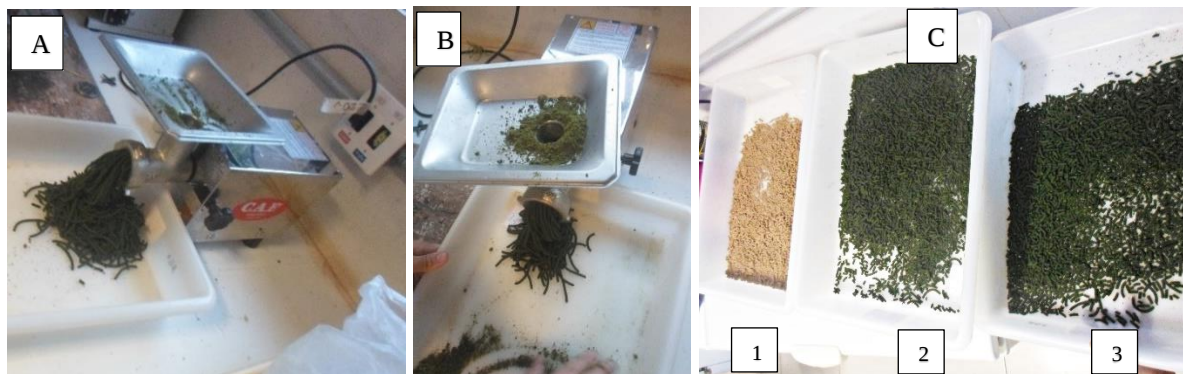
\*\*Fibra bruta: dados calculados

§Mineral –Mix de vitaminas (unidades em kg<sup>-1</sup> dieta basal): vitamina A= 500000 UI; vitamina D3= 200000 UI; vitamina E= 5000 UI; vitamina K3= 1000 mg; vitamina C= 15000 mg; vitamina B1= 1500 mg; vitamina B2= 1500 mg; vitamina B6= 1500 mg; vitamina B12= 4000 mg; biotina= 50 mg; Fe= 5000 mg; ácido fólico= 500 mg; ácido pantotênico= 4000 mg; colina= 40 g; Co= 10 mg; Cu= 500 mg; I= 50 mg; Mn= 1500 mg; Se= 10 mg; Zn= 5000 mg.

£Antifúngico: Possui ação sinérgica de ácidos orgânicos e inorgânicos para prevenção e tratamento de contaminação fúngica e leveduras em matérias-primas, alimentos e rações.

¶BHT: butil-hidroxitolueno ou hidroxitolueno butilado, é um composto orgânico lipofílico com propriedades antioxidantes.

Na preparação das dietas contendo microalga liofilizada associada ao alimento inerte, o procedimento no preparo foi igual ao apresentado no item 4.2.1 e 4.2.2 (Figura 12).

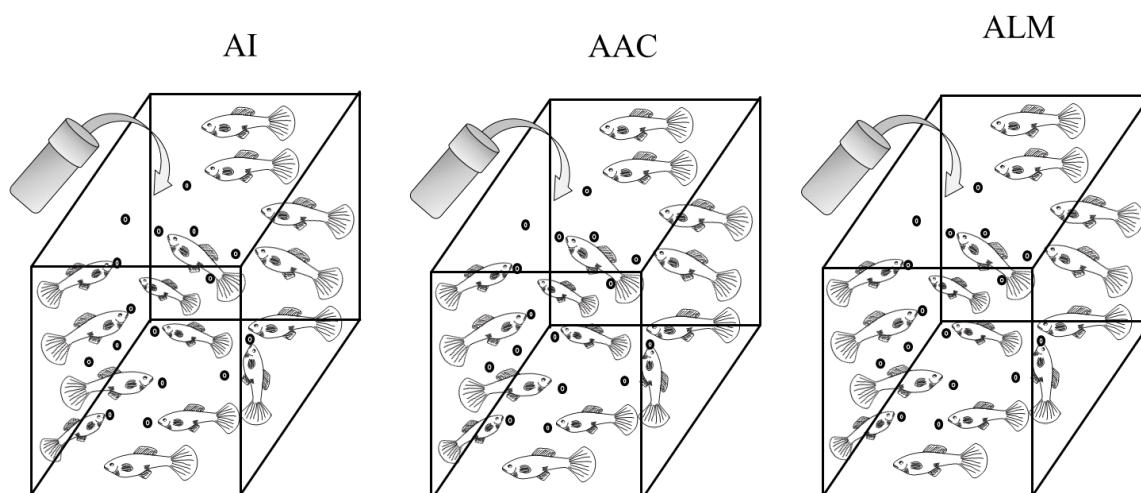


**Figura 12.** Preparo do alimento inerte (ração) com a microalga *Ankistrodesmus gracilis* onde: (A) moendo o alimento inerte (*Azolla caroliniana*), (B) moendo o alimento inerte (*Lemna minor*), (C) alimento inerte em grânulos sendo: 1- somente ração (controle), 2- ração com microalga em meio de *A. caroliniana* e 3- ração com microalga em meio de *L. minor*.

#### 4.2.4- Delineamento experimental

O experimento foi conduzido no Laboratório de Peixes Ornamentais do Centro de Aquicultura (CAUNESP) da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP (21° 14 'S e 48° 17'W. Foram utilizados duzentos e vinte e cinco juvenis de machos e fêmeas da espécie *Platy (Xiphophorus maculatus)*, com peso inicial médio variando de 0,21 a 0,39 g, distribuídos em um delineamento experimental inteiramente casualizado com três tratamentos e cinco repetições totalizando quinze unidades experimentais, com fluxo contínuo de água, temperatura ao redor de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 12 horas (luz/ escuro).

Os tratamentos alimentares consistiram em fornecer uma alimentação inerte (ração) com adição de microalga cultivada com dois meios de cultura de macrófitas, sendo um com *Azolla caroliniana* e outro com *Lemna minor*. Esse alimento foi fornecido duas vezes ao dia (às 9 e 16 h) por um período de noventa dias. Os tratamentos alimentares foram AI = alimento inerte, somente ração (controle); AAZ = alimento inerte com microalga *A. gracilis* cultivada em meio de cultura *A. caroliniana* e ALM = alimento inerte com microalga *A. gracilis* cultivada em meio de cultura *L. minor*. Todos os dias, antes da primeira refeição, os resíduos do fundo dos aquários foram retirados e realizada troca de 40% do volume da água (Figura 13).



AI- Somente alimento inerte (controle- ração)

AAC – Ração com *A. gracilis* cultivada em meio de cultura com biomassa de *Azolla caroliniana* (10%)

ALM – Ração com *A. gracilis* cultivada em meio de cultura com biomassa de *Lemna minor* (10%)

**Figura 13.** Delineamento experimental da alimentação do Platy, *Xiphophorus maculatus* utilizando o alimento inerte juntamente com a microalga *A. gracilis* cultivada em diferentes meios de cultura, onde AI= somente alimento inerte (controle), AAC= alimento inerte com microalga em meio de cultura com *Azolla caroliniana*, ALM= alimento inerte com microalga em meio de cultura com *Lemna minor*.

#### 4.2.5- Variáveis limnológicas

Algumas variáveis limnológicas da água dos aquários foram mensuradas semanalmente. A temperatura, a condutividade, pH, e oxigênio dissolvido foram mensurados através de uma sonda multiparâmetros YSI 6820. A amônia, nitrito, nitrato, fósforo total foram determinados de acordo com Koroleff (1976) e Golterman et al., (1978).

#### 4.2.6- Desempenho zootécnico

Os peixes foram medidos para avaliar o comprimento padrão (CP) com escala graduada e ganho em peso (GP), sendo pesados em balança com precisão de 0,1g. Para realizar o cálculo de comprimento padrão e ganho em peso, foram efetuados medições no início e no final do experimento. A taxa de crescimento específico (TCE) foi calculada de acordo com a equação de Kestmonts e Stalmans (1992); onde: Ln = logaritmo neperiano

Sobrevivência (S): porcentagem de indivíduos que sobreviveram até o final de cada período experimental, obtida pela seguinte equação:

$$S (\%) = \frac{\text{Número final de peixes}}{\text{Número inicial de peixes}} * 100$$

Ganho em peso médio (GPM):

$$\text{GPM} = \text{Peso médio final} - \text{Peso médio inicial}$$

Consumo médio de ração (CMR)

$$\text{CMR (g/peixe)} = \frac{\text{Consumo total de ração (g)}}{\text{Número de peixes}}$$

A conversão alimentar aparente (CA) foi obtida a partir da seguinte equação:

$$\text{CA} = \frac{\text{Consumo total de ração (g)}}{[\text{Ganho de peso dos peixes (g)}] \times [\text{Número de peixes na parcela}]}$$

Para a taxa de crescimento específico (TCE) foi empregada a seguinte equação:

$$\text{TCE (\%/dia)} = \frac{(\text{Ln}) \text{ Peso médio final} - (\text{Ln}) \text{ Peso médio Inicial}}{\text{Tempo de experimento (dias)}} \times 100$$

#### 4.2.7- Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA-one way. Na ocorrência de diferenças entre as variáveis medidas para cada dieta alimentar, foi aplicado o teste de Fisher (LSD) ao nível de 5% de significância, utilizando o programa STATISTICA versão 8.0 (Statsoft, 2007).

## 5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1- Cultivo da microalga *Ankistrodesmus gracilis*

Em relação aos nutrientes contidos nos meios de cultura citados na Tabela 1, é possível observar nas composições dos meios utilizados, que dentre os macro e micronutrientes analisados, o ferro, manganês, magnésio, cálcio e fósforo foram similares entre as plantas. Já o carbono, potássio e nitrogênio se mostraram superior no meio de cultura *Lemna minor*.

O carbono em ambos os meios de cultura se mostrou maior na presença da microalga *Ankistrodesmus gracilis*. A microalga por ser fotossintetizante necessita de uma quantidade maior de carbono, assim consumindo o dióxido de carbono na presença de luz e transformando

esse carbono em açúcares que posteriormente, podem ser transformados em lipídios, ou apenas acumula o carbono até liberação posterior de oxigênio (BORGES, 2007).

