

**CRESCIMENTO POPULACIONAL, QUALIDADE NUTRICIONAL E  
EFICIÊNCIA FOTOQUÍMICA DE MICROALGAS CONTINENTAIS  
CULTIVADAS EM DIFERENTES ESPECTROS DE LUZ E  
DISPONIBILIDADES DE N-P-K**

**LUCIANA ALMADA THOMAZ GORINI**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE  
DARCY RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
OUTUBRO – 2014**

CRESCIMENTO POPULACIONAL, QUALIDADE NUTRICIONAL E  
EFICIÊNCIA FOTOQUÍMICA DE MICROALGAS CONTINENTAIS  
CULTIVADAS EM DIFERENTES ESPECTROS DE LUZ E  
DISPONIBILIDADES DE N-P-K

**LUCIANA ALMADA THOMAZ GORINI**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual  
do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das  
exigências para obtenção do título de Doutor em  
Produção Vegetal”.

**ORIENTADOR:** Prof. Eliemar Campostrini

**COORIENTADOR:** Prof. Atanásio Alves do Amaral

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
OUTUBRO – 2014

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 108/2014

Gorini, Luciana Almada Thomaz

Crescimento populacional qualidade nutricional e eficiência fotoquímica de microalgas continentais cultivadas em diferentes espectros de luz e disponibilidades de N-P-K / Luciana Almada Thomaz Gorini. – 2014.  
123 f. : il.

Orientador: Eliemar Campostrini.

Tese (Doutorado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2014.

Bibliografia: f. 93 – 107.

1. *Ankistrodesmus* sp .2. *Scenedesmus* sp. 3. Fertilização mineral  
4. *Volvox* sp. 5. Capacidade fotossintética I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD- 631

CRESCIMENTO POPULACIONAL, QUALIDADE NUTRICIONAL E  
EFICIÊNCIA FOTOQUÍMICA DE MICROALGAS CONTINENTAIS  
CULTIVADAS EM DIFERENTES ESPECTROS DE LUZ E  
DISPONIBILIDADES DE N-P-K

**LUCIANA ALMADA THOMAZ GORINI**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual  
do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das  
exigências para obtenção do título de Doutor em  
Produção Vegetal”.

Aprovada em 16 de outubro de 2014

Comissão Examinadora:

---

Prof. Wallace Luís de Lima (D. Sc., Ciência do Solo) - Ifes-*Campus de Alegre*

---

Prof<sup>a</sup>. Daniela Barros de Oliveira (D. Sc., Química de Produtos Naturais) - UENF

---

Prof. Atanásio Alves do Amaral (D.Sc., Aqüicultura/Limnologia) - Ifes-*Campus de Alegre* (Coorientador)

---

Prof. Eliemar Campostrini (D. Sc., Produção Vegetal) - UENF  
(Orientador)

Dedico este trabalho a minha querida tia **Lucimar Thomaz Teixeira** e a minha vó **Luzia da Silva Thomaz** pelo carinho, pelo amor, pela compreensão e pelo apoio nesta jornada, aos meus amados filhos **Thiago e Arthur** e ao meu esposo **Sandro Araújo Gorini**.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por minha vida! Pela realização deste trabalho, força nos momentos mais difíceis, paz, humildade, saúde e ajuda diante dos problemas impossíveis à natureza humana solucionar;

A Universidade estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (Ifes - *Campus de Alegre*) pela oportunidade e realização do curso de doutorado;

À direção do Ifes - *Campus de Alegre-ES*, pela disponibilização de equipamentos e tudo o que foi necessário para o desenvolvimento desta pesquisa;

A meus pais Rubmar Thomaz e Nélia Lúcia Almada e meu irmão, Rodrigo pelo amor, pelo carinho e pelos ensinamentos desta vida;

Ao querido esposo Sandro pelo amor, pelas cobranças e pelo apoio, sem o qual não teria forças para concluir este trabalho;

A Terezinha Menezes de Araújo pelo apoio, pelo carinho, pela paciência e pela dedicação nas tarefas familiares, sem a qual não teria forças para concluir este trabalho;

Ao prof. Dr. Eliemar Campostrini pelo apoio, pelos ensinamentos, pela paciência e

pela confiança nos momentos mais difíceis na realização deste trabalho;

Ao prof. Dr. Wallace Luís de Lima pelas orientações, pelos ensinamentos e pela amizade no decorrer deste trabalho;

Ao prof. Dr. Atanásio Alves do Amaral pelas orientações e pela amizade no decorrer deste trabalho;

Ao prof. Dr. Elias Fernandes de Sousa pela confiança nos momentos mais difíceis na realização deste trabalho;

À minha grande amiga Andrea Bambozzi Fernandes, que mesmo de longe sempre está ao meu lado, a distância jamais nos separou mesmo por telefone e pensamento estamos sempre juntas;

Aos meus amigos, pela amizade, pela lealdade e pelo carinho, neste, e em outros momentos de nossas vidas;

A Thainara Rodrigues Mauricio e Ana Paula, alunas de graduação do IFES/ *Campus de Alegre*, por todo o auxílio com os trabalhos de laboratório;

Às funcionárias do laboratório de Bromatologia do Ifes, *Campus de Alegre*, Alessandra de Fátima Ulisses e Jackeline Souza que estiveram envolvidas nas avaliações de análises de proteína bruta e clorofila, pois grávida não poderia realizar estas análises sem a ajuda das funcionárias e amigas inestimáveis;

Aos colegas das turmas de Doutorado/Dinter de 2009-2013, pelos momentos felizes vividos juntos e a amizade inestimável!

Ao inesquecível amigo Carlos José Coelho-Cazé (*In memoriam*), um vencedor, que nunca se deixou abater, e me serve de inspiração diante das dificuldades.

## RESUMO GERAL

THOMAZ-GORINI, Luciana Almada, D. Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Outubro de 2014. Crescimento Populacional, Qualidade Nutricional e Eficiência Fotoquímica de Microalgas Continentais Cultivadas em Diferentes Espectros de Luz e Disponibilidades de N-P-K. Orientador: Eliemar Campostrini. Coorientador: Atanásio Alves do Amaral.

## EXPERIMENTO I

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Ecologia Aquática e Produção de Plâncton (LEAPP) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (Ifes). O *Campus de Alegre* localiza-se no km 40 da Rodovia Cachoeiro-Alegre, na Fazenda Caixa-D'Água, Distrito de Rive, Município de Alegre, ES. Com o objetivo de avaliar o efeito da utilização de três tipos de adubos comerciais (N-P-K) em diferentes concentrações e solubilizações em água destilada



(1g, 5g e 10g L<sup>-1</sup>) avaliando a taxa de crescimento dos meios cultivados e o valor nutricional das microalgas em cultivo misto *Ankistrodesmus* sp e *Scenedesmus* sp. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial completo 3<sup>3</sup>, em triplicata. Como adubos comerciais à base de N-P-K, foram testados os seguintes fertilizantes: Adubo1 (25-05-15) + 11% de S (enxofre) (solução de 1g L<sup>-1</sup>) (T1); (solução de 5g L<sup>-1</sup>) (T2); (solução de 10g L<sup>-1</sup>) (T3); Adubo2 (15-09-12) granulado de liberação lenta (solução de 1g L<sup>-1</sup>) (T4); (solução de 5g L<sup>-1</sup>) (T5); (solução de 10g L<sup>-1</sup>) (T6); Adubo3 (18-18-18) solúvel em pó (solução de 1g L<sup>-1</sup>) (T7); (solução de 5g L<sup>-1</sup>) (T8) e (solução de 10g L<sup>-1</sup>) (T9). Os resultados do crescimento do número de células mL<sup>-1</sup> da microalga *Ankistrodesmus* sp., analisados pelo teste de Tuckey demonstraram diferença significativa (P>0,05) entre os tratamentos cultivados com o fertilizante (25-05-15) + 11% de S (enxofre). O T3 (Solução de 10g L<sup>-1</sup>) apresentou melhor desempenho no crescimento das células, enquanto o T1 (solução de 1g L<sup>-1</sup>) foi considerado intermediário e o T2 (solução de 5g L<sup>-1</sup>) apresentou o pior desempenho com relação ao desenvolvimento da microalga do gênero *Ankistrodesmus* sp. Os melhores resultados foram obtidos com a microalga *Scenedesmus* sp., com os fertilizantes comerciais (15-09-12) granulado de liberação lenta e (18-18-18) solúvel em pó (solução de 1g L<sup>-1</sup>). Analisados pelo teste de Tuckey não demonstraram diferenças significativas (P<0,05) entre os tratamentos. Portanto, os resultados observados com relação ao crescimento celular e o bom estado nutricional das microalgas *Ankistrodesmus* sp., e *Scenedesmus* sp., nas condições experimentais adotadas, sob o efeito dos fertilizantes comerciais testados alcançaram altas densidades em um curto espaço de tempo.

Palavras-chave: Cultivo misto, *Ankistrodesmus* sp., *Scenedesmus* sp., fertilização, N-P-K.

## EXPERIMENTO II

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Ecologia Aquática e Produção de Plâncton (LEAPP) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (Ifes). O *Campus de Alegre* localiza-se no km 40 da Rodovia Cachoeiro-Alegre, na Fazenda Caixa-D'Água, Distrito de Rive, Município de Alegre, ES. Objetivou-se neste trabalho testar a influência de dois adubos à base de fertilizantes químicos comerciais N-P-K 15-05-30 (solução de 10g L<sup>-1</sup>) pó solúvel e 15-09-12 (solução de 10g L<sup>-1</sup>) granulado em função do tipo de luz (luz branca, luz azul e luz vermelha) no desenvolvimento da microalga *Volvox* sp., avaliando a taxa de crescimento, o valor proteico, o rendimento quântico máximo do fotossistema II e o índice fotossintético. Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado, distribuído em esquema fatorial completo 2<sup>3</sup>, em triplicata. Realizando-se os seguintes testes: Espectro de luz branca (15-09-12) granulado solução de 10g L<sup>-1</sup> (T1), espectro de luz azul (15-09-12) granulado solução de 10g L<sup>-1</sup> (T2); espectro de luz vermelha (15-09-12) granulado solução de 10g L<sup>-1</sup> (T3); espectro de luz branca (15-05-30) pó solúvel solução de 10g L<sup>-1</sup> (T4); espectro de luz azul (15-05-30) pó solúvel solução de 10g L<sup>-1</sup> (T5); espectro de luz vermelha (15-05-30) pó solúvel solução de 10g L<sup>-1</sup> (T6). Os resultados do crescimento do número de células mL<sup>-1</sup> da microalga *Volvox* sp., analisados pelo teste de Tuckey demonstraram diferença significativa (P>0,05), os tratamentos T2 (15-09-12) Luz azul e T5 (15-05-30) Luz azul apresentaram o melhor desempenho no desenvolvimento da microalga *Volvox* sp., enquanto os T3 (15-09-12) Luz vermelha, T6 (15-05-30) Luz vermelha e o T1 (15-09-12) Luz branca e T4 (15-05-30) Luz branca apresentaram o pior desempenho para o crescimento celular (número de células mL<sup>-1</sup>). O rendimento quântico máximo do FSII, representado pela relação Fv/Fm, em todos os tratamentos realizados não apresentou diferença significativa (P<0,05). O PI (Índice fotossintético) para os tratamentos T1 (15-05-30) Luz vermelha, T2 (15-05-30) Luz azul, T3 (15-05-30) Luz branca, T4 (15-09-12) Luz vermelha, T5 (15-09-12) Luz azul e T6 (15-09-12) Luz branca, não apresentou diferença significativa (P<0,05), apresentando valores do

índice fotossintético entre 0,06-0,08. Demonstrando diferença significativa ( $P>0,05$ ) quando realizada a análise estatística pelo teste de Tuckey, entre os tratamentos T4 (15-05-30) Luz branca comparado com os tratamentos T5 (15-05-30) Luz azul e T6 (15-05-30) Luz vermelha. O resultado da análise proteica apresentou teores de Proteína Bruta (PB) elevados nos tratamentos: T3 (15-05-30) Luz branca e T6 (15-09-12) Luz branca. Com relação aos demais tratamentos T1 (15-05-30) Luz vermelha, T2 (15-05-30) Luz azul, T4 (15-09-12) Luz vermelha e T5 (15-09-12) Luz azul, não atingiram o valor de 30% PB. Portanto, os resultados demonstraram que a utilização do adubo comercial (15-05-30) Luz branca (fluxos fotossintéticos da Luz branca) apresentou melhor capacidade fotossintética e estado proteico no desempenho da microalga *Volvox* sp. Podendo ser utilizado para cultivos deste gênero de microalga.

Palavras-chave: Cultivo, *Volvox* sp., capacidade fotossintética, fertilização mineral.

## GENERAL ABSTRACT

THOMAZ-GORINI, Luciana Almada, D. Sc.; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. October 2014. Growth, Nutrition Efficiency and Continental Microalgae Photosynthetic Capacity under Different Photosynthetic Photon flows and availability of Mineral nutrients. Advisor: Eliemar Campostrini. Co-Advisor: Atanásio Alves do Amaral.