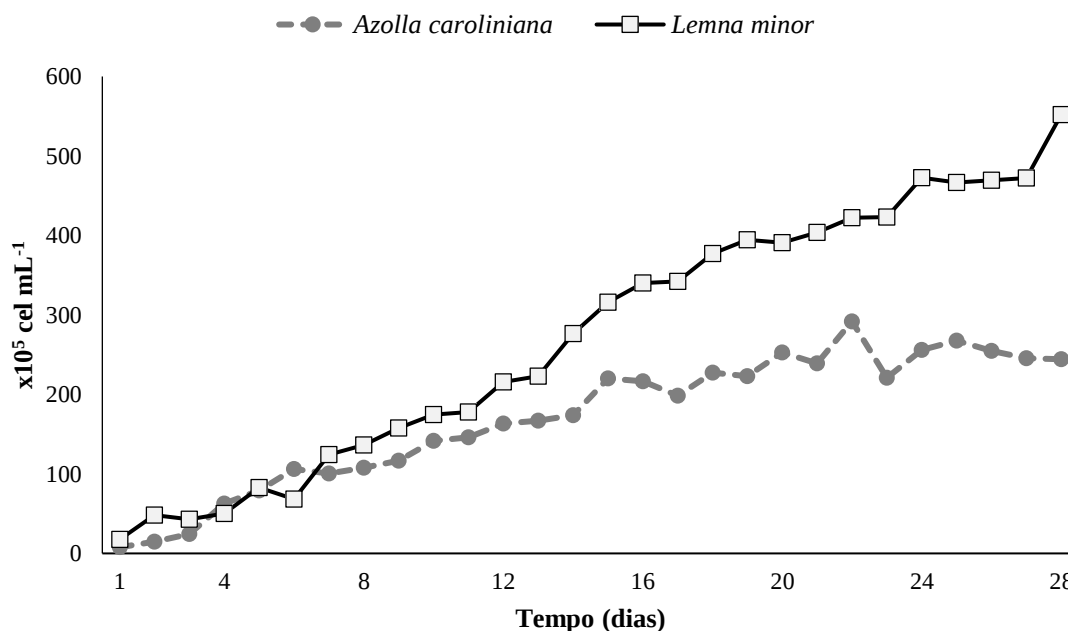
O potássio desempenha papel crucial em muitos processos metabólicos fundamentais de plantas e algas em geral, neste estudo o potássio foi elevado nos dois meios de cultura sem a adição da microalga *A. gracilis*, no entanto, na presença da microalga o valor diminuiu drasticamente. Durante o crescimento da microalga o potássio é absorvido e consumido (YI-FANG et al., 2008). A quantidade de potássio mostrado na tabela 1, demonstrou que quando adicionado a microalga aos meios de cultura o potássio diminuiu drasticamente, devido ao fato de ser absorvido e consumido, sendo que onde tinha mais potássio sobrou menos quando adicionado a microalga, e onde tinha menos potássio sobrou mais potássio depois de adicionar a microalga.

O potássio, juntamente com nitrogênio e fósforo é um dos três principais macronutrientes para a produção de biomassa (GROBBELAAR, 2004). O potássio desempenha um papel biológico significativo, porque é um ativador para uma série de enzimas envolvidas na fotossíntese e na respiração, que afeta a síntese de proteínas e carboidratos e regula o potencial osmótico de células, sendo absorvido ativamente pelas células (MALHOTRA & GLASS, 1995).

O carbono contribui para todos os compostos orgânicos, sendo o principal elemento da biomassa microalgal, totalizando 65% do peso seco. O nitrogênio é o segundo elemento mais abundante na biomassa de microalgas e seu conteúdo varia de 1% até 14% (geralmente em torno de 5 e 10%) de peso seco, enquanto que o fósforo é um dos nutrientes mais importantes para o crescimento de microalgas e seu conteúdo de biomassa varia de 0,05% até 3,3% (GROBBELAAR, 2004). Neste estudo, os nutrientes analisados necessários para o bom desempenho, crescimento e desenvolvimento de *A. gracilis* foram superiores na planta *L. minor*.

Além do carbono, a multiplicação das células das microalgas requer nitrogênio para síntese de aminoácidos (PEREZ-GARCIA et al., 2011). Portanto, o carbono e o nitrogênio devem ser fornecidos inicialmente para garantir uma taxa de crescimento satisfatória e no caso do nitrogênio, deve ser mantido a níveis baixos para promover a síntese de lipídios em quantidade satisfatória para a microalga (PAGNANELLI et al., 2014).

O crescimento de *A. gracilis* em meio de *L. minor* foi constante até o 28º dia de experimento onde foi observado a densidade celular máxima de  $552 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup>. No caso do meio de cultura com *Azolla caroliniana* a densidade foi de  $292 \times 10^5$  cel mL<sup>-1</sup> (22º dia) e posteriormente, tendeu a decrescer até o final do experimento (Figura 14).



**Figura 14-** Curva de crescimento da microalga *Ankistrodesmus gracilis* em diferentes meios de cultura de macrófitas (*Azolla caroliniana* e *Lemna minor*)

O experimento foi finalizado com 28 dias pois, normalmente esse é o período de senescência de microalgas em geral, apesar disso *L. minor* continuou crescendo e teve seu pico de crescimento no 28º dia, o que mostra que se o experimento continuasse os valores poderiam ser mais elevados. Já *A. caroliniana* pode não ter crescido tanto quanto *L. minor* devido a diluição necessária para realização do experimento, mas se observado a análise do macro e micronutrientes fica provado que em relação aos nutrientes não houveram diferenças grandes o suficiente para interferir no crescimento.

Kalita et al. (2011) trabalhando com *Ankistrodesmus falcatus*, obtiveram no meio de cultura BG-11  $12 \times 10^5$  células mL e  $9 \times 10^5$  células mL no meio de cultura BBM, já neste estudo foram obtidos valores máximos de  $552 \times 10^5$  células mL no meio de *L. minor* e de  $292 \times 10^5$  células mL no meio de *A. caroliniana*.

O crescimento de *A. gracilis* foi maior no meio de cultura *L. minor*, com a fase exponencial até o 28º dia, enquanto que no meio de cultura de *A. caroliniana*, foi inferior e a partir do 22º dia passou a decrescer, contudo a microalga cresceu neste meio de cultura. Sipaúba-Tavares et al. (2009), trabalhando com meio de cultura de macrófita de *Eichhornia crassipes* entre o 3º e 12º dia alcançou um total de  $525 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup> e, para o cultivo em meio de cultura CHU<sub>12</sub> entre o 5º e 11º dia com  $448 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup>, com posterior declínio

em ambos os meios; mostrando maior densidade celular no meio de cultura contendo macrófitas do que no meio de cultura comercial CHU<sub>12</sub>.

Os resultados de Kalita et al. (2011) são menores que os apresentados nesse estudo com o meio de cultura de *L. minor* e de *A. caroliniana*, já os resultados obtidos por Sipaúba-Tavares et al. (2009), apesar de terem sido maiores que *A. caroliniana* e menor que *L. minor*, demonstram serem melhores por terem conseguido uma alta biomassa em um período de tempo menor.

A densidade celular média e máxima, taxa de crescimento e clorofila-*a* foram mais elevadas ( $p < 0,05$ ) no meio *L. minor* e consequentemente, com tempo de duplicação mais rápido, já os teores de carbono orgânico e volume celular foram similares ( $p > 0,05$ ) nos dois meios de cultura utilizados. O comprimento total, conteúdo de cinzas e peso seco foram mais elevados ( $p < 0,05$ ) no meio *A. caroliniana* (Tabela 3).

**TABELA 3-** Características de *Ankistrodesmus gracilis* cultivada em meio contendo as macrófitas

| Características                                                   | Meios de cultura          |                    | ANOVA      |
|-------------------------------------------------------------------|---------------------------|--------------------|------------|
|                                                                   | <i>Azolla caroliniana</i> | <i>Lemna minor</i> |            |
| Carbono orgânico total (pg cel <sup>-1</sup> )                    | 4,406 ± 1,811             | 3,920 ± 1,800      | NS         |
| Clorofila- <i>a</i> (g L <sup>-1</sup> )                          | 1,7 ± 1,07                | 3,2 ± 0,5          | $p < 0,05$ |
| Comprimento total (µm)                                            | 19,33 ± 0,4               | 17,64 ± 0,4        | $p < 0,05$ |
| Conteúdo de cinzas (pg cel <sup>-1</sup> )                        | 5,2 ± 1,3                 | 3 ± 0,5            | $p < 0,05$ |
| Densidade celular média (x10 <sup>6</sup> cel mL <sup>-1</sup> )  | 17 ± 8                    | 27,5 ± 16,3        | $p < 0,05$ |
| Densidade celular máxima (x10 <sup>6</sup> cel mL <sup>-1</sup> ) | 29,2 ± 3,9                | 55,2 ± 10          | $p < 0,05$ |
| Peso seco (pg cel <sup>-1</sup> )                                 | 397 ± 86                  | 332 ± 75           | $p < 0,05$ |
| Taxa de crescimento (k)                                           | 0,15                      | 0,18               | -          |
| Tempo de duplicação (dias)                                        | 6,8                       | 5,4                | -          |
| Volume celular (µm <sup>3</sup> )                                 | 31 ± 12                   | 27 ± 12            | NS         |

NS = Não significativo

- = Não testado

Nos resultados obtidos neste estudo, com meio de cultura *L. minor* e *A. caroliniana* a taxa de crescimento para *A. gracilis* foi mais elevada do que a obtida por Sipaúba-Tavares e Pereira (2008) trabalhando com meio NPK ( $k = 0,13$ ), no cultivo de *A. gracilis*. Em contrapartida, o meio de cultura com *Eichhornia crassipes* a taxa de crescimento para *A. gracilis* foi de 0,24 (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2015a), mostrando-se superior a taxa de crescimento encontrado para esta mesma microalga nos dois meios utilizados neste estudo.

Os níveis elevados de clorofila-*a* em *A. gracilis* cultivada em meio de macrófitas foram associados as condições intrínsecas da Chlorophyceae, que de acordo com Chen et al. (2009) este grupo de microalgas apresenta elevado teor de clorofila-*a*, ou aproximadamente 45% de peso seco. Hardy e Castro (2000), trabalhando em meio de fertilizante inorgânico NPK com *A. gracilis* obtiveram valor para clorofila-*a* de 1 g L<sup>-1</sup>, valor esse inferior ao obtido nesse estudo tanto no meio de *A. caroliniana* (1,7 g L<sup>-1</sup>) quanto no meio de *L. minor* (3,2 g L<sup>-1</sup>); já Kalita et al. (2011) com o meio de cultura BBM com 0.04M de NaCl, obtiveram o valor de 2,6 g L<sup>-1</sup> de clorofila-*a*, maior que o encontrado nesse estudo em meio de cultura com *A. caroliniana*, e menor que o encontrado em *L. minor*.

Hardy e Castro (2000), trabalhando com *A. gracilis* cultivada em meio NPK obtiveram 125 µg de peso seco, e 10 µg de cinzas, sendo o valor de peso seco inferior aos obtidos nesse estudo, e um conteúdo de cinzas maior que o encontrado nos meios de *A. caroliniana* e *L. minor*.

O pH foi alcalino variando de 7 a 10 no meio *A. caroliniana* e de 7 a 9 no meio *L. minor* durante todo período experimental (28 dias). O oxigênio dissolvido ficou acima de 6 mg L<sup>-1</sup> em função da aeração constante do meio. A condutividade foi mais elevada no meio de *A. caroliniana* com valor médio de 494,2 µS cm<sup>-1</sup>, enquanto no meio de cultura de *L. minor* a condutividade média foi de 468,4 µS cm<sup>-1</sup> (Tabela 4).

**Tabela 4-** Variação de qualidade d'água, compostos nitrogenados e fósforo total nos meios de cultura *Azolla caroliniana* e *Lemna minor* para o cultivo de *Ankistrodesmus gracilis*.

| Variações                                 | Meios de cultura          |                    | ANOVA  |
|-------------------------------------------|---------------------------|--------------------|--------|
|                                           | <i>Azolla caroliniana</i> | <i>Lemna minor</i> |        |
| pH                                        | 8,7 ± 0,2                 | 8,7 ± 0,2          | NS     |
| Condutividade (µS cm <sup>-1</sup> )      | 494,2 ± 32,3              | 468,4 ± 33,3       | NS     |
| Oxigênio dissolvido (mg L <sup>-1</sup> ) | 7 ± 0,1                   | 7 ± 0,6            | NS     |
| Nitrato (mg L <sup>-1</sup> )             | 0,07 ± 0,03               | 0,1 ± 0,02         | NS     |
| Nitrito (mg L <sup>-1</sup> )             | 0,2 ± 0,04                | 0,2 ± 0,03         | NS     |
| Amônia (mg L <sup>-1</sup> )              | 0,5 ± 0,1                 | 0,7 ± 0,06         | NS     |
| Fósforo total (mg L <sup>-1</sup> )       | 0,7 ± 0,01                | 1,1 ± 0,042        | p<0,05 |

NS = Não significativo

George et al. (2014) trabalhando com *Ankistrodesmus falcatus* em diferentes meios de cultura, obtiveram os valores de pH 7,6 no meio CHU-10, 7,2 no meio BG-11, 7,5 no meio BBM, e 10 no meio ZM, enquanto que o pH obtido nesse estudo foi de 8,7 em ambos os meios

de cultura, o que mostra que *Ankistrodesmus* suporta diferentes variações ao longo do seu cultivo.

Sipaúba-Tavares et al. (2017) relataram que em meio de cultura com macrófita *Eichhornia crassipes* a condutividade foi de  $1,125 \mu\text{S cm}^{-1}$  e de  $384 \mu\text{S cm}^{-1}$  para o meio CHU<sub>12</sub>, já nesse estudo em ambos os meios de cultura de macrófitas obteve-se valores similares e próximos ao meio CHU<sub>12</sub>. Além disso, o oxigênio dissolvido foi igual ao relatado por pelos autores para o meio NPK e CHU<sub>12</sub>, em função da aeração constante do meio.

Os nutrientes presentes no meio de cultura foram similares exceto o fósforo que foi mais elevado ( $p < 0,05$ ) no meio de cultura com *L. minor*, onde as concentrações estiveram em média com  $1,1 \text{ mg L}^{-1}$  (Tabela 3). Em geral, os nutrientes foram maiores em média no meio de cultura de *L. minor*.

Kong et al. (2010) verificaram que o principal motivo para haver diferenças entre a quantidade de fósforo poderia ser a menor taxa de crescimento causada pela transmissão de luz. A limitação incidente no meio de cultura de *A. caroliniana*, pode ter dificultado que as células algais não absorvessem o fósforo igualmente no meio de *L. minor*, para produzir elevada biomassa. Além disso, outros parâmetros, como a relação N/P, podem não ter contribuído para o melhor desempenho de *A. caroliniana* em termos de quantidade de N e P nos meios de cultura em comparação com *L. minor*.

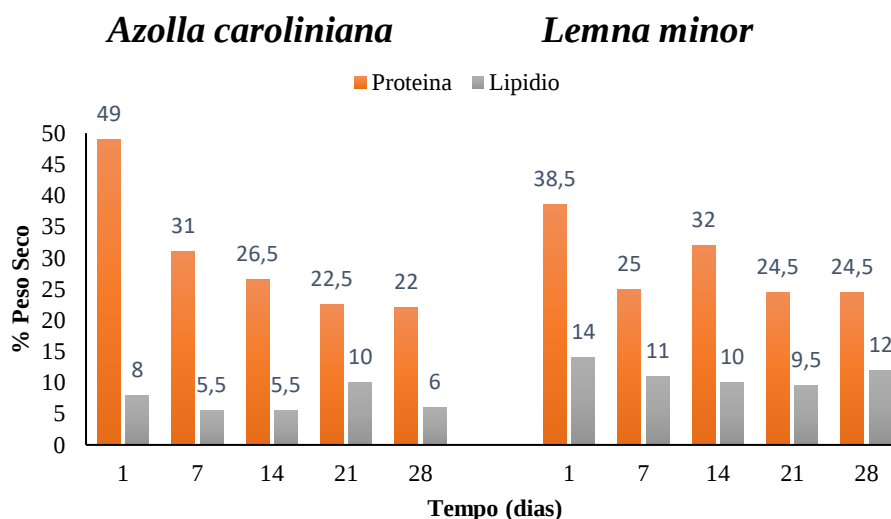
Com base nas pesquisas de Dortch (1990) e Wang et al. (2010) as microalgas também precisam de concentrações suficientes de fósforo para crescimento adequado. O crescimento de microalgas diminui ou é interrompido quando o fósforo total for  $\leq 0,045 \text{ mg L}^{-1}$ . No entanto, alta concentração de fósforo  $\geq 1,65 \text{ mg L}^{-1}$  pode não ser adequada para determinados tipos de microalgas, resultando em decréscimo na biomassa.

O teor de proteína do meio de cultura *A. caroliniana* decresceu ao longo do período experimental variando de 49% a 22% de peso seco. No meio de cultura *L. minor* durante todo o período experimental os teores de proteína oscilaram, sendo iguais nos dias 21 e 28, com peso seco de 24,5%, e mais elevado no 1º dia com 38%. Nos meios de cultura o teor de proteína foi acima de 24% de peso seco para *L. minor* e de 22% para *A. caroliniana*. Em geral, os teores de lipídio foram mais elevados no meio *L. minor* variando de 9,5% de peso seco (21º dia) a 14 % de peso seco (1º dia) e, no meio *A. caroliniana* variou de 5,4 % de peso seco (14º dia) a 9,9 % de peso seco (21º dia) ao longo do período experimental (Figura 15).

A curva de crescimento algal é de grande importância, uma vez que a fase exponencial é considerada o período ideal para fornecimento em forma de alimento aos organismos aquáticos, pois as células encontram-se em divisão celular com elevado número de indivíduos,

tendo como produto final produção de proteína (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 1993; GEORGE et al., 2014). Neste estudo, o cultivo de *A. gracilis* nos meios de macrófitas utilizadas mostraram-se positivos com teores de proteína acima de 24%.

De acordo com Leng et al. (1995) *Lemna* é rica em proteína, e deve ser utilizada para alimentação animal. Van Hove e Lopez (1983) observaram que o teor de proteína bruta de *Azolla* pode variar de 13 para 34,5% de peso seco, enquanto Chatterjee et al. (2013) mostraram que esses valores para as diferentes espécies de *Azolla* variaram entre 1,6- 5,05%. Neste estudo, observa-se que o meio de cultura *A. caroliniana* ao longo do período de crescimento acima dos obtidos por estes autores, e mais elevados do que os obtidos por Chatterjee et al. (2013). Para *L. minor* os valores de proteínas são variados e podem atingir desde 12% (ZHAO et al., 2014), 14% de peso seco (ZAHER et al., 1995) e 31% de peso seco (SHIREMAN et al., 1977).



**Figura 15-** Variação semanal do teor de proteína e lipídio nos meios de cultura.

George et al. (2014), cultivando *Ankistrodesmus falcatus* em meio BG-11 obtiveram um teor máximo de lipídio de 35,13%, obtido quando cultivada sob 12 h de luz e 12 h de condições escuras, e 39,2 % de proteína. Sendo assim, os resultados de proteína foram similares aos encontrados neste estudo, enquanto que lipídio foi superior em *A. falcatus* no meio BG-11, mostrando que os valores com meio de cultura para a microalga mostram-se praticamente iguais aos obtidos cultivando em meio de cultura comercial.

De acordo com Becker (2007), as proteínas das microalgas são compostas por diferentes aminoácidos e, portanto, a qualidade nutricional de uma proteína é determinada basicamente pelo conteúdo, proporção e disponibilidade de seus aminoácidos, interferindo diretamente em

seu uso como alimento. Além disso, o uso de microalgas na alimentação animal, através de avaliações nutricionais e toxicológicas demonstrou a adequação da biomassa como suplemento alimentar ou substituto por fontes convencionais de proteínas (farelo de soja, farinha de peixe, farelo de arroz, entre outros).

A variação do lipídio em microalgas depende da composição química e dos nutrientes presentes no meio de cultura, variando entre diferentes espécies de microalgas com conteúdo lipídico diferentes para cada concentração de macro e micronutrientes e também, de acordo com o meio de cultura utilizado para o crescimento algal (MAITY et al., 2014). Todo lipídio extraído da biomassa de microalgas é rico em proteínas, açúcar reduzido, carboidratos, pigmentos e, portanto, pode ser usado como um suplemento ou alimento integral para nutrição e na indústria de ração para animais ou na aquicultura para criação de peixes (ANSARI et al., 2015).

A macrófita *L. minor*, demonstrou ser mais eficiente como meio de cultura para *A. gracilis* do que *A. caroliniana*, uma vez que esta última apresenta coloração muito escura e densa, havendo necessidade de maior diluição. Além disso *L. minor* apresentou melhores resultados tanto em crescimento, quanto em quantidade de lipídio e proteína que são macronutrientes essenciais na formulação de dietas para diversos organismos aquáticos. Meios de cultura a base de macrófitas, mostraram resultados satisfatórios para o crescimento da microalga *A. gracilis*, promovendo elevada densidade celular a um baixo custo de produção, evidenciando que estas plantas podem ser uma nova ferramenta para o cultivo em laboratório desta microalga, em função do custo, eficiência de produção e disponibilidade do recurso.

## 5.2- Alimentação do peixe ornamental *Xiphophorus maculatus*

A temperatura durante todo o período experimental (Tabela 5) manteve-se na faixa de 28°C, o pH foi neutro nos tratamentos com microalga (AAC e ALM) e levemente ácido para o tratamento controle. Hoseinifar et al. (2015) trabalhando com alimentação de *Xiphophorus helleri* obtiveram para a temperatura da água, pH e oxigênio dissolvido monitorados diariamente valores de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $7 \pm 0,2$  e  $7,9 \pm 0,1 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente; valores esses semelhantes aos encontrados nesse estudo (Tabela 5).