## EXPERIMENT I

This work was performed at the Laboratory of Aquatic Ecology and Production of Plankton (LEAPP), Federal Institute of Science and Technology of the Espírito Santo (Ifes) education. The *Campus Alegre* is located at kilometer 40 of Highway Cachoeiro-Alegre, in the Farm-Box D'Água, District Rive, municipality of Alegre, ES. With the objective of evaluating the effect of using three types of commercial fertilizers (N-P-K) at different concentrations and solubilization in distilled water (1g, 5g and 10g L<sup>-1</sup>) evaluating the growth rate of the cultured

media and the nutritional value of microalgae in mixed cropping *Ankistrodemsus sp* and *Scenedesmus sp*. The experimental design was completely randomized full factorial 33, in triplicate. As commercial-based N-P-K fertilizers, the following fertilizers were tested: Fertilizer1 (25-05-15) + 11% S (sulfur) (solution 1g L<sup>-1</sup>) (T1); (Solution 5g L<sup>-1</sup>) (T2); (solution 10g L<sup>-1</sup>) (T3); Fertilizer2 (15-09-12) granular slow release (solution 1g L<sup>-1</sup>) (T4); (solution 5g L<sup>-1</sup>) (T5); (solution 10g L<sup>-1</sup>) (T6); Fertilizer3 (18-18-18) (solution of 1 g L<sup>-1</sup>) (T7); (Solution 5g L<sup>-1</sup>) (8) and (solution 10g L<sup>-1</sup>) (T9). The results of the growth in the number of cells mL<sup>-1</sup> of microalgae *Ankistrodemsus sp*. Analyzed by Tuckey test showed significant differences (P> 0.05) between treatments grown with fertilizer (25-05-15) + 11% of S (sulfur). The T3 (solution of 10g L<sup>-1</sup>) performed better on cell growth, while T1 (solution 1g L<sup>-1</sup>) was considered intermediate and T2 (solution 5g L<sup>-1</sup>) had the worst performance with respect to development of microalgae of the genus *Ankistrodemsus sp.*, the microalgae *Scenedesmus sp.*, performed better growth in the number of cells mL<sup>-1</sup>, with commercial granular fertilizer (15-09-12) and slow release (18-18-18 ) (solution of 1g L<sup>-1</sup>). Analyzed by Tuckey test showed no significant differences (P< 0.05) between treatments. Therefore, the results found that cell growth and good nutritional status of microalgae *Ankistrodemsus sp.*, and *Scenedesmus sp.*, the experimental conditions adopted, under the effect of the tested commercial fertilizers reached high densities in a short time and possibly lowers cost of production.

Keywords: mixed crops, microalgae, *Ankistrodemsus sp*, *Scenedesmus sp*, fertilization, NPK.

## EXPERIMENT II

This work was performed at the Laboratory of Aquatic Ecology and Production

of Plankton (LEAPP), Federal Institute of Science and Technology of the Espírito Santo (Ifes) education. The *Campus Alegre* is located at kilometer 40 of Highway Cachoeiro-Alegre, in the Farm-Box D'Água, District Rive, municipality of Alegre, ES. The aim of this work is to test the influence of two fertilizer-based commercial chemical fertilizers NPK 15-05-30 (Solution 10g L<sup>-1</sup>) and 15-09-12 (Solution 10g L<sup>-1</sup>) in granular slow release depending on the type of light (white light, blue light and red light) in the development of microalgae *Volvox sp.* assessing the rate of growth, protein value, maximum quantum efficiency of photosystem II and the photosynthetic rate. A completely randomized experimental design, distributed in 2<sup>3</sup> full factorial design, was used in triplicate. The following tests were performed: Spectrum of white light (15-09-12) slow release granular solution of 10g L<sup>-1</sup>) (T1); Spectrum grainy blue light (15-09-12) slow release solution of 10g L<sup>-1</sup>) (T2); Spectrum of red light (15-09-12) slow release granular solution 10g L<sup>-1</sup>) (T3); Spectrum of white light (15-05-30) solution of 10g L<sup>-1</sup>) (T4); Spectrum of blue light (15-05-30) solution of 10g L<sup>-1</sup>) (T5); Spectrum of red light (15-05-30) solution of 10g L<sup>-1</sup>) (T6). The results of the growth in the number of cells mL<sup>-1</sup> of microalgae *Volvox sp.* Analyzed by Tuckey test showed significant differences (P >0.05) and T2 treatments (15-09-12) Blue Light and T5 (15-05 -30) blue light showed the best performance in the development of microalgae *Volvox sp.*, while T3 (15-09-12) red light, T6 (15-05-30) red light and T1 (15-09-12) white light and T4 (15-05-30) white light showed the worst performance for cell growth (number of cells mL<sup>-1</sup>). The maximum quantum yield of PSII, represented by the Fv / Fm ratio in all treatments showed no significant difference (P< 0.05). The PI (photosynthetic index) for T1 (15-05-30) red light, T2 (15-05-30) Light blue, T3 (15-05-30) White light, T4 (15-09-12) treatments red light, T5 (15-09-12) blue light and T6 (15-09-12) white light, showed no significant difference (P< 0.05), with values of photosynthetic rate between 0.06-0.08. Demonstrating a significant difference (P >0.05) when performed statistical analysis by Tuckey test between T4 (15-05-30) White light treatments compared with treatments T5 (15-05-30) Light blue and T6 (15-05-30) red light. The result of the chemical analysis showed high levels of crude protein (CP) in the treatments T3 (15-05-30) White light and T6 (15-09-12) white light. With the other treatments T1 (15-05-30) red light, T2 (15-05-30) Light blue,

T4 (15-09-12) Red Light and T5 (15-09-12) Light blue, not amounted to 30% CP. Therefore the results showed that the use of commercial fertilizer (15-05-30) White light (photosynthetic fluxes of white light) showed better photosynthetic capacity and nutritional status in the performance of microalgae *Volvox* sp., may be used for cultivation of microalgae in this genre.

Keywords: Cultivation, *Volvox* sp., mineral nutrition, photosynthetic capacity, light spectrums.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	iii
RESUMO GERAL .....	v
EXPERIMENTO I .....	v
EXPERIMENTO II .....	vii
GENERAL ABSTRACT .....	ix
EXPERIMENT I .....	ix
EXPERIMENT II .....	x
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	5
2.1 HISTÓRICO .....	5
2.2 IMPORTÂNCIA .....	8
2.3 CLASSIFICAÇÃO .....	12
2.4 PRODUÇÃO E TECNOLOGIA das microalgas continentais.....	14
3. TRABALHOS .....	20



<b>3.1 CULTIVO DE ANKISTRODESMUS SP. E SCENEDESMUS SP. EM LABORATÓRIO UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FERTILIZANTES QUÍMICOS COMERCIAIS .....</b>	<b>20</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>20</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>21</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
LOCALIZAÇÃO E GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	25
PERÍODO PRÉ-EXPERIMENTAL .....	26
PERÍODO EXPERIMENTAL.....	27
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>46</b>
<b>3.2 CAPACIDADE FOTOSSINTÉTICA E NUTRIÇÃO DA MICROALGA VOLVOX SP., EM LABORATÓRIO SOB DIFERENTES FERTILIZANTES MINERAIS E FLUXOS DE FÓTONS FOTOSSINTÉTICOS.....</b>	<b>52</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>52</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>53</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>59</b>
LOCALIZAÇÃO E GRUPOS EXPERIMENTAIS .....	59
PERÍODO PRÉ-EXPERIMENTAL .....	60
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>70</b>
<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>82</b>
<b>4. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>89</b>
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>93</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As algas apresentam uma ampla distribuição geográfica, podendo ser encontradas em praticamente todas as condições ambientais da Terra, desde solos férteis a ambientes extremamente áridos com altas temperaturas do ar diurnas e reduzidas temperaturas do ar durante a noite (Bhattacharya e Medlin, 1998).

Segundo Lee (1989), a maior parte destes seres vive nos ambientes aquáticos, tanto marinhos quanto em águas continentais. Nestes últimos ambientes, encontra-se a maior prevalência das microalgas, as quais fazem parte do fitoplâncton, que são assim chamados os organismos fotossintetizantes que flutuam nos corpos d'água. Devido à eficiência fotossintética destes organismos, estas formam a base da cadeia alimentar nos ecossistemas aquáticos, e são responsáveis por cerca de 50 % da fixação de carbono e produção de oxigênio do planeta (Oliveira, 2009).

Dentro do campo da utilização das algas, os estudos sobre a produção e a qualidade dos lipídios produzidos por microalgas, podem indicar que o cultivo destes organismos pode resultar na produção de biocombustíveis como o biodiesel, o que poderia substituir os combustíveis fósseis provenientes do refino de petróleo (Brown, 2002). O cultivo de algas pode ser uma alternativa tecnológica para o desenvolvimento de fontes de energias "limpas", uma vez que estes organismos podem assimilar o dióxido de carbono, e assim reduzir os níveis

deste gás de efeito estufa na atmosfera (Borges et al., 2007).

A produção de algas possui objetivos diversos: poderá vir a ser empregada nos tratamentos de esgoto e efluentes orgânicos, na produção química comercial, na aquicultura, na bioconservação da energia solar, dentre outros (Sipaúba-Tavares e Rocha, 2003).

As microalgas podem ser utilizadas no consumo humano, como fonte suplementar de proteínas, carboidratos, ácidos graxos, pigmentos, vitaminas, entre outras substâncias. Algumas espécies de microalgas são utilizadas como matéria-prima na indústria de alimentos e farmacêutica (Borowitzka e Borowitzka 1988; Borowitzka, 1997).

A biotecnologia das algas é reconhecida mundialmente como fonte de diferentes produtos de suma importância. Nesse contexto, particularmente as microalgas constituem uma boa opção para o aporte de proteínas, vitaminas e minerais para pessoas e animais (Ohse et al., 2009).

Segundo Nayar et al. (1998), a natureza oferece uma grande diversidade de organismos vivos, ricos em vitaminas e minerais, podendo em ambientes artificiais, ser enriquecidos pela incorporação de vitaminas, aminoácidos, ácidos graxos essenciais e minerais. Assim, esses compostos poderão ser transferidos via cadeia alimentar para os consumidores finais. Contudo, esta é uma tecnologia muito cara. Entretanto, investiga-se a possibilidade de utilizar fontes alternativas como possíveis nutrientes no cultivo de microalgas, e, assim obter um consenso no que diz respeito aos custos de produção (Cabrales e Gonzalez, 2004).

Na aquicultura a produção das microalgas é a parte mais dispendiosa associada ao cultivo de larvas, pois requer disponibilidade de espaço, trabalho intensivo e assepsia rigorosa (Palmer et al., 1975; Shaw, 1979; Coutteau e Sorgeloos, 1992; Sipaúba-Tavares e Pereira, 2008; Sipaúba-Tavares e Fioresi, 2008).

Nas últimas décadas, mais de 100 espécies de microalgas foram testadas e avaliadas para uso na aquicultura, mas dentre estas, apenas aproximadamente 20 tiveram seu uso difundido (Brown et al., 1997; Olaizola, 2003), pois apresentaram os atributos fundamentais para o sucesso na aquicultura (Laing, 1991). Entre estes atributos destacam-se o tamanho apropriado para ingestão, a boa digestibilidade, o alto valor nutricional, a ausência de toxinas, as altas taxas

de crescimento e a divisão celular, bem como a facilidade de manutenção (Brown et al., 1997). Dentre as diversas espécies de microalgas planctônicas cultiváveis, os gêneros *Chlorella*, *Dunaliella* e *Spirulina*, têm sido amplamente usados na aquicultura devido ao bom crescimento destes organismos em diferentes condições físico-químicas, suportando assim variações de temperatura, pH e intensidade luminosa (Pereira, 2001; Sipaúba-Tavares e Rocha, 2003). Estes gêneros também são conhecidos por se adequarem à necessidade nutricional de larvas e pós-larvas de camarões de água doce, assim como de alevinos, artêmia e rotíferos (Sipaúba-Tavares e Rocha, 1993; Hardy e Castro, 2000; Sipaúba-Tavares et al., 2009).

Todavia, o alto custo de produção dos cultivos de microalgas para sua utilização na aquicultura afeta a rentabilidade dos produtores. Assim, para aumentar o rendimento e reduzir os custos são necessárias pesquisas que resultem na utilização de espécies mais produtivas (Borowitzka, 1997), bem como os estudos relacionados à otimização dos fatores nutricionais e do ambiente, como a disponibilidade de CO<sub>2</sub> e intensidades luminosas adequadas ao bom crescimento destes organismos. Para algumas aplicações particulares ou setores da indústria, seria interessante a utilização de novas espécies com uma melhor qualidade nutricional ou rápido crescimento, que poderiam melhorar a taxa produtiva dos organismos alimentados com as microalgas (Brown, 2002).

No intuito de selecionar espécies de microalgas como fonte de alimento na aquicultura, muitas espécies foram e continuam sendo estudadas (Thomaz et al., 2004). As preferidas são aquelas que reúnem qualidades ideais de nutrição, de digestibilidade e que apresentem tamanhos celulares compatíveis na criação de larvas e pós-larvas de camarões de água doce, bivalves, assim como de alevinos, criados em diferentes estágios de desenvolvimento, e que suportem as condições de cultivo (Silva et al., 2004).

Portanto, há a necessidade de realizar pesquisas visando o desenvolvimento e, principalmente, ao aperfeiçoamento dos sistemas de cultivo conhecidos. Essas pesquisas se fazem necessárias para a identificação dos produtos que podem ser extraídos das microalgas de água doce, da possível atividade biológica (estudos metabólicos e toxicológicos) e do desenvolvimento de mercados específicos para estes produtos. Sendo assim, torna-se necessário

alcançar uma tecnologia de produção adequada aos sistemas artificiais além do conhecimento da biologia e do valor nutricional dos organismos produzidos, para obter êxito na produção.