Os peixes têm a capacidade de regular o seu equilíbrio ácido-base para manter o pH normal dos seus fluidos corporais sob ambiente ácido. Níveis de pH abaixo de 4 constituem condições ácidas letais para peixes ornamentais (IKUTA et al., 1992). O pH da água afeta as funções fisiológicas normais dos organismos aquáticos, incluindo a troca de íons com a água e a respiração (EIFAC, 1969). A gama aceitável de pH para a vida aquática, particularmente o

peixe, depende de vários outros fatores, incluindo a aclimação prévia às condições de cultivo, a temperatura da água, a concentração de oxigênio dissolvido e as concentrações e proporções de vários cátions e ânions (KRATZ et al., 1994).

**Tabela 5-** Variação de qualidade d'água, compostos nitrogenados e fósforo total nos aquários, com dieta controle, *Azolla caroliniana* e *Lemna minor*, para o peixe ornamental *Xiphophorus maculatus*.

| Nutrientes                                | Aquários                   |                            |                           |
|-------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
|                                           | Controle                   | <i>Azolla caroliniana</i>  | <i>Lemna minor</i>        |
| Temperatura (°C)                          | 28 ± 0,7 <sup>a</sup>      | 28 ± 0,7 <sup>a</sup>      | 28 ± 0,8 <sup>a</sup>     |
| pH                                        | 6,71 ± 0,3 <sup>b</sup>    | 7,11 ± 0,3 <sup>a</sup>    | 7,21 ± 0,1 <sup>a</sup>   |
| Condutividade (µS cm <sup>-1</sup> )      | 37 ± 5 <sup>a</sup>        | 38 ± 7 <sup>a</sup>        | 36 ± 1 <sup>a</sup>       |
| Oxigênio dissolvido (mg L <sup>-1</sup> ) | 5,5 ± 0,7 <sup>a</sup>     | 5 ± 1 <sup>a</sup>         | 5 ± 1 <sup>a</sup>        |
| Amônia (mg L <sup>-1</sup> )              | 0,1 ± 0,02 <sup>b</sup>    | 0,1 ± 0,04 <sup>ab</sup>   | 0,1 ± 0,06 <sup>a</sup>   |
| Nitrato (mg L <sup>-1</sup> )             | 1,3 ± 0,2 <sup>a</sup>     | 1,4 ± 0,2 <sup>a</sup>     | 1,4 ± 0,1 <sup>a</sup>    |
| Nitrito (mg L <sup>-1</sup> )             | 0,7 ± 0,6 <sup>a</sup>     | 1,2 ± 0,6 <sup>a</sup>     | 1 ± 0,7 <sup>a</sup>      |
| Fósforo total (mg L <sup>-1</sup> )       | 0,008 ± 0,005 <sup>a</sup> | 0,009 ± 0,003 <sup>a</sup> | 0,01 ± 0,003 <sup>a</sup> |

Valores na mesma linha com diferentes letras diferem significativamente (p < 0,05)

O produto final do metabolismo das proteínas nos peixes é a amônia e resíduos de nitrogênio, portanto, a quantidade de amônia e de ureia excretada têm sido utilizadas como indicadores dos efeitos do metabolismo protéico nos vários fatores ambientais e nutricionais do peixe (PERERA et al., 1995). Engin e Carter (2001) relataram que o excesso de fornecimento diário de proteína à *Anguilla australis* resultou em amônia e ureia significativamente alta. A acumulação de produtos excretores nitrogenados pode causar deterioração da qualidade da água em um sistema de cultura de recirculação e lagoas de peixe (ENGIN & CARTER, 2001).

A quantidade e a qualidade dos resíduos excretados pelos peixes dependem da ingestão, digestão e metabolismo dos compostos dietéticos (BUREAU & HUA, 2010). O excesso de resíduos de alimentação tem uma capacidade muito maior que o material fecal para impactar o meio ambiente, em termos de conteúdo de energia e taxa de degradação. A matéria orgânica das partículas afunda e dispersa, o que resulta em toxicidade e anoxia ambiental (PIEDECAUSA et al., 2012).

Ghiasi e Jasour (2012) trabalhando com *Pterophyllum scalare*, obtiveram 0,3 mg L<sup>-1</sup> de amônia em aquário, alimentando com ração padrão para peixes ornamentais. Neste estudo o valor obtido para amônia (0,1 mg L<sup>-1</sup>), não se enquadra como elevado teor de amônia dissolvida.

A informação disponível para formulação de dietas para diferentes espécies de peixes, está relacionada ao ambiente de produção animal, ao tipo de alimento oferecido, taxa de crescimento, qualidade do alimento e compreensão das interações de nutrientes e composição do alimento (JOBILING, 2016).

Neste estudo, os teores de proteína nos tratamentos utilizados foram acima de 32% peso seco, sendo que os tratamentos contendo *Ankistrodesmus gracilis* crescida em meio de macrófita apresentaram teores acima de 33% peso seco (AAC) e 32% peso seco (ALM). Em relação aos lipídios contidos na ração, foram obtidos teores de 13,3% peso seco (AI), 13,2% peso seco (AAC) e 12,5% peso seco (ALM) (Tabela 2).

Wu et al. (2015) trabalhando com o peixe *Trachinotus ovatus*, formulou uma dieta contendo 91,2% de matéria seca, 48,4% de proteína, 5,7% de lipídio, 11,4% de cinzas e 18100 J g<sup>-1</sup> de energia; sendo pouco diferente da dieta formulada neste estudo (Tabela 2) e essa distinção deve-se aos diferentes requisitos exigidos para cada espécie de peixe. Ahmed et al. (2015) alimentando *Puntius gonionotus* com *Azolla pinnata* e *Lemna minor* obtiveram valores superiores de proteína, lipídio, cinzas, matéria seca e energia bruta para *L. minor*, sendo maiores em *A. pinnata* apenas fibra e umidade. Assim a planta *L. minor* utilizada diretamente como alimento dietético na produção de *P. gonionotus* foi positivamente significativa, tendo melhor efeito como alimento dietético do que *Azolla*.

A quantificação dos requisitos de proteínas para peixes, é de importância significativa para reduzir ou limitar a deterioração da qualidade da água em ambientes controlados, a partir de resíduos relacionados com excesso de proteínas ou teores de amônia, fósforo entre outros, além de interferir no crescimento e ganho de peso do peixe (OISHI et al., 2010).

A alta concentração de lipídios na alimentação de peixes também contribui para a estabilidade dos alimentos na água (CHAIYAPECHARA et al., 2003). No entanto, lipídios excessivos nas dietas podem levar a uma diminuição no consumo alimentar, que reduzirá a ingestão de outros nutrientes. Numerosos estudos evidenciaram a importância interativa dos níveis de proteína e lipídios na dieta em desempenhos de crescimento (MILLER et al., 2005; OZORIO et al., 2006).

A primeira necessidade em relação às necessidades de proteína dos peixes é fornecer o requisito de aminoácidos indispensável do animal e, em segundo lugar, fornecer aminoácidos dispensáveis ou nitrogênio suficiente para permitir sua síntese (RAJ & JESILY, 1996). Os peixes ornamentais crescidos em aquários precisam utilizar a proteína na dieta com a máxima eficiência, já que os produtos de degradação do metabolismo das proteínas (principalmente amônia) poluirão diretamente seu habitat (SALES & JANSSENS, 2003). Embora o peixe use

energia de forma eficiente como fonte de energia, a ingestão dietética excessiva pode restringir o consumo de proteínas e o crescimento subsequente (SALES & JANSSENS, 2003).

O baixo crescimento pode ser explicado por digestão reduzida de proteínas, aminoácidos, lipídios e energia, se não for compensado pelo aumento do consumo de ração que é um fator importante para crescimento, e desempenho em geral do peixe (KROGDAHL et al., 2010).

Os índices biológicos obtidos para o peixe ornamental Platy nesse estudo, mostram que houveram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) e o tratamento ALM foi mais eficiente, para todo o desempenho zootécnico com exceção da taxa de conversão alimentar (Tabela 6). O peso inicial apresentou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos, o que não influenciou os resultados de peso final entre todas as dietas experimentais, sendo que a dieta contendo meio de cultura de *L. minor* associada a microalga obteve o melhor resultado em peso, enquanto *Azolla caroliniana* demonstrou ser melhor que a dieta controle (AI).

**Tabela 6.** Índices biológicos obtidos para juvenis de *Xiphophorus maculatus* alimentados com alimento inerte (controle) e dietas de macrófitas (alimento inerte com dietas de macrófitas *Azolla caroliniana* e *Lemna minor*)

| Desempenho zootécnico                                 | Dietas tratamento          |                             |                           |
|-------------------------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|
|                                                       | Alimento inerte            | Dietas de macrófitas        |                           |
|                                                       | AI                         | AI+AAC*                     | AI+ALM*                   |
| Peso inicial médio (g)                                | 0,30 ± 0,010 <sup>ab</sup> | 0,29 ± 0,004 <sup>b</sup>   | 0,30 ± 0,004 <sup>a</sup> |
| Peso final médio (g)                                  | 0,58 ± 0,05 <sup>c</sup>   | 0,72 ± 0,07 <sup>b</sup>    | 0,88 ± 0,12 <sup>a</sup>  |
| Comprimento inicial (cm)                              | 2,7 ± 0,03 <sup>a</sup>    | 2,7 ± 0,03 <sup>a</sup>     | 2,7 ± 0,04 <sup>a</sup>   |
| Comprimento final (cm)                                | 3 ± 0,14 <sup>c</sup>      | 3,2 ± 0,13 <sup>b</sup>     | 3,5 ± 0,14 <sup>a</sup>   |
| Consumo médio de ração (g/peixe)                      | 1,11 ± 0,1 <sup>c</sup>    | 1,5 ± 0,1 <sup>b</sup>      | 1,95 ± 0,1 <sup>a</sup>   |
| Ganho de peso (g)                                     | 0,28 ± 0,04 <sup>c</sup>   | 0,43 ± 0,07 <sup>b</sup>    | 0,57 ± 0,12 <sup>a</sup>  |
| Conversão alimentar aparente                          | 4,02 ± 0,4 <sup>a</sup>    | 3,52 ± 0,3 <sup>a</sup>     | 3,53 ± 0,8 <sup>a</sup>   |
| Taxa de crescimento específico (% dia <sup>-1</sup> ) | 0,73 ± 0,07 <sup>c</sup>   | 1 ± 0,09 <sup>b</sup>       | 1,17 ± 0,17 <sup>a</sup>  |
| Sobrevivência (%)                                     | 80 ± 4,71 <sup>b</sup>     | 89,33 ± 10,11 <sup>ab</sup> | 92 ± 7,30 <sup>a</sup>    |

\* macrófitas, *Azolla caroliniana* (AAC) e *Lemna minor* (ALM), obtidas localmente.

Os dados representam média ± DP de cinco repetições por tratamentos dietéticos (AI, dieta básica de alimentos inertes (controle), AI + AAC e AI + ALM = dieta basal com macrófita.

Valores na mesma linha com diferentes letras diferem significativamente ( $p < 0,05$ )

Zuanon et al. (2006) trabalhando com o peixe ornamental Acará Bandeira em diferentes níveis de proteína durante 60 dias, obtiveram um consumo alimentar variando de 3,37 g a 3,83 g de ração, valores esses superiores aos obtidos nesse estudo, devido as diferenças de espécies, alimentação e consumo exigido para a espécie estudada.

O ganho em peso do peixe, consumo médio e taxa de crescimento são influenciados diretamente pelo consumo de alimento com boa qualidade nutricional, boa digestibilidade e palatável, quando preenchido esses requisitos, o consumo será maior, aumentando o peso e outros índices influenciados pelo ganho de peso. Em geral, a conversão alimentar melhora a frequência alimentar. O índice de conversão alimentar e o crescimento específico foram altos alimentando duas vezes ao dia. A frequência alimentar utilizada neste estudo foi adequada para as condições deste experimento, sugerindo que tanto o crescimento quanto a alimentação são mais eficientes a essa frequência de alimentação, para o Platy (KASIRI et al., 2011).

Singh e Kumar (2016) trabalhando com *Xiphophorus helleri* obtiveram valores de conversão alimentar variando de 3,19 a 3,50. Os valores de conversão alimentar obtidos nesse estudo para o mesmo gênero de peixe foram superiores em todos os tratamentos, não apresentando diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre eles.

Şahin et al. (2017) trabalhando com crescimento de Platy (*X. maculatus*) com diferentes dietas obtiveram 0,31% de taxa de crescimento específico em dieta tradicional, e 0,68% em dieta contendo minhoca branca (*Enchytraeus* sp.) + dieta tradicional durante 60 dias experimentais. Esses valores foram inferiores aos obtidos em todos os tratamentos desse estudo.

A taxa de crescimento específico determina o crescimento (%) doário do peixe, revelando melhora ou piora com os diferentes tratamentos alimentares. Nesse estudo, a taxa de crescimento específico evidencia aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos tratamentos com *A. gracilis*, o de *L. minor* foi o melhor, seguido de *A. caroliniana* e por último o tratamento controle.

Şahin et al. (2017), obtiveram de 69% a 91% de sobrevivência no experimento. A sobrevivência (%) do Platy neste estudo, apresentou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), sendo maior nos tratamentos com *A. gracilis* e menor no controle, a alga crescida em meio de cultura com *L. minor* foi superior em todos os índices, influenciando a sobrevivência do peixe Platy, uma vez que um bom alimento com alto desempenho, é fundamental para a sobrevivência e crescimento do peixe.

O peixe ornamental *X. maculatus* apresentou melhor desempenho com o tratamento contendo a microalga *A. gracilis* crescida em meio de macrófita *L. minor*, quando crescida no

meio de *A. caroliniana* no entanto esta última apresentou diferença em relação a dieta controle, sendo positiva também.

## 6- CONCLUSÃO

A utilização de macrófitas como potencial meio de cultura para microalga *Ankistrodesmus gracilis* mostrou ser eficiente, uma vez que a microalga apresentou elevada densidade celular e essas plantas podem servir como substitutas para o meio comercial, que é dispendioso em relação ao meio de macrófita. O melhor desempenho de *A. gracilis* foi no meio de cultura com a macrófita *Lemna minor*, com papel fundamental nos níveis macro e micronutrientes, teores de lipídio e proteína.

Para o peixe ornamental *Xiphophorus maculatus*, as dietas contendo microalga desenvolvida em meio de cultura de macrófita, apresentaram melhores resultados do que a quando alimentados apenas com dieta inerte (ração). Em função do melhor crescimento de *A. gracilis* em meio de cultura com *L. minor*, isto refletiu diretamente no melhor desempenho zootécnico do peixe com esta macrófita, mostrando que a microalga *A. gracilis* cultivada em meio de cultura contendo biomassa de *L. minor* foi mais eficiente quando utilizada na alimentação do peixe.

As macrófitas foram substitutas baratas e disponíveis para crescimento de *A. gracilis*, que por sua vez podem ser fontes parciais de lipídios e proteínas, agregando um novo ingrediente com propriedades e sabores diferentes.

## 7- REFERÊNCIAS

- A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 15<sup>TH</sup> ed., Arlington, Virginia. 683p. 1990.
- ABASALI, H.; MOHAMAD, S. Dietary prebiotic immunogen supplementation in reproductive performance of platy (*Xiphophorus maculatus*). **Veterinary Research**. v. 4, n. 3, p. 66- 70, 2011.
- ABOWEI, J. F. N.; EKUBO, A. T. A Review of conventional and unconventional feeds in fish nutrition. **British Journal of Pharmacology and Toxicology**. v. 2, n. 4, p. 179- 191, 2011.
- ADEROLU, A. Z.; SERIKI, B. M.; APATIRA, A. L.; AJAEGBO, C. U. Effects of feeding frequency and economic viability of rearing African catfish (*Clarias gariepinus*) fingerlings and juveniles. **African Journal of Food Science**. v. 4, n. 5, p. 286- 290, 2010.
- AHMED, G. U.; RAHMAN, Md. M.; ALAM, M. N.; SARKER, BAADRUSOHA. Comparative study on growth performance of thai Sharpunti (*Puntius gonionotus*) using two different weeds duck weed (*Lemna minor*) and *Azolla* fern (*Azolla pinnata*). **Research in Agriculture, Livestock and Fisheries**. v. 2, n. 2, p. 369- 374, 2015.
- AKO, H.; TAMARU, C. S. Are feeds for food fish practical for aquarium fish? **International Aquafeeds**. v. 2, p. 30- 36, 1999.
- ALMEIDA, C. C. S. **Avaliação do crescimento, padrões metabólicos e capacidade fotossintética de *Microcystis panniformis* Komárek et al. (Cyanobacteria) e *Ankistrodesmus gracilis* (Reich) Korsikov (Chlorophyta) em fontes de nitrogênio inorgânicas e orgânicas**. Ouro Preto, Brasil, 62 p. (Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos. UFOP), 2007.
- ANDERSEN, R. A. **Algal culturing techniques**. Academic Press, 578 p. 2005.
- ANSARI, F. A.; SHRIWASTAV, A.; GUPTA, S. K.; RAWAT, I.; GULDHE, A.; BUX, F. Lipid extracted algae as a source for protein and reduced sugar: a step closer to the biorefinery. **Bioresource Technology**. v. 179, p. 559- 564, 2015.
- ARTHINGTON, A. H. Diet of *Gambusia affinis holbrooki*, *Xiphophorus helleri*, *X. maculatus* and *Poecilia reticulata* (Pisces: Poeciliidae) in streams of southeastern Queensland, Australia. **Asian Fisheries Science**. v. 2, n. 1, p. 193–212, 1989.
- AXELROD, H. R.; WISCHNATH, L. **Swordtails and platies**. T. H. F. Publications, Inc., Neptune City, N. J., USA, 1991.
- AZIM, M. E.; WAHAB, M. A. Development of a duckweed fed carp polyculture system in Bangladesh. **Aquaculture**. v. 218, p. 425- 435, 2003.

- AZIMIRAD, M.; MESHKINI, S.; AHMADIFARD, N.; HOSEINIFAR, S. H. The effects of feeding with synbiotic (*Pediococcus acidilactici* and fructooligosaccharide) enriched adult *Artemia* on skin mucus immune responses, stress resistance, intestinal microbiota and performance of angelfish (*Pterophyllum scalare*). **Fish & Shellfish Immunology**. v. 54, p. 516-522, 2016.
- BAGRE, P.; PARASHAR, A.; VYAS, V.; BHARGAVA, S.; SAROCH, J. D. Comparative study of diferente percentage of natural carotenoid source *Spirulina platensis* on growth and survival of *Puntius sophore*. **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences**. v. 2, n. 4, p. 2210- 2216, 2012.
- BASOLO, A. L. Female preference for male sword length in the green swordtail, *Xiphophorus helleri* (Pisces: Poeciliidae). **Animal Behaviour**. v. 40, p. 332- 338, 1990.
- BATAGLIA, O. C., FURLANI, A. M. C., TEIXEIRA, J. P. F., FURLANI, P. R., GALLO, J. R. Chemical analysis methods for plants, **Boletim Técnico do Instituto Agrônômico**. v. 78, p. 43, 1983.
- BAUMGARTNER, T. R. S. Cultivo e extração de óleo das microalgas *Scenedesmus sp.* e *Spirulina sp.* para a síntese de ésteres visando à produção de biodiesel. **PEQ/UEM**, 124 p., 2011.
- BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**. v. 25, p. 207-210, 2007.
- BEJARANO, J. R. C. Lenteja de água para el tratamiento de aguas residuárias. Factores que afetam su crecimiento. **Facultad de Ingeniaria. Universidad del Valle**, Cali-Colômbia, 28 p., 1998.
- BEKCAN, S.; ATAR, H. H.; BEYAZ, A. Measurement of the effects of liquid fertilizers at the different levels on duckweed (*Lemna minor* L.) growth using image analysis technique. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**. v. 23, n. 2, 1205– 1209, 2009.
- BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. **Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições**. Rima, 502 p., 2006.
- BOLD, H. C., WYNNE, M. J. **Introduction to the Algae. Structure and Reproduction**. Englewood Cliffs. Prentice-Hall, p.720, 1985.
- BORGES, L.; FARIA, B. M.; ODEBRECHT, C.; ABREU, P. C. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: primeiros passos para o desenvolvimento de um “mecanismo de desenvolvimento limpo”. **Revista Atlântica**. v. 29, p. 35- 46, 2007.