Sendo assim, este trabalho teve por objetivo estudar em condição de laboratório, o cultivo misto das microalgas dos gêneros: *Ankistrodesmus* e *Scenedesmus* avaliando o crescimento celular e valor proteico, sob o efeito de diferentes concentrações de adubos químicos comerciais. A avaliação do crescimento celular, o valor proteico e a capacidade fotossintética da microalga *Volvox* sp., utilizando dois adubos químicos comerciais associados a três tipos de espectros de luz diferentes.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 HISTÓRICO

Com relação ao cultivo de algas, segundo relatos de Sipaúba-Tavares e Rocha (2003), um grande impulso no cultivo em massa ocorreu entre 1955 e 1970, devido à construção de pequenos laboratórios que, posteriormente, foram substituídos por sistemas de cultivo em grande escala. Os gêneros *Chlorella* sp e *Scenedesmus* sp., foram as primeiras microalgas investigadas, pela facilidade no cultivo.

Em nível mundial, o crescente interesse em tecnologias limpas, sustentáveis e orgânicas, na obtenção de produtos para o consumo humano, demanda uma contínua busca por espécies e/ou variedades capazes de sintetizar grandes quantidades de compostos específicos como proteínas, ácidos graxos e carboidratos usados na síntese de plásticos ou fertilizantes potencializando a biossíntese desses compostos (condições de cultivo, melhoramento genético, etc.). Além das substâncias já conhecidas: proteínas para ração animal, ácidos graxos essenciais como o ômega 3, a quantidade de compostos de interesse comercial que podem ser obtidos a partir das microalgas parece ser imprevisível

para aplicação nas indústrias alimentícia e farmacêuticas (Ferreira et al., 2013). Como exemplo, as algas *Chlorella*, *Dunaliella* e *Spirulina*, que são cultivadas como alimento para organismos aquáticos, e utilizadas na extração de produtos químicos de alto valor monetário podem também ser utilizadas para tratamentos de efluentes (Pereira, 2001; Sipaúba-Tavares e Pereira, 2008).

Nos Estados Unidos, Oswald et al. (1968) e Oswald (1960) revolucionaram a tecnologia do cultivo em larga escala para utilização das algas no tratamento de esgotos e na produção de proteína. Na década de 70, Goldman et al. (1979), aproveitando as técnicas já existentes, deram um grande impulso na tecnologia de produção de algas marinhas em grande escala, utilizando viveiros de 15 m<sup>2</sup> e realizando experimentos com duração entre 6 e 18 meses. Nestas condições, a produção de diatomáceas obtida foi em torno de 6 a 10 g m<sup>2</sup> dia<sup>-1</sup>.

No Japão, na França, na Espanha, no Peru entre outros, o interesse pelo cultivo em massa surgiu após a Segunda Guerra Mundial, com a introdução da bioengenharia no cultivo de *Chlorella*. No Japão, a primeira cultura externa (*outdoor*) foi desenvolvida em 1953, em tanques de 15 m<sup>2</sup>, por Mitya et al. (1953), (*in*: Goldman, 1979), com uma produção média de 3,5 g m<sup>-2</sup>dia<sup>-1</sup>. Ainda na década de 50 do século passado, Morinaura et al. (1955) (*in*: Goldman, 1979) elevaram a produção para 16 a 17 g m<sup>2</sup> dia<sup>-1</sup>.

No final da década de 50, surgiram pequenas e grandes indústrias para o cultivo de *Chlorella*, com uma produção de 300 toneladas para um total de 10 companhias industriais (Sipaúba-Tavares e Rocha, 2003).

Na Alemanha, os primeiros trabalhos datam da época da Segunda Guerra Mundial, quando as algas eram cultivadas em massa para a produção de gordura. A partir de meados da década de 50, as pesquisas tiveram grande impulso, sendo culturas contínuas, sofisticadas, de *Scenedesmus* sp. e *Coelastrum* sp., produziram 30g m<sup>3</sup> dia<sup>-1</sup>. Posteriormente, esse país fez convênios com os governos da Tailândia, da Índia e do Peru para produção de *Scenedesmus* sp. e *Spirulina* sp., (Sipaúba-Tavares e Rocha, 2001).

A Tailândia, na década de 60, apresentou uma tecnologia para cultivo em grande escala utilizando culturas mistas de microalgas. Israel iniciou o cultivo na década de 50, em pequena escala, utilizando cultivos de *Chlorella* sp., com adição de CO<sub>2</sub>, aplicando a circulação e luz artificial. Já na década de 70, em parceria com

indústrias privadas, passou a desenvolver o cultivo em massa da alga verde, unicelular, marinha, denominada *Dunaliella* sp., (Sipaúba-Tavares e Rocha, 2001).

A partir de 1951, a Rússia, Bélgica e a Holanda iniciaram o cultivo e a produção de *Chlorella* sp., com níveis de 10 a 20 g m<sup>3</sup> dia<sup>-1</sup>, e de algas azuis como *Anabaena variabilis* e *Spirulina platensis*. Estes tipos de algas são bastante utilizados na produção controlada de fitoplâncton e zooplâncton marinhos e de água salobra. Contudo, em relação ao plâncton de água doce, ainda são necessários estudos relacionados à produção em larga escala, com a utilização de espécies regionais de fácil obtenção de inóculos (Sipaúba-Tavares e Rocha, 2001; Sipaúba-Tavares e Pereira, 2008). Desta maneira, estas informações fortalecem a proposta deste trabalho.

No Brasil, o cultivo de algas marinhas teve início na década de 80 do século anterior, porém em relação às espécies de água doce, os trabalhos estão voltados para cultivos laboratoriais, em pequena escala (Giani, 1991; Sipaúba-Tavares e Rocha, 1993; Macedo, 1999).

A partir da segunda metade da década de 80, novos enfoques foram direcionados às linhas de pesquisa dentro dos estudos de seleção de espécies com melhor potencial de crescimento, adaptação ao cultivo e valor nutricional do plâncton (Arredondo-Figueroa et al., 1998).

Atualmente há um interesse voltado para a ficologia aplicada, principalmente em áreas como aquicultura na determinação da qualidade nutricional e composição química de alimentos planctônicos para animais em cativeiro (Sicko-Goad e Andersen, 1991; Sipaúba-Tavares e Rocha, 1993; Hardy e Castro, 2000; Sipaúba-Tavares et al., 2009; Ferreira et al., 2013).

Apesar de ser uma atividade consolidada em outros países, a produção comercial de microalgas no Brasil tem sido realizada por empresas (localizadas no litoral de Santa Catarina e de praticamente todos os estados da Região Nordeste) que produzem a biomassa e a emprega principalmente na alimentação de organismos como camarões e moluscos marinhos. Não há informação da produção em grande escala para a obtenção de biomassa ou para a extração de compostos bioativos visando outras aplicações. Somente existem iniciativas ainda em caráter experimental em diversos centros de pesquisa e, em geral, trabalhando isoladamente (Derner et al., 2006; Ferreira et al., 2013).



## 2.2 IMPORTÂNCIA DAS ALGAS

Cada ecossistema aquático possui um conjunto próprio de organismos planctônicos, cuja variedade, abundância e distribuição dependem das características físicas, químicas e biológicas do meio (Sipaúba-Tavares, 2005).

O fitoplâncton de água doce geralmente é representado pelas algas pertencentes aos Filos Euglenófitas, Crisófitas, Bacilariófitas e Clorófitas, enquanto o zooplâncton é representado principalmente pelos protozoários, pelos rotíferos e pelos microcrustáceos (cladóceros e copépodos), além de outros animais menos comuns (Esteves, 1998).

Devido à eficiência fotossintética, as algas são consideradas a base da cadeia alimentar, nos ecossistemas aquáticos são responsáveis por cerca de 40 a 50% da fixação de carbono e produção de oxigênio do planeta (Oliveira, 2009). A capacidade de absorção de CO<sub>2</sub> pelas microalgas, as medidas de produção primária anual realizadas em ambientes aquáticos, apresentam em ambientes costeiros 1 até 4 t CO<sub>2</sub> ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>; em Lagos Eutróficos 5 até 8 t CO<sub>2</sub> ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>; e as Microalgas cultivadas correspondem a 11 até 36.5 t CO<sub>2</sub> ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> (Margalef, 1995), enquanto nas áreas reflorestadas apresentam uma produtividade média de 3 até 4 t CO<sub>2</sub> ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>. Verificando a mesma magnitude dos valores primários das microalgas, quando comparadas aos do reflorestamento, em condições de cultivo em massa, a absorção de dióxido de carbono pelo fitoplâncton supera as taxas de produção das plantas superiores (Borges et al., 2007). Além do rápido crescimento, as microalgas apresentam uma ampla tolerância a fatores ambientais extremos, podendo ser cultivadas intensivamente em pequenos espaços, e em regiões impróprias para atividades agrícolas. Comparativamente às plantas terrestres, as microalgas, apresentam muitas vantagens que se devem aos vários aspectos fisiológicos e químicos, isto é, a eficiência de conversão fotossintética da luz solar (~10%) cerca de 6 a 12 vezes superior às plantas, o que garante maiores rendimentos em termos de produtividade (Falkowski e Raven, 1997; Zhu et al., 2008; Packer, 2009); enorme diversidade ecológica específica, morfológica, genética e metabólica, o que permite a seleção de espécies mais adequadas a determinadas condições, a locais de cultivo e sistemas de colheita

(Dismukes et al., 2008). Ademais, há possibilidade de cultivo da biomassa de microalgas em ambientes marinhos, costeiros e terrenos desertos não-aráveis, eliminando a competição por áreas utilizadas para a agricultura e produção de alimentos (Patil et al., 2008; Li et al., 2008).

Na aquicultura, as microalgas são empregadas como fonte primária de alimento para larvas, juvenis e até adultos de moluscos, crustáceos e peixes, bem como do zooplâncton, os quais são usados como alimento para crustáceos e peixes (Brown et al., 1997; Thomaz et al., 2004). Algumas espécies importantes na piscicultura, como a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), a carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) e formas jovens de muitas outras espécies têm nas algas o principal item de sua dieta (Faria et al., 2001).

A comunidade planctônica dos ecossistemas aquáticos artificiais indica o grau de trofia e o padrão de qualidade da água desses sistemas, bem como a qualidade do alimento natural disponível para os peixes (Macedo e Pinto-Coelho, 2000; Sipaúba-Tavares, 2005).

Na aquicultura outra função das microalgas é a de proporcionar a melhoria da qualidade da água, por meio da absorção de produtos nitrogenados tóxicos (amônia e nitrito) (Lavens e Sorgeloos, 1996) e combate às bactérias patogênicas pela produção de substâncias antibióticas (Reitan et al., 1994).

É de fundamental importância o conhecimento da dinâmica dos sistemas aquáticos, pois, o fitoplâncton é o elo na transferência de energia solar e dos nutrientes, possibilitando a passagem destes aos consumidores (zooplâncton e peixes) e, muitas vezes, determinando a produtividade de um ambiente. Entretanto, poucos estudos têm sido realizados focalizando o aspecto do cultivo de alga de água doce e seu valor nutricional e alimentar (Sipaúba-Tavares et al., 1999; Sipaúba-Tavares et al., 2009).

Em laboratório, são vários os meios alternativos para o cultivo de microalgas. Em termos de aplicação prática, todos foram desenvolvidos com a finalidade de diminuir os custos na produção. Dentre alguns meios nutricionais de cultivo e microalgas testadas estão os resíduos líquidos de indústria de suco de laranja concentrado utilizado no cultivo de microalgas clorofíceas (*Ankistrodesmus gracilis* e *Scenedesmus bijugatus*) (Beltrão, 1992); e N-P-K (20-05-20) para cultivo de *Scenedesmus bijugatus* e *Ankistrodesmus gracilis* (Sipaúba-Tavares e Rocha,

1993; Sipaúba-Tavares et al., 1999; Hardy e Castro, 2000); urina humana para cultivo de *Scenedesmus acuminatus* (Adamsson, 2000); e efluente sintético de suíno para o cultivo de *Spirulina platensis* (Bertolin et al., 2005). Um fator importante para o bom desempenho das algas é a adição de vitaminas do complexo B ao meio de cultura, proporcionando ótimo crescimento e um aumento significativo na produção (Sipaúba-Tavares et al., 2001; Sipaúba-Tavares e Bachion, 2002).

O estudo da nutrição de organismos planctônicos em laboratório fornece subsídio para produção em larga escala (cultivo em massa). O conhecimento da biologia, a influência de fatores como temperatura, nutrientes minerais, luz e concentração de CO<sub>2</sub> sobre o crescimento populacional de algas e o valor nutricional do zooplâncton que ingerem estas algas permitem a manipulação das condições de cultivo, garantindo o sucesso das culturas de plâncton. Além disso, outro objetivo desse tipo de estudo está ligado ao entendimento da dinâmica das comunidades planctônicas (Bachion, 1996; Sipaúba-Tavares e Pereira, 2008; Sipaúba-Tavares et al., 2009).

Os mecanismos de nutrição de diferentes espécies zooplanctônicas, seletividade, taxa de ingestão, e vários outros aspectos foram extensivamente investigados, mas muitas questões ainda não foram respondidas (Giani, 1991; Barros e Valenti, 1997; Thomaz et al., 2004; Ferreira et al., 2013).

A importância das pesquisas que têm como objetivo desenvolver técnicas para o cultivo em massa de microalgas de água doce utilizadas na alimentação direta das larvas ou indiretamente, por meio da alimentação de diversas espécies de zooplâncton que, por sua vez, constituirão o alimento natural de peixes, camarões entre outros, possibilitando assim a transferência dos nutrientes das algas (vitaminas e ácidos graxos) para um nível trófico superior (Sipaúba-Tavares e Rocha, 1999; Brown et al., 1997; Sipaúba-Tavares et al., 2009; Ferreira et al., 2013).

Dentre as microalgas de água doce cultivadas com potencial, estão as Chlorophyceae (Pereira, 2001; Sipaúba-Tavares e Pereira, 2008).