- BOTTREL, H. H.; DUNCAN, A.; GLIWICZ, Z. M.; GRYGIEREK, E.; HERZIG, A.; HILLBRICH-ILKOWSKA, A.; KURASAWA, H.; LARSSON, P.; WEGLENSKA, T. A. Review of problems in zooplankton production studies. **Norwegian Journal of Zoology**. v. 24, n. 1, p.419- 456, 1976.
- BUREAU, D.; HUA, K. Towards effective nutritional management of waste outputs in aquaculture, with particular reference to salmonid aquaculture operations. **Aquaculture Research**. v. 41, p. 777- 792, 2010.
- CARLOS, A.- J. J.; HERNÁN, Z.- V. J.; EDUARDO, C.- T. S.; ALFREDO, V.- A., L.; PABLO, P.- T. P.; ALFREDO, L.- G. O. Efecto biofertilizante de azolla - anabaena en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.). **Journal of the Selva Andina Biosphere**. v. 4, n. 2, p. 109- 105, 2016.
- CHAIYAPECHARA S.; LIU, K. K. M.; BARROWS, F. T.; HARDY, R. W.; DONG, F. M. Proximate composition, lipid oxidation and sensory characteristics of fillets from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fed diets containing 10% to 30% lipid. **Journal of World Aquaculture Society**. v. 34, p. 266- 277, 2003.
- CHATTERJEE, A.; SHARMA, P.; GHOSH, M. K.; MANDAL, M.; ROY, P. K. Utilization of *Azolla Microphylla* as Feed Supplement for Crossbred Cattle. **International Journal Of Agriculture And Food Science Technology**. v. 4, n. 3, p. 207- 214, 2013.
- CHEN, J.; WANG, Y.; BENEMANN, J. R.; ZHANG, X.; HU, H.; QIN, S. Microalgal industry in China: challenges and prospects, **Journal of Applied Phycology**. v. 28, p. 715- 725, 2016.
- CHEN, W.; ZHANG, C.; SONG, L.; SOMMEFELD, M.; HU, Q. A high throughput Nile red method for quantitative measurement of neutral lipids in microalgae. **Journal of Microbiology Methods**. v. 77, n. 1, p. 41- 47, 2009.
- CHO, S. H.; LEE, S. M.; LEE, J. H. Effect of dietary protein and lipid levels on growth and body composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) reared under optimum salinity and temperature conditions. **Aquaculture Nutrition**. v. 11, n. 4, p. 235- 240, 2005.
- CHU, W. L.; PHANG, S. M.; GOH, S. H.; Influence of carbon source on growth, biochemical composition and pigmentation of *Ankistrodesmus convolutes*. **Journal of Applied Phycology**. v. 7, n. 1, p. 59- 64, 1995.
- CORREDOR, V. M. R.; GIRALDO, G. A. M. Parámetros zootécnicos de juveniles de escalara (*Pterophyllum scalare*) suplementados con diferentes niveles de *Chlorella pyrenoidosa*. Pereira. (Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Ciencias de la Salud- Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia), 2017.

- DALAY, M. C.; IMAMOGLU, E.; DEMIREL, Z. Agricultural Fertilizers as Economical Alternative for Cultivation of *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 17, n. 3, p. 393–397, 2007.
- DALRYMPLE, O. K.; HALFHIDE, T.; UDOM, I.; GILLES, B.; WOLAN, J.; ZHANG, Q.; ERGAS, S. Wastewater use in algae production for generation of renewable resources: a review and preliminar results. **Aquatic Biosystems**. v. 9, n. 2, p. 1- 11, 2013.
- DAWES, J. **Livebearing Fishes**. A Guide to Their Aquarium Care, Biology and Classification. Blandford, London, England. 240 p., 1991.
- DHARGALKAR V. K.; VERLECAR X. N.; Southern Ocean seaweeds: a resource for exploration in food and drugs. **Aquaculture**. v. 287, p. 229- 242, 2009.
- DO NASCIMENTO, M.; DUBLAN, MDL. A.; ORTIZ- MARQUEZ, J. C. F.; CURATTI, L. High lipid productivity of an *Ankistrodesmus* Rhizobium artificial consortium. **Bioresource Technology**. v. 146, p. 400- 407, 2013.
- DORTCH, Q. The interaction between ammonium and nitrate uptake in phytoplankton. **Marine Ecology Progress Series**. v. 61, p. 183- 201, 1990.
- EIFAC (European Inland Fisheries Advisory Commission). Water quality criteria for European freshwater fish: Report on extreme pH values and inland fisheries. Prepared by EIFAC Working Party on Water Quality Criteria for European Freshwater Fish. **Water Research**. v. 3, n. 8, p. 593- 611, 1969.
- ENGIN, K.; CARTER, C. G. Ammonia and urea excretion rates of juvenile Australian short-finned eel (*Anguilla australis*) as influenced by dietary protein level. **Aquaculture**. v. 194, p. 123- 136, 2001.
- FERDOUSHI, Z.; HAQUE, F.; KHAN, S.; HAQUE, M. The effects of two aquatic floating macrophytes (*Lemna* and *Azolla*) as biofilters of nitrogen and phosphate in fish ponds. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. v. 8, p. 253- 258, 2008.
- FERRELL, J.; SARISKY- REED, V. **National algal biofuels technology roadmap**. A technology roadmap resulting from the national algal biofuels workshop Washington U.S. Department of Energy, Office of Energy Efficiency and Renewable Energy, Biomass Program, 2010.
- FIORESI, T. B.; SIPAÚBA-TAVARES, L. H. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (Chlorophyta) em laboratório à base de esterco suíno. **Biotemas**. v. 21, n. 1, p. 7- 16, 2008.
- FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. **Aquaculture**. v. 199, n. 3- 4, p. 197- 227, 2001.

- GEORGE, B.; PANCH, I.; DESAI, C.; CHOKSHI, K.; PALIWAL, C.; GHOSH, T.; MISHRA, S. Effects of different media composition, light intensity and photoperiod on morphology and physiology of freshwater microalgae *Ankistrodesmus falcatus* – A potential strain for bio-fuel production. **Bioresource Technology**. v. 171, p. 367- 374, 2014.
- GHIASI, F.; JASOUR, M. S. The Effects of Natural Zeolite (*Clinoptilolite*) on Water Quality, Growth Performance and Nutritional Parameters of fresh water aquarium fish, Angel (*Pterophyllum scalare*). **International Journal of Research in Fisheries and Aquaculture**. v. 2, n. 3, p. 22- 25, 2012.
- GOLTERMAN, H. L.; CLYMO, R. S.; OHNSTAD, M. A. **Methods for physical and chemical analysis of freshwater**. London: Blackwell Scientific Publications, p. 213, 1978. (IBP Handbbook, 8).
- GONZÁLEZ, M. A.; CIFUENTES, A. S.; GÓMEZ, P. I. Growth and total carotenoid content in four chilean strains of *Haematococcus pluvialis* Flotow, under laboratory conditions. **Gayana Botánica**. v. 66, n. 1, p. 58-70, 2009.
- GOURI, M. D.; JAGADEESH, S.; GOPINATH, C. R.; KALIBAVI, C. M. Importance of *Azolla* as a sustainable feed for livestock and poultry. **Agricultural Reviews**. v. 33, n. 2, p. 93-103, 2012.
- GRABSKI, K.; TUKAJ, Z. Autoinduction activity of a conditioned medium obtained from high density cultures of the green alga *Scenedesmus subspicatus*. **Journal of Applied Phycology**. v. 20, n. 3, p. 323– 330, 2008.
- GRAHAM, L. E.; WILCOX, L. W. **Algae**. Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey, USA, 640 p., 2000.
- GROBBELAAR, J. U. In: Richmond, A. (Ed.), Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. **Blackwell Publishing Ltd**. Oxford, pp. 97- 115, 2004.
- GUILLARD, R. R. L. Division rates. In: STEIN, J. R. (Ed.). **Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements**, London: Cambridge University Press. p. 289-311, 1973.
- HARDY, E. R.; CASTRO, J. G. D. Qualidade nutricional de três espécies de clorofíceas cultivadas em laboratório. **Acta Amazonica**. v. 30, n. 1, p. 39- 47, 2000.
- HATTAB, M.; GHALY, A. Effects of Light Exposure and Nitrogen Source on the Production of Oil from Freshwater and Marine Water Microalgae. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**. v. 10, n. 4, p. 208- 230, 2014.

- HEMAISWARYA, S.; RAJA, R.; KUMAR, R. R.; GANESAN, V.; ANBAZHAGAN, C. Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 27, n. 8, p. 1737- 1746, 2011.
- HOSEINIFAR, S. H.; ROOSTA, Z.; HAJIMORADLOO, A.; VAKILI, F. The effects of *Lactobacillus acidophilus* as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail (*Xiphophorus helleri*). **Fish & Shellfish Immunology**. v. 42, p. 532- 538, 2015.
- IKUTA, K.; SHIKAMA, T.; ODA, S.; OKUMOTO, N. Acid tolerance of eyed embryos and larvae in salmonid fishes. **National Research Institute of Aquaculture**. v. 21, p. 39- 45, 1992.
- JOBLING, M. Fish nutrition research: past, present and future. **Aquaculture International**. v. 24, p. 767- 786, 2016.
- JONES, J. C.; FRUCIANO, C.; KELLER, A., SCHARTL, M.; MEYER, A. Evolution of the elaborate male intromittent organ of *Xiphophorus* fishes. **Ecology and Evolution**. v. 6, n. 20, p. 7207- 7220, 2016.
- JORDAN D. S., The genera of fishes and a classification of fishes. **Stanford University Press**, Stanford, 816 p., 1963.
- JU, Z. Y.; DENG, D. F.; DOMINY, W. A defatted microalgae (*Haematococcus pluvialis*) meal as a protein ingredient to partially replace fishmeal in diets of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*, Boone, 1931). **Aquaculture**. v. 354- 355, p. 50- 55, 2012.
- KALITA, N.; BARUAH, G.; GOSWAMI, R. C. D.; TALUKDAR, J.; KALITA, M. C. *Ankistrodesmus falcatus*: A promising candidate for lipid production, its biochemical analysis and strategies to enhance lipid productivity. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**. v. 1, n. 4, p. 148- 157, 2011.
- KANG, J. H.; SCHARTL, M.; WALTER, R. B.; MEYER, A. Comprehensive phylogenetic analysis of all species of swordtails and platies (Pisces: genus *Xiphophorus*) uncovers a hybrid origin of a swordtail fish, *Xiphophorus monticolus*, and demonstrates that the sexually selected sword originated in the ancestral lineage of the genus, but was lost again secondarily. **BMC Evolutionary Biology**. v. 13, n. 25, p. 1- 19, 2013.
- KASIRI, M.; FARAHI, A.; SUDAGAR, M. Effects of Feeding Frequency on Growth Performance and Survival Rate of Angel Fish, *Pterophyllum scalare* (Perciformes: Cichlidae). **Veterinary Research Forum**. v. 2, n. 2, p. 97- 102, 2011.
- KESTMONTS, P.; STALMANS, J. M. Initial feeding of European minnow larvae *Phoxinus phoxinus* L. 1. Influence of diet and feeding level. **Aquaculture**. v. 104, p. 327- 340, 1992.