A espécie *Ankistrodemus gracilis* foi utilizada em experimentos e foi considerada satisfatória como alimento para zooplâncton e larvas de peixes (Sipaúba-Tavares e Rocha, 1993; Bachion, 1996; Hardy e Castro, 2000; Sipaúba-

Tavares e Pereira, 2008). Corroborando com os resultados encontrados, Olivera e Sipaúba-Tavares (2000), trabalhando com *Tetraselmis tetraathele*, cultivada em pequena escala.

A alga *Ankistrodesmus gracilis* apresentou resultados satisfatórios quando cultivada em laboratório para utilização como alimento para zooplâncton e larvas de peixes (Sipaúba-Tavares e Rocha, 1993; Sipaúba-Tavares e Braga, 1999; Hardy e Castro, 2000).

*Scenedesmus quadricauda* para a produção de uma pasta, obtiveram uma eficiência de 90% na floculação em pH de  $8,0 \pm 0,1$ , apesar de uma perda no valor nutricional no processo de concentração e armazenagem quando comparadas à alga viva (Morales et al., 1985; Lubián, 1989; Buelma et al., 1990). Estes autores verificaram um satisfatório resultado na alimentação de larvas de animais aquáticos dulcícolas. Testes posteriores mostraram a eficiência de chitosan como agente floculante, com resultados semelhantes aos encontrados por Sipaúba-Tavares e Pereira (2008).

Utilizando o mesmo composto para floculação das microalgas *Ankistrodesmus gracilis* e *Scenedesmus quadricauda* uma diferença significativa foi verificada entre duas dietas oferecidas ao zooplâncton, tanto *Daphnia* quanto *Moina* apresentaram valores mais baixos de lipídios totais e triglicérides com a microalga *Scenedesmus. quadricauda* (Macedo, 1999). Escassos estudos têm enfatizado a composição química do zooplâncton, principalmente de água doce. Assim, torna-se vital avaliar o valor nutricional das espécies e a adequação deste como alimento na aquicultura (Watanabe et al., 1983; Kibria et al., 1997; Sipaúba-Tavares e Pereira, 2008).

O alimento deve ser também avaliado, por sua composição química e seu custo, posteriormente estudos da composição centesimal da microalga *A. gracilis* a consideraram de alto valor nutricional quando comparada a *S. quadricauda*. Desta forma, o maior desafio dos pesquisadores em algas é a redução dos custos, estabilização e manutenção da qualidade do produto (Pereira, 2001; Sipaúba-Tavares e Pereira, 2008).

A microalga para ser viável para a aquicultura deve apresentar altas taxas de crescimento, ser de fácil cultivo, apresentar tamanho e forma adequada para ser ingerida, parede celular digerível ou ausente e alta qualidade nutritiva, esta

qualidade referente ao teor de proteína elevado, que nas algas fica em torno de 30% e ainda disponibilidade de carboidratos assimiláveis (Lourenço, 2006).

Resultados satisfatórios de crescimento populacional estão sendo relacionados a diferentes concentrações de várias espécies de microalgas, capazes de afetar a composição química do zooplâncton (Pozuelo, 1975; Hirayama e Nakamura, 1976; Scott e Baynes, 1978; Rainuzzo et al., 1989 e Carié et al., 1993; Sipaúba-Tavares et al., 2009). No entanto, diversas espécies de microalgas continentais não possuem tecnologia de cultivo amplamente difundida. Portanto, paralelamente ao melhoramento nutricional do zooplâncton, a difusão das pesquisas de algas de água doce é importante para o conhecimento dos requerimentos nutricionais destes organismos (Elendt, 1989). Dada a escassez de informações relativas às exigências nutricionais do plâncton dulcícola, tornam-se necessárias pesquisas que investiguem novas formas de administração de nutrientes para as algas, a quantidade de luz e CO<sub>2</sub> a serem disponibilizadas nos ambientes de cultivo, e principalmente, complementação da composição química desses organismos para atender as exigências nutricionais das larvas de peixes e crustáceos (Portella, 1995; Sipaúba-Tavares e Pereira, 2008; Ferreira et al., 2013).

### 2.3 CLASSIFICAÇÃO

Geralmente, o fitoplâncton de água doce é representado pelas algas pertencentes aos Filos Euglenófitas, Crisófitas, Bacilariófitas e Clorófitas (Esteves, 2011).

Algas Verdes (Clorófitas) são o maior e mais variado filo de algas, caracterizadas pela coloração verde, varia de verde amarelado, verde intenso ao acastanhado, atribuída aos pigmentos predominantes clorofila a e b, associada ao carotenoide e a xantofilas. Esses pigmentos são localizados em estruturas denominadas plastos, plastídeos, cloroplastos, ou cromatófaros. São de tamanho, número e formas muito variados, às vezes, característica para cada grupo. O amido que se deposita no plastos em estruturas denominadas pirenoides é

material de reserva. São as que mais se assemelham às plantas superiores, tomando por base os pigmentos fotossintéticos, a estocagem de amido e a organização estrutural dos cloroplastos. Possuem vida livre ou colonial, com flagelos temporários ou ausentes (Haphey-Wood, 1988).

As colônias às vezes estão envoltas por mucilagem e o modo de união das colônias é característico de cada espécie, o que facilita sua identificação; são encontradas em todos os corpos de água doce, ainda que em reduzido número (Haphey-Wood, 1988; Infante, 1988).

O gênero de microalga *Ankistrodesmus*, pertence à divisão *Chlorophyta*, ordem *Chlorococcales*, família *Oocystaceae* e caracteriza-se por ser unicelular, imóvel e não produzir zoósporos. Este gênero apresenta célula alongada e pontiaguda em ambos os polos (Bold e Wynne, 1985). É característica de ambiente eutrófico (Haphey-Wood, 1988) e comum em água e solo, crescendo abundantemente e podendo originar “blooms” ou florescimento, às vezes agregando-se em pequenos grupos (Bold e Wynne, 1985).

O gênero de microalga *Scenedesmus*, pertence à divisão *Chlorophyta*, ordem *Chlorococcales*, classe *Chlorophyceae*, família *Cnedsmaeae*, são indivíduos coloniais que vivem flutuando na água com 2, 4, 8, 16 ou raramente 32 células dentro do cenóbio. Este gênero é o mais comum e o mais cosmopolita dos demais gêneros de algas verdes (Bicudo e Menezes, 2006).

Segundo Esteves (1998), o grupo *Chloropyta* ou algas verdes apresenta clorofila a e b e a classe *Chlorophyceae* possui 8.000 espécies conhecidas, sendo que 90% são de ambientes lacustres, onde é encontrado o gênero *Scenedesmus* e é um dos mais importantes grupos sob o ponto de vista relacionado aos ambientes.

Bicudo e Menezes (2006) relatam que a microalga *Scenedesmus* encontra-se em todos os locais principalmente nos eutróficos, caracterizam-se por possuírem apenas um cloroplastídeo.

O gênero *Volvox*, pertence à divisão *Chlorophyta*, ordem *Volvocales*, classe *Euchlorophyceae*, colônia cenobial de forma esférica, móvel por dois flagelos isocontos (por célula), com numerosas células de forma irregular, semelhantes às *Chlamydomonas*, distribuídas à superfície, possuem uma única camada de células, afastadas, por vezes prolongamentos citoplasmáticos entre

elas e uma bainha gelatinosa. Plasto parietal em taça. As células têm estigma ou mancha ocular, de modo a orientar o movimento da colônia. Reprodução assexuada por gonídeos e reprodução sexuada por oogamia. Organizam-se colônias filhas dentro da colônia mãe (Solari et al., 2008).

## 2.4 PRODUÇÃO E TECNOLOGIA DAS MICROALGAS CONTINENTAIS

As microalgas continentais pertencem a um grupo muito heterogêneo de organismos, predominantemente aquáticos e geralmente microscópicos unicelulares, que podem formar colônia, com pouca ou nenhuma diferenciação celular. São caracterizadas pela presença de pigmentos, responsáveis por variadas colorações e por mecanismo fotoautotrófico. Filogeneticamente, as microalgas são compostas de espécies procarióticas ou eucarióticas, antigas ou mais recentes, conforme o período em que surgiram no planeta (Raven et al., 2001). As microalgas são organismos unicelulares e fotossintéticos, com dimensões que variam entre 2µm a 100µm e que podem estar organizadas em colônias ou células individuais (Coutteau, 1996). Alguns organismos possuem flagelos e utilizam-nos para a locomoção (Graham e Wilcox, 2000).

Para a cultura de organismos de água doce, existe uma carência de tecnologia de produção de fitoplâncton e zooplâncton em larga escala. Porém, foram realizados estudos com enfoque na produção em pequena escala destes organismos (Sipaúba-Tavares, 1988; Sipaúba-Tavares e Rocha, 1993; Sipaúba-Tavares et al., 1994; Sipaúba-Tavares et al., 1999; Hardy e Castro, 2000; Macedo e Pinto-Coelho, 2000 a, b). Conseqüentemente, a falta de tecnologia de produção é limitante para o crescimento do setor (Queiroz et al., 2002).

Em sistemas de água doce, o conhecimento da composição do alimento natural pode fornecer informações sobre as interações competitivas entre as espécies (Kerfoot et al., 1985). Quando por exemplo, o cultivo de fitoplâncton possui alguma limitação de nutriente, ou exposição à radiação UV, estes fatores

poderão afetar a morfologia da célula de algumas espécies, podendo interferir também na digestibilidade do fitoplâncton pelo zooplâncton (Gulati e Demott, 1997).

Geralmente, as clorófitas são selecionadas para o cultivo em massa e utilizadas na alimentação de organismos zooplânctônicos, por apresentar parede celular mais fina e, portanto, em relação ao peso seco, uma quantidade de carbono inorgânico total mais elevado do que as outras algas (Sipaúba-Tavares e Rocha, 2001; Sipaúba-Tavares et al., 2009).

Em cultivos controlados de algas, os meios de cultura oferecem os nutrientes necessários para otimizar o crescimento de cada espécie, sendo o meio e a técnica de cultivo as bases para o estabelecimento da qualidade nutricional da alga. Podendo os nutrientes presentes no meio de cultura estimular ou inibir o crescimento, de acordo com a quantidade de nutrientes disponibilizados (Penteado, 2010).

Para a microalga *Phaeodactylum tricornutum* observou-se que a limitação de nitrogênio aumentou o teor lipídico da biomassa microalgal (Penteado et al., 2009). Podendo alguns nutrientes presentes influenciar na produção de lipídios, tais como nitrogênio e enxofre, por serem utilizados pelas microalgas para síntese de aminoácidos e ácidos graxos (Radman e Costa, 2008).

A obtenção diversificada de uma grande biomassa de microalga de alta qualidade nutricional é primordial na aquicultura. A produção destes organismos é um dos pontos críticos em muitos laboratórios, representando, em alguns casos, mais da metade dos custos totais na produção dos animais cultivados (Nunes, 2005). Comparados ao alimento artificial, verifica-se que os alimentos naturais apresentam maior facilidade de aquisição e de estocagem, além da uniformidade dos ingredientes e agilidade no fornecimento (Radunz-Neto, 2003). Porém, outras possibilidades para dispor do alimento natural estão sendo pesquisadas, por exemplo, a congelação, produção em larga escala de ovos de resistência, secos e em pó (Sipaúba-Tavares e Rocha, 2003).

Na larvicultura de peixes, os experimentos que utilizaram diferentes fontes de alimentos mostram que a utilização de organismos planctônicos de forma isolada ou associada à ração leva a um melhor crescimento e desenvolvimento dos peixes (Sipaúba-Tavares e Rocha, 1993; Sipaúba-Tavares et al., 1999; Faria et al., 2001). Os experimentos em que se substituíram a farinha de peixe por



microalgas demonstraram que a carpa comum e a carpa cabeça grande apresentaram um rendimento maior que o controle (farinha de peixe), enquanto a tilápia e a carpa prateada foram semelhantes ao controle (Venkataraman e Becker, 1985).

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

Dentre alguns meios testados estão o esgoto doméstico esterilizado para o cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* (Pipes e Gotaas, 1960); o extrato de lodo ativado e lodo digerido, acrescentando ou não outros resíduos, como folha de chá e soja (Wong e Lay, 1980); efluentes clarificados de biodigestores alimentados com esterco de suíno para cultivo de *Chlorella pyrenoidosa* (Rodulfo et al., 1980); despejos industriais purificados ricos em nitrogênio para cultivo de *Chlorella vulgaris* (Jusiak et al., 1984).

Interesse especial nos efeitos específicos da qualidade da alga usada como alimento, está sendo demonstrado por trabalhos prévios de Kilhan et al (1997) com relação à condição fisiológica da alga considerado um fator crítico que influencia a ingestão, a fecundidade e as taxas de crescimento populacional de zooplâncton herbívoro.

As clorofíceas *Chlamydomonas globosa* e *Scenedesmus obliquus* têm sido usadas extensivamente como alimento para o zooplâncton e são consideradas um recurso alimentar de alta qualidade (Boersma e Vijverberg, 1996). Entretanto, Brett e Müller-Navarra (1997), verificaram que a variação na qualidade do fitoplâncton como alimento pode estar relacionada à digestibilidade, pois *Chlamydomonas*, que é facilmente digerida, é um alimento de qualidade mais alta, enquanto *S. quadricauda*, que é difícil de digerir, é de qualidade mais baixa. De acordo com os autores acima, há uma hierarquia na qualidade alimentar do fitoplâncton, em que as algas verdes são consideradas de alta qualidade, em alguns casos, e de baixa qualidade em outros.