- KHATOON, N.; SENGUPTA, P.; HOMECHAUDHURI, S.; PAL, R., Evaluation of algae based feed in goldfish (*Carassius auratus*) nutrition. **Proceedings of the Zoological Society**. v. 63, n. 2, p 109- 114, 2010.
- KILHAM, S. S.; KREEGER, D. A.; GOULDEN, C. E.; LYNN, S. G. Effects of nutriente limitation on biochemical constituents on *Ankistrodesmus falcatus*. **Freshwater Biology**. v. 38, n. 3, 591- 596, 1997.
- KINGSTON, J. J.; ROSENTHAL, G. G.; RYAN, M. J. The role of sexual selection in maintaining a colour polymorphism in the pygmy swordtail, *Xiphophorus pygmaeus*. **Animal Behaviour**. v. 65, p. 735- 743, 2003.
- KOBAYASHI, M.; ITO, M. Studies on the control of cell division in a green alga *Ankistrodesmus gracilis* (chlorococcales) II. Control by nitrogen compounds. **The botanical magazine**. v. 90, n. 3, p. 211- 217, 1977.
- KONG, Q.-X.; LI, L.; MARTINEZ, B.; CHEN, P.; RUAN, R. Culture of Microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in Wastewater for Biomass Feedstock Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 160, p. 9- 18, 2010.
- KOROLEFF, F. Determination of ammonia. In: GRASSHOFF, K. (Ed.). **Methods of seawater analysis**. Berlin: Verlag Chemie Weinheinn, p. 126- 133, 1976.
- KRATZ, M.; COOPER, S. D.; MELACK, J. M. Effects of single and repeated experimental acid pulses on invertebrates in a high altitude Sierra Nevada stream. **Freshwater Biology**. v. 32, p. 161- 183, 1994.
- KROGDAHL, A.; PENN, M.; THORSEN, J.; REFSTIE, S.; BAKKE, A. Important antinutrients in plant feedstuffs for aquaculture: an update on recent findings regarding responses in salmonids. **Aquaculture Research**. v. 41, p. 333- 344, 2010.
- KRUSE, O.; HANKAMER, B. Microalgal hydrogen production. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 21, n. 3, p. 238- 243, 2010.
- KUBTIZA, F. **Qualidade da Água na Produção de Peixes**, 3ª ed., p. 10, 1999.
- LANGER, S.; BAKHTIYAR, Y.; LAKHNOTRA, R. Replacement of fishmeal with locally available ingredients in diet composition of *Macrobrachium dayanum*. **African Journal of Agricultural Research**. v. 6, n. 5, p. 1080- 1084, 2011.
- LENG, R. A.; STAMBOLIE, J. H.; BELL, R. Duckweed – A potential high-protein feed resource for domestic animals and fish. **Livestock Research for Rural Development**. v. 7, n.1, 1995.
- LETERME, P.; LONDONO, A. M.; MUNOZ, J. E.; SUAREZ, J.; BEDOYA, C. A.; SOUFFRANT, W.B.; BULDGEN, A. Nutritional value of aquatic ferns (*Azolla filiculoides*

- Lam. and *Salvinia molesta* Mitchell) in pigs. **Animal Feed Science and Technology**. v. 149, p. 135–148, 2009.
- LIMA, A. O. **Peixes Ornamentais, potencial de mercado para algumas espécies de peixes ornamentais**. Panorama da Aquicultura. n. 78, 2003.
- LIMA, A. O. **Peixes Ornamentais, Aquicultura Ornamental**. Panorama da Aquicultura. n. 83, 2004.
- LIU, X.; MIN, C.; XIA-SHI, L.; CHUNGCHU, LIU. Research on some functions of *Azolla* in CELSS system. **Acta Astronautica**. v. 63, p. 1061-1066, 2008.
- LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas – Princípios e Aplicações**. São Carlos: Editora RiMa, 606 p. 2006.
- MAITY, J. P.; BUNDSCHUH, J.; CHEN, C.-Y.; BHATTACHARYA, P. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: present and future perspectives – a mini review. **Energy**. v. 78, p. 104- 113, 2014.
- MALHOTRA, B.; GLASS, A. D. Potassium fluxes in *Chlamydomonas reinhardtii* (I. Kinetics and electrical potentials). **Plant Physiology**. v. 108, n. 4, p. 1527- 1536, 1995.
- MANDALAM, R. K.; PALSSON, B. Elemental balancing of biomass and médium composition enhances growth capacity in highdensity *Chlorella vulgaris* cultures. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 59, p. 605- 611, 1998.
- MARCUS, J. M.; MCCUNE, A. R. Ontogeny and phylogeny in the northern swordtail clade of *Xiphophorus*. **Systematic Biology**. v. 48, p. 491- 522, 1999.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**. v. 14, p. 217- 232, 2010.
- MILLER, C. L.; DAVIS, D. A.; PHELPS, R. P. The effects of dietary protein and lipis on growth and bodycomposition of juvenile and sub-adult red snapper, *Lutjanus campechanus* (Poey, 1860). **Aquaculture Research**. v. 36, p. 52- 60, 2005.
- MKANDAWIRE, M.; DUDEL, E. G. Are *Lemna* spp. effective phytoremediation agents. **Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability**. v. 1, p. 56- 71, 2007.
- MORRIS, M.; CASEY, K. Female swordtail fish prefer symmetrical sexual signal. **Animal Behaviour**. v. 55, p. 33- 39, 1998.
- MOVAFEGHI, A.; KHATAEE, A.; TORBATI, S.; ZAREI, M.; LISAR, S. Bioremoval of c. i. basic red 46 as an azo dye from contaminated eater by *Lemna minor* L.: modeling of key factor by neural network. **Environmental Progress & Sustainable Energy**. v. 32, n. 4, p. 1082– 1089, 2013.

- MUKHERJEE, P.; NANDI, C.; KHATOON, N.; PAL, R. Mixed algal diet for skin colour enhancement of ornamental fishes. **Journal of Algal Biomass Utilization**. v. 6, n. 4, p. 35- 46, 2015.
- NEKOUBIN, H.; SUDAGAR, M. Effects of feeding frequency on growth performance and survival rate of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). **World Applied Sciences Journal**. v. 17, n. 8, p. 1- 4, 2012.
- NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4th edition, John Wiley and Sons, Inc., New Jersey, USA, 624 p. 2006.
- NOOR, J.; HOSSAIN, M. A.; BARI, M. M.; AZIMUDDIN, K. M. Effect of duckweed (*Lemna minor*) as dietary fish meal substitute for silver barb (*Barbodes gonionotus* Bleeker). **Bangladesh Journal of Fisheries Research**. v. 4, p. 35- 42, 2000.
- NOVARA, L. J. Lemnaceae. **Aportes Botanicos de Salta - Serie Flora**. v. 11, n. 19, p. 1- 16, 2014.
- NUSH, E. A. Comparison of diferente methods for chlorophyll and phaeopigments determination. **Archiv für Hydrobiologie**. v. 14, n. 1, p. 14- 36, 1980.
- OISHI, C. A.; NWANNA, L. C.; FILHO, M. P. Optimum dietary protein requirement for Amazonian Tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818, fed fish meal free diets. **Acta amazonica**. v. 40, n. 4, p. 757- 762, 2010.
- OZORIO, R. O. A.; VALANTE, L. M. P.; POUSAO-FERREIRA, P.; OLIVA-TELES, A. Growth performance and body composition of white seabream (*Diplodus sargus*) juveniles fed diets with diferente protein and lipid levels. **Aquaculture Research**. v. 37, p. 255- 263, 2006.
- PABBY, A.; PRASANNA, R.; SINGH, P. K. Biological significance of *Azolla* and its utilization in agriculture. **Proceedings of the Indian National Science Academy**. v. 3, p. 299- 333, 2004.
- PAGNANELLI, F.; ALTIMARI, P.; TRABUCCO, F.; TORO, L. Mixotrophic growth of *Chlorella vulgaris* and *Nannochloropsis oculata*: interaction between glucose and nitrate. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. v. 89, n. 652- 661, 2014.
- PANIGRAHI, S.; CHOUDHURY, D.; SAHOO, J. K.; DAS, S. S.; RATH, R. K. Effect of dietary supplementation of *Azolla* on growth and survivility of *Labeo rohita* fingerlings. **The Asian Journal of Animal Science**. v. 9, n. 1, p. 33- 37, 2014.
- PARASHURAMULU, S.; SWAIN, P. S.; NAGALAKSHMI, D. Protein fractionation and *in vitro* digestibility of *Azolla* in ruminants. **Journal Animal Feed Research**. v. 3, n. 3, p. 129- 132, 2013.

- PEREIRA, A. L.; VASCONCELOS, V. Classification and phylogeny of the cyanobiont *Anabaena azollae* Strasburger: an answered question?. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 64, n. 6, p. 1830- 1840, 2014.
- PERERA, W. M. K.; CARTER, C. G.; HOULIHAN, D. F. Feed consumption, growth and growth efficiency of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) fed diets containing bacterial single cell protein. **British Journal of Nutrition**. v. 73, p. 591- 603, 1995.
- PEREZ-GARCIA, O.; ESCALANTE, F. M. E.; DE-BASHAN, L. E.; BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**. v. 45, n. 1, p. 11- 36, 2011.
- PIEDECAUSA, M.; AGUADO-GIMENEZ, F.; VALVERDE, J.; LLORENTE, M.; GARCIA-GARCIA, B. Influence of fish food and faecal pellets on short-term oxygen uptake, ammonium flux and acid volatile sulphide accumulation in sediments impacted by fish farming and non-impacted sediments. **Aquaculture Research**. v. 43, p. 66- 74, 2012.
- PIÑA, P.; MEDINA, M. A.; NIEVES, M.; LEAL, S.; LÓPEZ- ELIAS, J. A.; GUERRERO, M. A.; Cultivo de cuatro especies de microalgas com diferentes fertilizantes utilizados em acuicultura. **Revista de Investigaciones Marinas**. v. 28, n. 3, p. 225- 236, 2007.
- POTT, V. J.; POTT, A. **Plantas aquáticas do Pantanal**. Brasília: Embrapa, 404 p., 2000.
- PRIYADARSHANI, I.; SAHU, D.; RATH, B. Algae in Aquaculture. **International Journal of Health Sciences and Research**. v. 2, n. 1, p. 108- 114, 2012.
- PROVASOLI, L.; CARLUCCI, A. F. Vitamins and growth regulators. In: STEWART, W. D. P., ed. **Algal Physiology and Biochemistry**. Blackwell Scientific. p. 741– 787, 1974.
- RAI, P. K. Wastewater management through biomass of *Azolla pinnata*: an eco-sustainable approach. **Ambio**. v. 36, n. 5, p. 426- 428, 2007.
- RAI, R. B.; DHAMA, K.; DAMODARAN, T.; HAMID, A.; RAI, S.; SINGH, B.; BHATT, P. Evaluation of *Azolla* (*Azolla pinnata*) as a poultry feed and its role in poverty alleviation among landless people in northern plains of India. **Veterinary practitioner**. v. 13, n. 2, p. 250-254, 2012.
- RAJ, V. S. D.; JESILY, S. The interrelationship of NH<sub>3</sub>-N excretion with changing pH, selected metallic ions and food in *Puntius tetrazona*. **Journal of Ecobiology**. v. 8, p. 9- 15, 1996.
- RAVEN, P. H. **Biologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 221 p., 2001.
- REYNOLDS, C. S. **The ecology of freshwater phytoplankton**. Cambridge: University Press, p.384, 1984.

- RIBEIRO, F. A. S.; RODRIGUES, L. A.; FERNANDES, J. B. K. Desempenho de juvenis de Acará-Bandeira (*Pterophylum scalare*) com diferentes níveis de proteína na dieta. **Boletim Instituto de Pesca**. v. 33, n. 2, p. 195- 203, 2007.
- ROCHA, O.; DUNCAN, A. The relationship between cell carbon and cell volume in freshwater algal species used in zooplanktonic studies. **Journal of Plankton Research**. Oxford, v. 7, n. 2, p. 279- 294, 1985.
- ROFIDI, I. M. **Commercial fertilizer as cheaper alternative culture medium for microalgal growth (*Chlorella* sp.)**. Dissertação de Bacharelado em Biologia Marinha, 2017.
- ŞAHİN, D.; ÖZ, M.; KARSLI, Z.; ARAL, O.; BAHTİYAR, M. Effect of frozen white worm (*Enchytraeus* sp.) on growth of Platy (*Xiphophorus maculatus* Günther, 1866). **Turkish Journal of Aquatic Sciences**. v. 32, n. 2, p. 71- 75, 2017.
- SALES, J.; JANSSENS, G. P. J. Nutrient requirements of ornamental fish. **Aquatic Living Resources**. v. 16, p. 533- 540, 2003.
- SAMPAIO, E. V. S. B.; OLIVEIRA, N. M. B. Aproveitamento da macrófita aquática *Egeria densa* como adubo orgânico. **Planta Daninha**. v. 23, n. 2, p. 169- 174, 2005.
- SCHARTL, M.; WALTER, R. B.; SHEN, Y.; GARCIA, T.; CATCHEN, J.; AMORES, A.; BRAASCH, I.; CHALOPIN, D.; VOLFF, J.-N.; LESCH, K.-P.; BISAZZA, A.; MINX, P.; HILLIER, L.; WILSON, R. K.; FUERSTENBERG, S.; BOORE, J.; SEARLE, S.; POSTLETHWAIT, J. H.; WARREN, W. C. The genome of the platyfish, *Xiphophorus maculatus*, provides insights into evolutionary adaptation and several complex traits. **Nature Genetics**. v. 45, p. 567- 572, 2013.
- SHIELDS, R. J.; LUPATSCH, I. Algae for aquaculture and animal feeds. **Technikfolgenabschätzung – Theorie und Praxis**. v. 21, p. 23- 37, 2012.
- SHIOMI, N.; KITO, S. Culture of *Azolla* in a pond, nutrient composition, and use as fish feed. **Soil Science and Plant Nutrition**. v. 47, p. 27- 34, 2001.
- SHIREMAN, J. V.; COLLE, D. E.; ROTTMANN, R. W. Intensive culture of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*, in circular tanks. **Journal of Fish Biology**. v. 11, p. 457- 463, 1977.
- SHUBERT, L. E. **Nonmotile coccoid and colonial green algae**. In: WEHR, J. D.; SHEATH, R.G. (eds.). *Freshwater algae of North America: ecology and classification*. Academic Press., 2003.
- SICURO, B. Nutrition in ornamental aquaculture: the raise of anthropocentrism in aquaculture? **Reviews in Aquaculture**. v. 0, p. 1- 9, 2017.

SINGH, R. N.; KUMAR, A. Beetroot As A Carotenoid Source On Growth And Color Development In Red Swordtail (*Xiphophorus helleri*) Fish. **Imperial Journal of Interdisciplinary Research**. v. 2, n. 10, p.637- 642, 2016.

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**. v. 6, n. 1, p. 93-106, 1993.

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

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

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

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

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

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; DIAS, S. G.; TRAVAINI-LIMA, F.; SCARDOELI-TRUZZI, B.; BOARETO, C. A. **Macrophytes in Neotropical Aquaculture Farms: Positive and Negative Effects. Macrophytes: Biodiversity, Role in Aquatic Ecosystems and Management Strategies**. 1ed.: Nova Science Publishers. v. 1 p. 59- 84, 2014.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H., SEGALLI A. M. D. L., SCARDOELLI-TRUZZI B. Aquatic Plants: Alternative médium for microalgae growth. **Animals of Aquaculture Research**. v. 2, p. 1009, 2015a.

SIPAÚBA-TAVARES L. H., BERCHIELLI – MORAIS F. A., SCARDOELLI-TRUZZI B., Growth of *Haematococcus pluvialis* flotow in alternative media. **Brazilian Journal of Biology**. v.75, n. 4, 2015b.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H; SEGALI, A. M. D. L.; BERCHIELLI-MORAIS, F. A.; SCARDOELI-TRUZZI, B. Development of low- cost culture media for *Ankistrodesmus*

- gracilis* based on inorganic fertilizer and macrophyte. **Acta Limnologica Brasiliensia**. v. 29, e. 5, 2017.
- SIRAKOV, I.; VELICHKOVA, K.; STOYANOVA, S.; STAYKOV, Y. The importance of microalgae for aquaculture industry. Review. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**. v. 2, n. 4, p. 81- 84, 2015.
- SOARES, E. C. Cultivo intensivo de espécies carnívoras. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**. v. 3, n. 2, p.100- 105, 2008.
- STATSOFT, INC. Statistica (data analysis software system), version 8.0, 2007. **www.statsoft.com**.
- SUKKROM, K.; BUNNAG, B.; PAVASANT, P. **Lipid and Biomass Productivity for Outdoor Culture of Microalga *Ankistrodesmus* sp. in Flat Panel Airlift Photobioreactor**. International Conference on Chemical, Environment & Biological Sciences (CEBS-2014), Kuala Lumpur (Malaysia), 2014.
- TAMARU, C. S., AKO, H. Using comercial feeds for the culture of freshwater ornamental fishes in Hawaii. **Ujnr Technical Report**. v. 28, p. 109- 119, 1999.
- TAMARU, C. S.; COLE, B.; BAILEY, R.; BROWN, C.; AKO, H. **A Manual for Commercial Production of the Swordtail, *Xiphophorus helleri***. Honolulu: University Of Hawaii Sea Grant Extension Service, 2001.
- TEW, K.S.; CONWY, J. D.; CULVER, D. A. Effects of lowered inorganic phosphorus fertilization rates on pond production of percid fingerling. **Aquaculture**. v. 255, p. 436-446, 2006.
- TUCKETT, Q. M.; RITCH, J. L.; LAWSON, K. M.; LAWSON- JR, L. L.; HILL, J. E. Variation in cold tolerance in escaped and farmed nonnative green swordtails (*Xiphophorus hellerii*) revealed by laboratory trials and field introductions. **Biological Invasions**. v. 18, p. 45- 56, 2016.
- VAIDEHI, J. Effect of Enriched conventional and amino acid supplemented feed on length weight relationship of freshwater fish *Oreochromis mossambicus* (Peters). **Journal of Experimental Sciences**, v.2, n.10. p. 79- 80, 2011.
- VAN HOVE, C.; LOPEZ, Y. Fisiologia de *Azolla*. In: **Boletín técnico, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias**. v. 1, n. 1, p. 43-58, 1983.
- VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos a biorremediação e à química analítica. **Química Nova**. v. 27, n. 1, p. 139- 145, 2004.
- VOLLENWEIDER, R. A. A manual on the methods for measuring primary production in aquatic environments. **Oxford: Blackwell Scientific Publ.** p. 255, 1974.

- WANG, W.; WU, Y.; YAN, Y.; ERMAKOVA, M.; KERSTETTER, R.; MESSING, J. DNA barcoding of the Lemnaceae, a family of aquatic monocots. **Plant Biology**. v. 10, n. 205, p. 3823- 3828, 2010.
- WU, Y.; HAN, H.; QIN, J.; WANG, Y. Effect of feeding frequency on growth, feed utilization, body composition and waste output of juvenile golden pompano (*Trachinotus ovatus*) reared in net pens. **Aquaculture Research**. v. 46, p. 1436- 1443, 2015.
- YADAV, R. K.; ABRAHAM, G.; SINGH, Y. V.; SINGH, P. K. Advancements in the Utilization of *Azolla- anabaena* System in Relation to Sustainable Agricultural Practices. **Proceedings of the Indian National Science Academy**. v. 80, n. 2, p. 301- 316, 2014.
- YI-FANG, C.; WANG, Y.; WEI-HUA, W. Membrane transporters for nitrogen, phosphate and potassium uptake in plants. **Journal of Integrative Plant Biology**. v. 50, n. 7, p. 835- 848, 2008.
- ZAHER, M.; BEGUM, N. N.; HOQ, M. E.; BEGUM, M.; BHUIYAN, A. K. M. A. Suitability of duckweed, *Lemna minor* as an ingredient in the feed of tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Bangladesh Journal of Zoology**. v. 23, p. 7– 12, 1995.
- ZATKOVA, M.; SERGEJEVOVA, J.; URBAN, R.; VACHTA, D.; STYS MASOJÍDEK, J. Carotenoid-enriched microalgal biomass as feed supplement for freshwater ornamentals: albinic form of wels catfish (*Silurus glanis*). **Aquaculture Nutrition**. v. 17, n. 3, p. 278- 286, 2011.
- ZHAO, X.; MOATES, G. K.; WELLNER, N.; COLLINS, S. R. A.; COLEMAN, M. J.; WALDRON, K.W. Chemical characterisation and analysis of the cell wall polysaccharides of duckweed (*Lemna minor*). **Carbohydrate Polymers**. v. 111, p. 410- 418, 2014.
- ZUANON, J. A. S.; SALARO, A. L.; BALBINO, E. M.; SARAIVA, A.; QUADROS, M.; FONTANARI, R. L. Níveis de proteína bruta em dietas para alevinos de acará-bandeira. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 35, n. 5, p. 1893- 1896, 2006.
- ZUANON, J. A. S.; SALARO, A. L.; FURUYA, W. M. Produção e nutrição de peixes ornamentais. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 40, p. 165-174, 2011.