Ahlgren et al., (1990), estudando o aspecto nutricional de várias algas

planctônicas, verificaram que *S. quadricauda* não favoreceu o crescimento de *Daphnia*. As duas criptofíceas, *Rhodomonas minuta* e *Cryptomonas* sp. foram consideradas os melhores alimentos para os cladóceros. *Daphnia* obteve uma taxa de crescimento positiva em quatro das culturas algais, que foram: *Rhodomonas*, *Cryptomonas*, *Scenedesmus acutus* e *Chlamydomonas*. As diferentes condições de crescimento das mesmas espécies pode ser uma explicação para muitos resultados conflitantes na determinação do valor do alimento para os herbívoros. Ohse et al. (2009), avaliando o crescimento de diferentes microalgas em cultivo autotrófico estacionário, observaram que a única espécie de água doce testada (*Chlorella vulgaris*), apresentou baixo desempenho para todas as variáveis analisadas, tanto a densidade celular máxima e o tempo que leva para ser atingida, bem como a velocidade de crescimento variam muito, mesmo considerando a mesma espécie, e sob as mesmas condições (temperatura, fotoperíodo, intensidade luminosa, composição do meio de cultura, tipo de cultura, entre outros) de cultivo. Infante e Litt (1985), encontraram *Cryptomonas* como o melhor alimento para as espécies *D. pulicaria* e *D. thorata* e sugeriram que as razões pudessem ser as células isoladas, a forma e o tamanho.

Segundo Ahlgren et al. (1992), a composição química das partículas alimentares é provavelmente mais importante do que outros fatores, por exemplo, tamanho da célula ou digestibilidade das paredes celulares, em determinar as taxas de crescimento da população.

As características da composição químicas das microalgas são as mais usadas para verificar a qualidade do alimento para zooplâncton, enquanto os parâmetros demográficos, tais como sobrevivência e reprodução são menos utilizados, apesar deles serem potencialmente mais valiosos, pois refletem a habilidade do alimento em manter o crescimento populacional do consumidor por um longo tempo, se comparados à constituição química e composição elementar em termos de qualidade alimentar. No entanto, há necessidade de estudos comparativos sobre a qualidade nutricional e alimentar do fitoplâncton e a utilização destes recursos por diferentes espécies zooplanctônicas (Chen e Folt, 1993).

O valor nutricional de uma determinada alga como alimento para o zooplâncton pode ser estudado também por meio de variáveis como: taxa de filtração das algas pelo zooplâncton, composição elementar por meio da relação C, N e P das

algas e a constituição química, principalmente lipídios das algas e do zooplâncton, já que estes animais podem possibilitar uma melhoria nutricional do alimento que vai ser oferecido às larvas de peixes (Watanabe et al., 1983, Ahlgren et al., 1990).

Em contraposição, Sterner et al. (1992), afirmam a existência de diversos fatores na dieta que poderiam comprometer severamente a habilidade para determinar o estado nutricional dos animais baseando-se somente no conteúdo lipídico. De acordo com os mesmos autores citados acima, os níveis de lipídios de *Daphnia* podem ser altos ainda quando as taxas de crescimento corporais são baixas, assim, não há certeza que níveis baixos de lipídios sejam realmente indicadores confiáveis da deficiência do alimento.

Segundo Sipaúba-Tavares e Bachion (2001), enfatizaram que a utilização de microalgas, o enriquecimento do alimento e a dieta variada podem influenciar também na composição química do zooplâncton. A composição química do zooplâncton pode variar com as estações do ano e com os níveis de nutrientes na água, como entre as espécies (Kibria et al., 1997; Fábregas et al., 1998).

O zooplâncton é considerado uma fonte valiosa de proteínas, aminoácidos, lipídios, ácidos graxos, minerais e enzimas, sendo um substituto de baixo custo para a farinha de peixe e *Artemia* sp., (Kibria et al., 1997). Entretanto, poucos estudos têm enfatizado a composição química do zooplâncton, principalmente de água doce, sendo vital para avaliar o valor nutricional das espécies e a sua adequação como alimento na aquicultura (Watanabe et al., 1983; Kibria et al., 1997, Thomaz et al., 2004).

Resultados satisfatórios de crescimento populacional estão sendo relacionados a diferentes concentrações de várias espécies de microalgas, capazes de afetar a composição química do zooplâncton (Pozuelo, 1975; Hirayama e Nakamura, 1976; Scott e Baynes, 1978; Rainuzzo et al., 1989 e Carié et al., 1993). De acordo com Macedo e Pinto-Coelho (2000 a), existe necessidade de estudos mais detalhados sobre organismos zooplanctônicos tropicais de água doce, alimentados com alga de origem conhecida com alto valor nutricional para incrementar significativamente o valor nutricional desses animais, os quais são utilizados como alimento para larvas de peixes e alevinos.

Os experimentos realizados com *Daphnia magna* e *D. cucullata* revelaram que, quando alimentadas com algas coloniais e unicelulares, essas espécies não

apresentaram diferenças quanto ao nível proteico, carboidrato ou lipídios. Contudo, um aumento do conteúdo de ácidos graxos pôde ser observado naquelas alimentadas com algas coloniais (Lürling et al., 1997). Já *Diaphanosoma birgei*, quando alimentado com a clorofícea *Ankistrodemus gracilis* apresentou alto valor nutricional quando o alimento era acrescido de vitamina e ração.

A identificação de diversas substâncias sintetizadas pelas microalgas tem aumentado o interesse no seu potencial biotecnológico. Por isso, o cultivo de microalgas tem sido realizado visando à produção de biomassa para uso na alimentação, bem como para obtenção de compostos naturais com alto valor no mercado mundial (Derner, 2006; Ferreira, 2013), considerando a alga na utilização da alimentação de organismos zooplanctônicos como um dos fatores que viabilizam o cultivo em massa desses organismos e, conseqüentemente diminuem a mortalidade de larvas e alevinos de peixes, crustáceos, bivalves e moluscos (Sipaúba-Tavares e Rocha, 1993).

Segundo Ferreira (2013), a importância do metabolismo destes organismos envolve numerosos componentes químicos com interesse em variadas indústrias (cosmética, farmacêutica, nutrição). A plasticidade metabólica de algumas espécies é particularmente importante na capacidade de sintetizar ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), que são benéficos para os animais, (Muller-Feuga et al., 2003). No entanto, diversas espécies de algas continentais não possuem tecnologia de cultivo amplamente difundida, portanto, paralelamente ao melhoramento nutricional do zooplâncton, a difusão das pesquisas de algas de água doce é importante (Elendt, 1989). Corroborando com Rocha e Duncan (1985), que afirmaram a importância do conhecimento das características físicas e químicas das algas de interesse nas pesquisas sobre os elementos inorgânicos que compõem as algas para investigações sobre biogeografia, fisiologia da alga e suas aplicações no setor produtivo de diversas áreas como: nutrição, saúde humana e animal, no tratamento de águas residuais, na produção de energia e na obtenção de compostos de interesse das indústrias de alimento, químicas e farmacêuticas dentre outras (Hou e Yan, 1998; Ferreira, 2013).

### 3. TRABALHOS

#### 3.1 CULTIVO DE *Ankistrodesmus* sp. E *Scenedesmus* sp. UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ADUBOS QUÍMICOS COMERCIAIS EM LABORATÓRIO

*(Preparo de acordo com as normas do Boletim do Instituto de Pesca)*

#### RESUMO

O objetivo neste trabalho foi avaliar o efeito da utilização de três tipos de adubos comerciais (N-P-K) em diferentes concentrações e solubilizações em água destilada (1g, 5g e 10g L<sup>-1</sup>) avaliando a taxa de crescimento dos meios cultivados e o valor nutricional das microalgas em cultivo misto *Ankistrodesmus* sp e *Scenedesmus* sp. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial completo 3<sup>3</sup>, em triplicata. Como adubos

comerciais à base de N-P-K, foram testados os seguintes fertilizantes: Adubo1 (25-05-15) + 11% de S (enxofre) (Solução de 1g L<sup>-1</sup>) (T1); (Solução de 5g L<sup>-1</sup>) (T2); (Solução de 10g L<sup>-1</sup>) (T3); Adubo2 (15-09-12) granulado de liberação lenta (Solução de 1g L<sup>-1</sup>) (T4); (Solução de 5g L<sup>-1</sup>) (T5); (Solução de 10g L<sup>-1</sup>) (T6); Adubo3 (18-18-18) (Solução de 1g L<sup>-1</sup>) (T7); (Solução de 5g L<sup>-1</sup>) (T8) e (Solução de 10g L<sup>-1</sup>) (T9). Os resultados do crescimento do número de células mL<sup>-1</sup> da microalga *Ankistrodesmus* sp., analisados pelo teste de Tuckey demonstraram diferença significativa (P>0,05) entre os tratamentos cultivados com o fertilizante (25-05-15) + 11% de S (enxofre). O T3 (Solução de 10g L<sup>-1</sup>) apresentou melhor desempenho no crescimento das células, enquanto o T1 (Solução de 1g L<sup>-1</sup>) foi considerado intermediário e o T2 (Solução de 5g L<sup>-1</sup>) apresentou o pior desempenho com relação ao desenvolvimento da microalga do gênero *Ankistrodesmus* sp., A microalga *Scenedesmus* sp., obteve melhores resultados do crescimento do número de células mL<sup>-1</sup> com os fertilizantes comerciais (15-09-12) granulado de liberação lenta e (18-18-18) (Solução de 1g L<sup>-1</sup>). Analisados pelo teste de Tuckey não demonstraram diferenças significativas (P<0,05) entre os tratamentos. Portanto, os resultados constataram que o crescimento celular e o bom estado nutricional das microalgas *Ankistrodesmus* sp., e *Scenedesmus* sp., nas condições experimentais adotadas, sob o efeito dos fertilizantes comerciais testados alcançaram altas densidades em um curto espaço de tempo e possivelmente menores custos de produção.

Palavras-chave: Cultivo misto, microalgas, fertilização, N-P-K.

## ABSTRACT

GROWING *ANKISTRODESMUS* SP. AND *SCENEDESMUS* SP. LABORATORY USING DIFFERENT CONCENTRATIONS OF CHEMICAL FERTILIZERS BUSINESS

The objective of this study is the effect of using three kinds of commercial fertilizers (N-P-K) and solubilizations at different concentrations in distilled water (1g, 5g and 10g L<sup>-1</sup>) evaluating the growth rate of the cultured media and the nutritional value of evaluation was microalgae cultivation in mixed *Ankistrodemsus sp.* and *Scenedesmus sp.* The experimental design was completely randomized full factorial 3<sup>3</sup>, in triplicate. As commercial-based N-P-K fertilizers, the following fertilizers were tested: Fertilizer1 (25-05-15) + 11% S (sulfur) (Solution 1g L<sup>-1</sup>) (T1); (Solution 5g L<sup>-1</sup>) (T2); (Solution 10g L<sup>-1</sup>) (T3); Fertilizer2 (15-09-12) granular slow release (Solution 1g L<sup>-1</sup>) (T4); (Solution 5g L<sup>-1</sup>) (T5); (Solution 10g L<sup>-1</sup>) (T6); Fertilizer3 (18-18-18) (solution of 1 g L<sup>-1</sup>) (T7); (Solution 5g L<sup>-1</sup>) (T8) and (Solution 10g L<sup>-1</sup>) (T9). The results of the growth in the number of cells mL<sup>-1</sup> of microalgae *Ankistrodemsus sp.* Analyzed by Tukey test showed significant differences (P< 0.05) between treatments grown with fertilizer (15-05-25) + 11% S (sulfur). T3 (Solution 10g L<sup>-1</sup>) performed better on cell growth, while T1 (Solution 1g L<sup>-1</sup>) was considered intermediate and T2 (Solution 5g L<sup>-1</sup>) had the worst performance with respect to the development of microalgae of the genus *Ankistrodemsus sp.*, The microalga *Scenedesmus sp.*, performed better growth in the number of cells mL<sup>-1</sup>, with the commercial granular fertilizer (15-09-12) and slow release (18-18-18) (Solution 1g L<sup>-1</sup>). Analyzed by Tukey test showed no significant differences (P> 0.05) between treatments. Therefore, the results found that cell growth and good nutritional status of microalgae *Ankistrodemsus sp.*, and *Scenedesmus sp.*, The experimental conditions adopted, the effect of the tested commercial fertilizers reached high densities in a short time and possibly lower production cost.

Keywords: mixed crops, microalgae, *Ankistrodemsus sp.*, *Scenedesmus sp.*, fertilization, N-P-K.

## INTRODUÇÃO

A obtenção diversificada de uma grande biomassa de microalga de alta qualidade nutricional é primordial na aquicultura. A produção destes organismos é um dos pontos críticos em muitos laboratórios, representando, em alguns casos, mais da metade dos custos totais utilizados na produção dos animais (Nunes, 2005). Comparadas ao alimento artificial, verifica-se que a alimentação natural (fitoplâncton) apresenta maior facilidade de aquisição e de estocagem, além da uniformidade dos ingredientes e agilidade no fornecimento (Radunz-Neto, 2003). Porém, outras possibilidades para dispor do alimento natural estão sendo pesquisadas, por exemplo, a congelação, a produção em larga escala de ovos de resistência, secos e em pó (Sipaúba-Tavares e Rocha, 2003).

No intuito de selecionar espécies de microalgas como fonte de alimento na aquicultura, muitas espécies foram e continuam sendo estudadas. As preferidas são aquelas que reúnem qualidades ideais de nutrição, de digestibilidade e que apresentem tamanhos celulares compatíveis com a espécie criada nos seus diferentes estágios de desenvolvimento, e que suportem as condições de cultivo (Silva et al., 2004). Toda cultura de microalgas objetiva a maximização da conversão da eficiência fotossintética para um ótimo de produção de material orgânico (MC Kim e Durnford, 2006).

De acordo com Bachion (1996), o estudo da nutrição de organismos planctônicos em laboratório fornece subsídio para produção em larga escala. O conhecimento da biologia, assim como da influência de fatores como temperatura e tipo de alimento sobre o crescimento populacional e valor nutricional do zooplâncton permitem a manipulação das condições de cultivo, garantindo o sucesso das culturas de plâncton. Um dos principais obstáculos do cultivo laboratorial e em massa de microalgas para alimentação de organismos aquáticos é o custo dos reagentes químicos necessários à preparação dos meios de cultivo. Assim, meios alternativos de baixo custo podem ser a solução para a produção em larga escala de microalgas com valor nutricional adequado para alimentação de invertebrados e larvas de peixes (Sipaúba-Tavares e Rocha, 1993; Sipaúba-Tavares e Braga, 1999; Hardy e Castro, 2000; Adamsson, 2000; Thomaz et al.,



2004; Knuckey et al., 2006; Sipaúba-Tavares et al., 2009).

Em laboratório, são vários os meios alternativos para o cultivo de microalgas, e todos foram desenvolvidos com a finalidade de diminuir os custos na produção. Nesta condição, é possível obter organismos com alto valor nutricional em curto espaço de tempo e viáveis com relação ao custo de produção (Thomaz et al., 2004a e Thomaz et al., 2004b).

Neste contexto, produzir alimento natural requer técnicas e manejos adequados para desenvolver um produto de alto valor nutricional e preferencialmente de baixo custo de produção (Thomaz et al., 2004a; Thomaz et al., 2004b). Portanto, há a necessidade de pesquisas visando o desenvolvimento e, principalmente, ao aperfeiçoamento dos sistemas de cultivo conhecidos. Essas pesquisas, também, se fazem necessárias à identificação dos produtos que podem ser extraídos das microalgas de água doce, da possível atividade biológica (estudos metabólicos e toxicológicos) e do desenvolvimento de mercados específicos para estes. Assim, torna-se necessário alcançar uma tecnologia de produção adequada aos sistemas artificiais além do conhecimento da biologia e do valor nutricional dos organismos produzidos, para obter êxito na produção (Sipaúba-Tavares e Braga, 2007; Sipaúba-Tavares e Pereira, 2008).

Dentre as microalgas de água doce cultivadas, as unicelulares da classe Chlorophyceas têm sido amplamente utilizadas na alimentação de organismos planctônicos e larvas de peixes, principalmente *Ankistrodesmus* sp. e *Scenedesmus* sp., demonstrando grande aceitação por organismos aquáticos, devido ao tamanho, à forma, à espessura da parede celular e à fácil captura (Hardy e Castro, 2000; Sipaúba-Tavares e Bachion, 2002; Sipaúba-Tavares e Braga, 2007; Sipaúba-Tavares et al., 2009).

No presente trabalho, foram desenvolvidos cultivos mistos de *Ankistrodesmus* sp. e *Scenedesmus* sp., em laboratório, objetivando avaliar o efeito de três adubos comerciais em diferentes quantidades solubilizadas em água destilada dos diferentes meios comerciais de N-P-K no crescimento e valor nutricional das microalgas de água doce testadas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### LOCALIZAÇÃO E GRUPOS EXPERIMENTAIS

O experimento foi realizado no Laboratório de Ecologia Aquática e Produção de Plâncton (LEAPP) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (Ifes) - *Campus de Alegre*. O experimento foi realizado no período de agosto a setembro de 2012, utilizando-se as microalgas *Ankistrodesmus* sp., *Scenedesmus* sp., coletadas dos viveiros de piscicultura do Ifes e posteriormente, cultivadas no LEAPP-Ifes/*Campus de Alegre*, Alegre, ES, Brasil, em sistema de cultivo estático não-axênico, com aeração constante. A temperatura manteve-se a  $27 \pm 2,0$  °C, em regime de luz D light a  $64,75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a  $74 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e iluminação contínua. O pH apresentou variação média de 7,0 a 7,2. O oxigênio manteve-se sempre próximo à saturação (7,5- 8,0 ppm). Portanto, os valores destes parâmetros foram mantidos dentro da faixa considerada adequada para o bom desenvolvimento de cultivo da microalga, (Albanez e Matos, 2007; Proença e Bittencourt, 1994; Sipaúba-Tavares, 1995; Ono e Kubitza, 2003; Brasil, 2005).

O Laboratório de Ecologia Aquática e Produção de Plâncton (LEAPP) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (Ifes) - *Campus de Alegre*, Fazenda Caixa D'Água, distrito de Rive, tendo como coordenadas geográficas  $20^{\circ} 25' 51''\text{S}$  de latitude, longitude de  $41^{\circ}27' 24''\text{W}$ , altitude de 136,82 m com precipitação média anual de 1.250 mm. Segundo a classificação de Köppen, o clima é do tipo Awa, com temperatura média anual de 26°C.

Foi avaliado o efeito da utilização de três tipos de adubos comerciais (N-P-K) sobre o crescimento celular e valor proteico (proteína bruta) no cultivo misto das microalgas *Ankistrodesmus* sp. e *Scenedesmus* sp. Três meios de cultivo comercial foram utilizados, e elaborados no LEAPP a base de N-P-K em diferentes soluções diluídas em 1L de água destilada (1g, 5g e 10g de adubo L<sup>-1</sup>) no momento do uso.

N-P-K (25-05-15) + 11% de S (enxofre) no grânulo que envolve o nitrogênio (granulado de liberação lenta), a fonte de nitrogênio (uréia), a fonte de fósforo, o

fosfato monoamônico (MAP) e o potássio (cloreto de potássio).

N-P-K (15-09-12) granulado de liberação lenta + micronutrientes: Mg= 1%; S= 2,3%; Cu= 0,05%; Fe= 0,45%; Mg= 0,06% e Mo= 0,02%, sendo a fonte de nitrogênio a ureia, fonte de fósforo o fosfato monoamônico (MAP) e o potássio (cloreto de potássio).

N-P-K (18-18-18) solúvel completo + micronutrientes: Fe= 0,14%; B= 0,05%; Cu= 0,02%; Mn= 0,08%; Mo= 0,008%; Zn= 0,05%, fonte de nitrogênio 9,8% de Nitrogênio Nítrico e 8,2% Nitrogênio Amoniacal. 18% Fósforo ( $P_2O_5$ ) e 18% Potássio ( $K_2O$ ).

Por meio de ensaios preliminares, e em função do melhor desempenho das microalgas estudadas foi escolhida a quantidade de 50,0 mL de solução de N-P-K. Foram testados os seguintes tratamentos: Adubo1 (25-05-15) + 11% de S (enxofre) (Solução de  $1g L^{-1}$ ) (T1); (Solução de  $5g L^{-1}$ ) (T2); (Solução de  $10g L^{-1}$ ) (T3); Adubo2 (15-09-12) granulado de liberação lenta (Solução de  $1g L^{-1}$ ) (T4); (Solução de  $5g L^{-1}$ ) (T5); (Solução de  $10g L^{-1}$ ) (T6); Adubo3 (18-18-18) (Solução de  $1g L^{-1}$ ) (T7); (Solução de  $5g L^{-1}$ ) (T8) e (Solução de  $10g L^{-1}$ ) (T9), em triplicata.

## PERÍODO PRÉ-EXPERIMENTAL

### **Preparação das soluções com fertilizantes**

Foram testados os seguintes fertilizantes: Adubo comercial 1 (em concentração de 1g, 5g e 10 g de adubo  $L^{-1}$ ) na formulação N-P-K de (25-05-15) + 11% de S (enxofre) mistura de grânulos, Adubo comercial 2 (em concentração de 1g, 5g e 10g de adubo  $L^{-1}$ ) na formulação N-P-K de (15-9-12) granulado de liberação lenta e Adubo comercial 3 (em concentração de 1g, 5g e 10g de adubo  $L^{-1}$ ) na formulação N-P-K de (18-18-18). Os adubos foram pesados em balança digital em 1g, 5g e 10 g dos adubos comerciais experimentados, macerados e dissolvidos em um litro de água destilada (Figura 1). Posteriormente as soluções foram acondicionadas em recipientes com capacidade de 1L devidamente tampadas e conservadas em temperatura ambiente.



Figura 1 – Amostra dos adubos acondicionados após maceração em recipientes com capacidade de 1L.

## PERÍODO EXPERIMENTAL

### Inoculação e manutenção dos cultivos

A partir de inóculos de *Ankistrodesmus* sp., e *Scenedesmus* sp., obtidos junto ao Laboratório de Ecologia Aquática e Produção de Plâncton (LEAPP) do Ifes – *Campus de Alegre*, em 2012. Cultivos dessas microalgas foram mantidos em garrafas de vidro com volumes de 5L cultivados como estoque, em 8 garrafas de vidro, que foram adubadas pelos adubos químicos comerciais utilizados respectivamente nas concentrações testadas (Figura 2 e Tabela 1). Os cultivos permaneceram em temperatura ambiente, em estante iluminada por lâmpadas fluorescentes (intensidade luminosa entre  $64,75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a  $74 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , com iluminação contínua), utilizando-se aeração constante nos recipientes com volumes de 5L. Quando apresentavam coloração verde intensa, eram utilizados como inóculos para o início dos experimentos, sendo essa etapa caracterizada de cultivo estoque (Figura 2).



Figura 2 - Cultura estoque das algas microscópicas continentais clorofíceas *Ankistrodesmus* sp. e *Scenedesmus* sp.

Os cultivos foram iniciados em laboratório em Erlenmeyer com capacidade para 1000 mL, acrescentando-se 50 mL das formulações de adubo comercial N-P-K, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Quantidade de adubos químicos comerciais utilizados no preparo dos meios de cultura para as algas *Ankistrodesmus* sp. e *Scenedesmus* sp.

ADUBO (N-P-K)	CONCENTRAÇÃO (g)	DISSOLUÇÃO (L)
25-05-15	1	1,0
	5	1,0
	10	1,0
15-09-12	1	1,0
	5	1,0
	10	1,0
18-18-18	1	1,0
	5	1,0
	10	1,0

A inoculação das células algáceas nos recipientes de cultivo foi realizada através da transferência das algas previamente cultivadas em garrafas de vidro “Pyrex”, com capacidade para 5L, para recipientes com capacidade de 1000 mL,

contendo 150 mL de inóculos de *Ankistrodesmus* sp. e *Scenedesmus* sp., e 800 mL de água destilada, em seguida foram adicionados 50 mL dos adubos testados, completando-se desta forma o volume total dos recipientes. O experimento foi desenvolvido em triplicata durante 15 dias (Figura 3).



Figura 3 – Aspecto dos bioensaios das algas microscópicas continentais clorofíceas *Ankistrodesmus* sp. e *Scenedesmus* sp.

Os bioensaios foram colocados sobre prateleiras com lâmpadas fluorescentes de 40W, sob luz contínua. A temperatura da sala foi mantida em 30°C e cada unidade experimental recebeu aeração constante, para as microalgas não se depositarem no fundo por meio de “aerador de aquário” e mangueiras plásticas 3/16”, providas de pedras porosas em suas extremidades, de modo a homogeneizar a distribuição dos raios luminosos e facilitar a absorção dos nutrientes dissolvidos no meio de cultura pelas células algáceas (Figura 4).

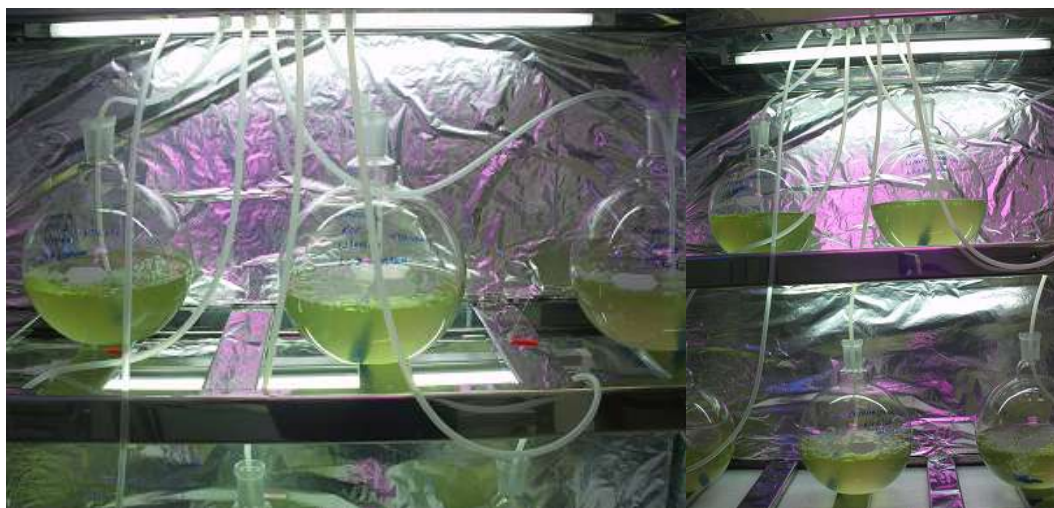


Figura 4 - Aspectos dos bioensaios experimentais em prateleiras das microalgas continentais clorofíceas *Akistrodesmus* sp. e *Scenedesmus* sp.

A temperatura foi monitorada diariamente, com o auxílio de termômetro e o crescimento celular foi avaliado por meio de contagens diárias com o auxílio da câmara de Neubauer e do microscópio de luz. O total foi expresso em números de células  $\text{mL}^{-1} \times 10^x$  estabelecendo-se a curva de crescimento da alga dos gêneros *Ankistrodesmus* sp e *Scenedesmus* sp., avaliando o crescimento populacional em cada unidade experimental

### **Acompanhamento do desenvolvimento**

O monitoramento da cultura foi realizado a partir de 24 horas após a inoculação, por contagens de células com câmara de Neubauer, retirando-se de cada unidade experimental amostras de 3 mL diariamente, ao longo de 15 dias, para avaliação do crescimento populacional, sendo estas alíquotas previamente fixadas com solução de lugol 1% e guardadas em frascos de vidro com tampa, retirando-se dessas alíquotas, duas subamostras de  $1 \mu\text{m L}^{-1}$ , sendo as amostras contadas sob microscópio biológico de luz direta, com aumento de 400x, em câmara de Neubauer (Figura 5). Através desta contagem, estabeleceu-se a curva de crescimento de cada microalga. O total foi expresso em números de células  $\text{mL}^{-1} \times 10^x$  estabelecendo-se as curvas de crescimento do cultivo misto das microalgas dos gêneros *Ankistrodesmus* sp e *Scenedesmus* sp. O experimento foi finalizado no 15º dia de desenvolvimento da cultura, perfazendo 14 dias de contagens.



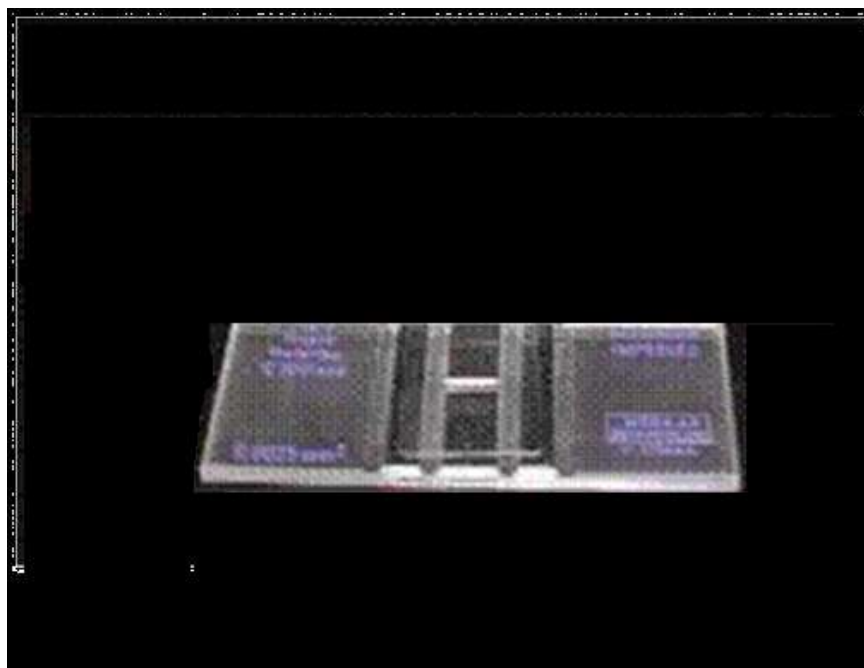


Figura 5 – Câmara de Neubauer (hemocitômetro) usada na contagem celular de *Akistrodesmus* sp. e *Scenedesmus* sp., durante a realização do experimento

Fórmula de contagem para determinação do crescimento populacional:

$$D \text{ (células mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{contagem total} \times 10^4}{\text{N}^\circ \text{ blocos contados}}$$

### **Análise de Proteína Bruta**

No Laboratório de Bromatologia do Ifes – *Campus de Alegre*, foi realizada a análise do teor proteico total na biomassa seca das microalgas dos gêneros *Ankistrodesmus* e *Scenedesmus*, em cada tratamento através do método clássico de KJELDHAL, adotando-se o fator de correção de 6,25 para a conversão a partir dos teores de nitrogênio total (OFFICIAL METHODS OF FOOD ANALYSIS, 1984). Em seguida, em aparelho destilador de nitrogênio, adicionou-se hidróxido de sódio no tubo proveniente da digestão, para alcalinização do meio, e, desta forma, o sal de amônio é convertido à amônia, que é destilada para uma solução saturada de ácido bórico. Posteriormente, titulou-se essa solução com ácido clorídrico 0,01N padrão.



Para quantificar a concentração de nitrogênio, utilizou a fórmula proposta por (Tedesco et al., 1995):

$$\text{Proteína bruta (\%)} = [(V_a - V_b)/P] \times F \times N \times 6,25 \times 0,014 \times 100$$

Onde:

V<sub>a</sub>= volume de HCL 0,01 N utilizado na titulação;

V<sub>b</sub>= volume de HCL 0,01 N consumido pela prova em branco;

F= fator de correção do HCL 0,01N;

N= normalidade;

6,25= fator de transformação do nitrogênio em proteína, (considerando 16% nitrogênio);

0,014= miliequivalente grama do nitrogênio;

P= peso da amostra em g.

### **Delineamento experimental e análise estatística**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, distribuído em esquema fatorial 3<sup>3</sup>, onde foram testados três adubos comerciais em três diferentes concentrações diluídas em água destilada (1g, 5g e 10g) dos adubos experimentais no cultivo misto das microalgas *Ankistrodesmus* sp e *Scenedesmus* sp., em triplicata perfazendo 27 unidades amostrais.

Os dados obtidos foram analisados por meio do teste de Tuckey em 5% de probabilidade com o auxílio do software SISVAR 5.3 (Build 77), (Ferreira, 2011). Os gráficos foram realizados por meio do Sigma Plot 10.0 e do Excel 2007.

## RESULTADOS

O desempenho de cada gênero de microalga variou de acordo com o fertilizante utilizado, observado nas figuras (6, 7, 8, 9, 10 e 11) e tabelas (2, 3, 4, 5, 6 e 7) a seguir:

### CRESCIMENTO CELULAR DA MICROALGA *Ankistrodesmus* sp

Foi observado que as curvas de crescimento através do número de células  $\text{mL}^{-1}$  da microalga *Ankistrodesmus* sp., nos tratamentos T1 (25-05-15) (solução de  $1\text{g L}^{-1}$ ) e T3 (25-05-15) (solução de  $10\text{g L}^{-1}$ ) entre o 2º e o 4º dia de cultivo foram semelhantes (Figura 6). Posteriormente, verificou-se uma queda no crescimento celular do T1 (25-05-15) (solução de  $1\text{g L}^{-1}$ ), que no 4º dia começou a declinar atingindo a fase de declínio total ao 12º dia de experimentação. O tratamento T3 (25-05-15) (solução de  $10\text{g L}^{-1}$ ) declinando no 8º dia de cultivo e ao 11º dia de cultivo atingindo o declínio total. Já o T2 (25-05-15) (solução de  $5\text{g L}^{-1}$ ) manteve-se com crescimento celular estável, atingindo sua fase final de declínio ao 12º dia de cultivo.

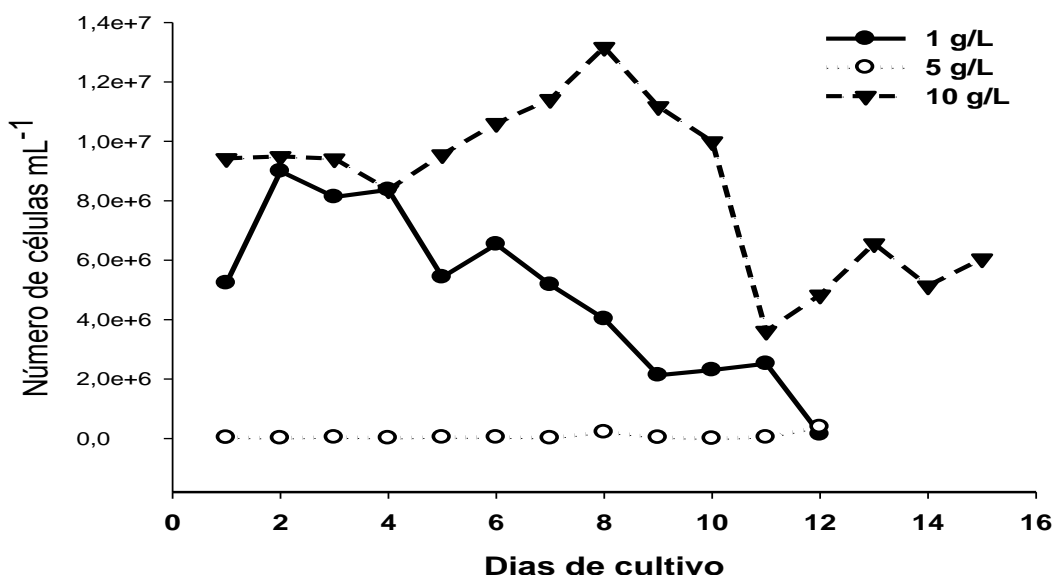


Figura 6 - Curvas de crescimento da microalga *Ankistrodesmus* sp. nos tratamentos T1 (25-05-15) Solução de  $1\text{g L}^{-1}$ , T2 (25-05-15) Solução de  $5\text{g L}^{-1}$  e T3 (25-05-15) Solução de  $10\text{g L}^{-1}$ .

O tratamento T3 ( $10\text{g L}^{-1}$ ) em relação a T1 ( $1\text{g L}^{-1}$ ) e T2 ( $5\text{g L}^{-1}$ ) apresentou diferenças significativas ( $P>0,05$ ) pelo teste de Tuckey (Tabela 2).

Tabela 2 – Número de células da microalga *Ankistrodesmus* sp, submetidas a diferentes quantidades solubilizadas do adubo comercial (25-05-15) + 11% de S (enxofre), aos quinze dias de cultivo

TRATAMENTOS	NÚMERO DE CÉLULAS
T1 (25-05-15) Solução de $1\text{g L}^{-1}$	7,13E+06b
T2(25-05-15) Solução de $5\text{g L}^{-1}$	1,74E+04c
T3(25-05-15) Solução de $10\text{g L}^{-1}$	8,59E+06a

<sup>1</sup> Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tuckey em nível de 5% de probabilidade.

As curvas de crescimento do número de células  $\text{mL}^{-1}$  da microalga *Ankistrodesmus* sp., no tratamento T4 (15-09-12) Solução de  $1\text{g L}^{-1}$  no 2º dia apresentaram um pico de crescimento quando comparadas aos outros tratamentos (Figura 7).

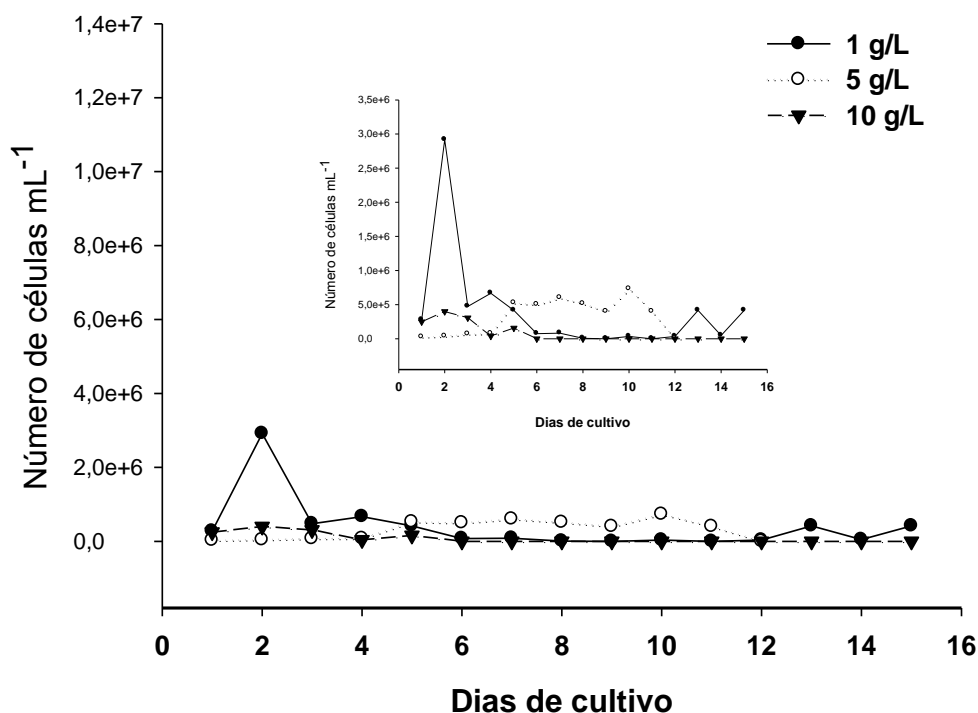


Figura 7- Curvas de crescimento da microalga *Ankistrodesmus* sp., nos tratamentos T4 (15-09-12) Solução de  $1\text{g L}^{-1}$ , T5 (15-09-12) Solução de  $5\text{g L}^{-1}$  e T6 (15-09-12) Solução de  $10\text{g L}^{-1}$ .

Verificando-se uma queda no crescimento celular a partir do 3º dia, atingindo a fase de declínio total ao 6º dia de experimentação, permanecendo

estável, na fase estacionária de crescimento celular até o 15º dia de cultivo, (Figura 7). O T5 (15-09-12) solução de 5g L<sup>-1</sup> manteve-se com crescimento celular na fase estacionária, aumentou o crescimento celular no 5º dia de cultivo e permaneceu oscilando entre declínio e crescimento entre o 8º e 9º dias, atingindo crescimento máximo aos 10 dias e declínio total ao 12º dia de cultivo, (Figura 7). Verificou-se no T6 (15-09-12) solução de 10g L<sup>-1</sup>, crescimento celular nos primeiros 4 dias de cultivo, em seguida declinou no 6º dia, e estabilizou-se na fase estacionária do crescimento celular nos 10 dias finais do experimento.

Realizando-se as análises estatísticas do número de células aos 15 dias de experimentação, verificou-se que não houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ), entre os tratamentos: T4, T5 e T6 pelo teste de Tuckey (Tabela 3).

Tabela 3 – Número de células da microalga *Ankistrodesmus* sp., submetidas a diferentes quantidades solubilizadas do adubo comercial (15-09-12) granulado de liberação lenta, aos quinze dias de cultivo

TRATAMENTOS	NÚMERO DE CÉLULAS
T4 (15-09-12) Solução de 1g L <sup>-1</sup>	1,01E+05a
T5(15-09-12) Solução de 5g L <sup>-1</sup>	4,13E+05a
T6(15-09-12) Solução de 10g L <sup>-1</sup>	9,83E+04a

<sup>1</sup>Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tuckey em nível de 5% de probabilidade.

Nas curvas de crescimento do número de células mL<sup>-1</sup> da microalga *Ankistrodesmus* sp., no tratamento T7 (18-18-18) solução de 1g L<sup>-1</sup> a partir do 2º dia foi superior aos outros tratamentos (Figura 8). Verificou-se uma queda no crescimento celular a partir do 4º dia, atingindo a fase estacionária entre o 4º e 5º dias em seguida pico máximo no crescimento celular no 6º dia e declínio no 8º dia de experimentação, permanecendo instável (declínio) e crescimento celular entre o 8º e 11º dia, atingindo novamente outro pico máximo de multiplicação celular e estabilização até o 13º dia e declínio total ao 15º dia de cultivo. O T8 (18-18-18) solução de 5g L<sup>-1</sup> manteve-se com crescimento celular estável até o 4º dia (fase estacionária), obteve o pico máximo no crescimento celular no 5º dia de cultivo e declínio da população celular no 8º dia, permanecendo em declínio total até o 14º dia de cultivo. Verificando-se no T9 (18-18-18) solução de 10g L<sup>-1</sup> estabilidade na

fase estacionária do crescimento celular algal em todos os dias de experimentação (Figura 8).

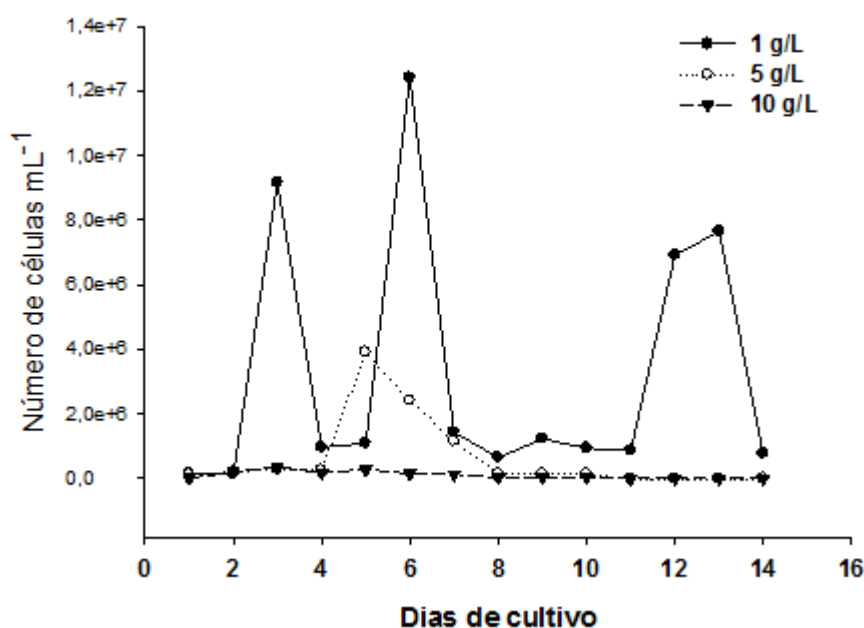


Figura 8 - Curvas de crescimento da microalga *Ankistrodesmus* sp., nos tratamentos T7 (18-18-18) Solução de 1g L<sup>-1</sup>, T8 (18-18-18) Solução de 5g L<sup>-1</sup> e T9 (18-18-18) Solução de 10g L<sup>-1</sup>.

As análises estatísticas do número de células aos 15 dias de experimentação verificaram que não houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ), entre os tratamentos: T7, T8 e T9 pelo teste de Tuckey (Tabela 4).

Tabela 4 – Número de células da microalga *Ankistrodesmus* sp., submetidas a diferentes quantidades solubilizadas do adubo comercial (18-18-18), aos quinze dias de cultivo.

TRATAMENTOS	NÚMERO DE CÉLULAS
T7 (18-18-18) Solução de 1g L <sup>-1</sup>	2,07E+05a
T8(18-18-18) Solução de 5g L <sup>-1</sup>	8,88E+04a
T9(18-18-18) Solução de 10g L <sup>-1</sup>	1,55E+05a

<sup>1</sup>Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tuckey em nível de 5% de probabilidade.

## CRESCIMENTO CELULAR DA MICROALGA *Scenedesmus* sp

As curvas de crescimento do número de células mL<sup>-1</sup> da microalga do gênero *Scenedesmus* sp., observadas na figura 9 submetidas ao tratamento T1 (25-05-15) solução de 1g L<sup>-1</sup>, apresentaram crescimento celular máximo (fase exponencial) no 4º dia, e em seguida declínio a partir do 6º dia de cultivo, apresentando recuperação e pico de crescimento celular entre o 6º e 8º dias de experimento e declínio total do crescimento microalgal no 12º dia de cultivo. O T2 (25-05-15) solução de 5g L<sup>-1</sup> atingiu o pico de crescimento celular (fase exponencial) no 2º dia, posteriormente verificou-se uma queda no crescimento celular no 3º dia de cultivo, oscilando entre declínio e aumento no crescimento celular a partir do 5º ao 11º dia, até o declínio total ao 12º dia de cultivo. Observou-se no T3 (25-05-15) solução de 10g L<sup>-1</sup>, crescimento celular inferior aos demais tratamentos, a sobrevivência atingiu os 15 dias de experimentação.

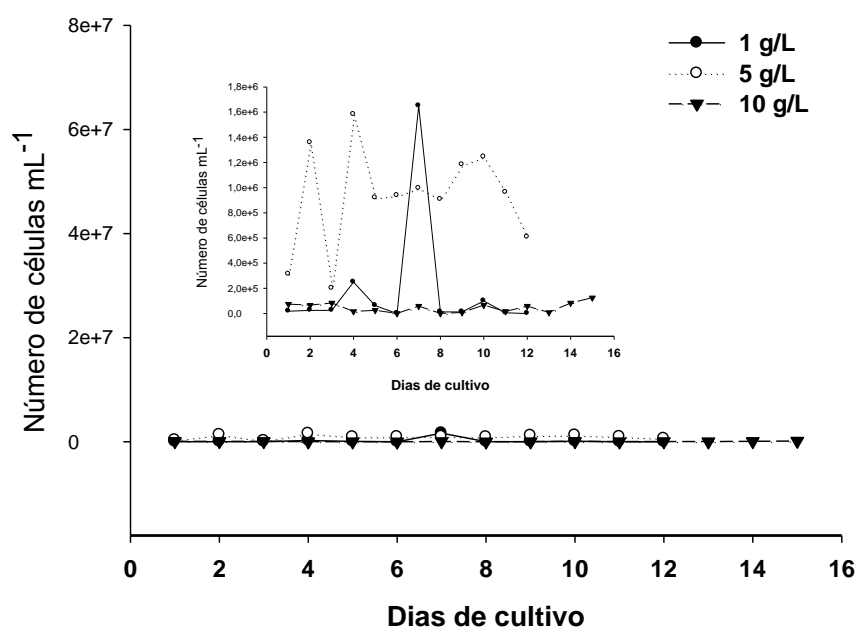


Figura 9 - Curvas de crescimento da microalga *Scenedesmus* sp., nos tratamentos T1 (25-05-15) Solução de 1g L<sup>-1</sup>, T2 (25-05-15) Solução de 5g L<sup>-1</sup> e T3 (25-05-15) Solução de 10g L<sup>-1</sup>.

Realizando-se as análises estatísticas do número de células aos 15 dias de experimentação, verificou-se que não houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ), entre os tratamentos: T1, T2 e T3 pelo teste de Tuckey (Tabela 5).

Tabela 5 – Número de células da microalga *Scenedesmus* sp., submetidas a diferentes quantidades solubilizadas do adubo comercial (25-05-15) + 11% de S (enxofre), aos quinze dias de cultivo.

TRATAMENTOS	NÚMERO DE CÉLULAS
T1 (25-05-15) Solução de 1g L <sup>-1</sup>	8,17E+04a
T2 (25-05-15) Solução de 5g L <sup>-1</sup>	1,06E+06a
T3 (25-05-15) Solução de 10g L <sup>-1</sup>	4,61E+04a

<sup>1</sup>Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tuckey em nível de 5% de probabilidade.

As curvas de crescimento do número de células mL<sup>-1</sup> da microalga do gênero *Scenedesmus* sp., no tratamento T4 (15-09-12) solução de 1g L<sup>-1</sup>, inicialmente foram semelhantes ao T5 (15-09-12) solução de 5g L<sup>-1</sup> e T6 (15-09-12) solução de 10g L<sup>-1</sup>, iniciando diferenciação com relação ao aumento celular microalgal a partir do 6° dia de cultivo. O pico máximo de crescimento (Fase exponencial) ao 7° dia de cultivo, e o declínio no 8° dia de cultivo. Esta tendência se repetiu até o início do declínio no crescimento celular a partir do 12° dia até a estabilização no declínio do crescimento celular ao final do experimento (15 dias). Os tratamentos T5 (15-09-12) solução de 5g L<sup>-1</sup>, e T6 (15-09-12) solução de 10g L<sup>-1</sup>, apresentaram crescimento celular estável (fase estacionária) ao longo de todos os dias de experimentação (Figura 10). Isto pode ser um indicativo de que nestes tratamentos a microalga, não foi satisfeita em termos nutricionais.

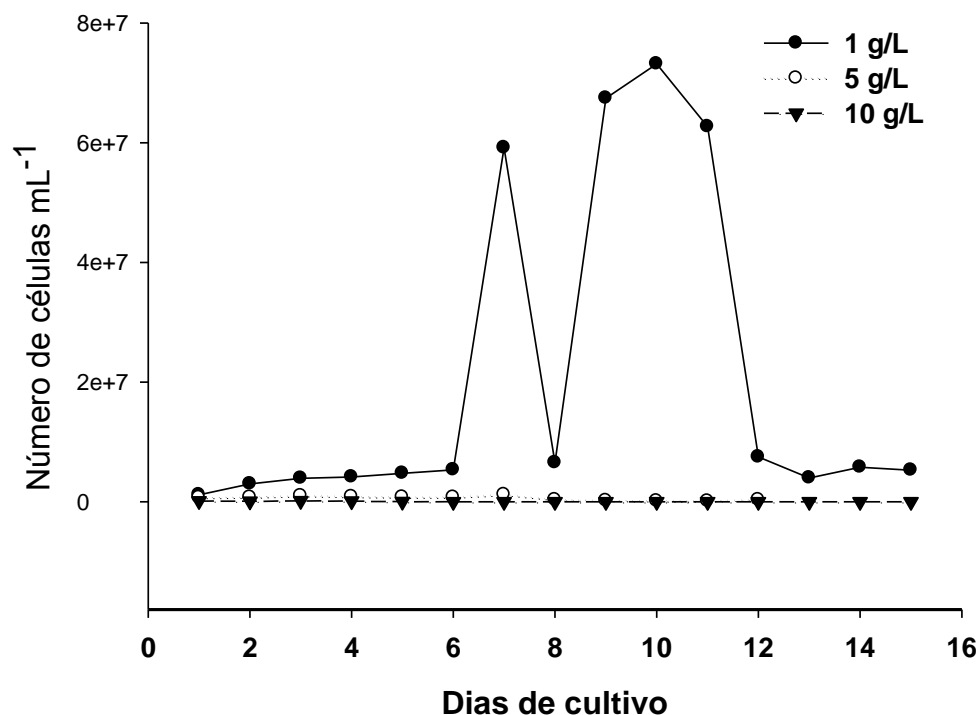


Figura 10 - Curvas de crescimento da microalga *Scenedesmus* sp., nos tratamentos T4 (15-09-12) Solução de 1g L<sup>-1</sup>, T5 (15-09-12) Solução de 5g L<sup>-1</sup> e T6 (15-09-12) Solução de 10g L<sup>-1</sup>.

Analisando-se o número de células aos 15 dias de experimentação, o T4 em relação aos T5 e T6 apresentou diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) pelo teste de Tuckey (Tabela 6).

Tabela 6 – Número de células da microalga *Scenedesmus* sp., submetidas a diferentes quantidades solubilizadas do adubo comercial (15-09-12) granulado de liberação lenta, aos quinze dias de cultivo.

TRATAMENTOS	NÚMERO DE CÉLULAS
T4 (15-09-12) Solução de 1g L <sup>-1</sup>	5,17E+06a
T5(15-09-12) Solução de 5g L <sup>-1</sup>	6,02E+05b
T6(15-09-12) Solução de 10g L <sup>-1</sup>	3,28E+04b

<sup>1</sup>Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tuckey em nível de 5% de probabilidade.

Observa-se na Figura 11 as curvas de crescimento do número de células mL<sup>-1</sup> da microalga do gênero *Scenedesmus* sp., no tratamento T7 (18-18-18) solução de 1g L<sup>-1</sup>, crescimento celular semelhante aos tratamentos T8 (18-18-18) solução de 5g L<sup>-1</sup> e T9 (18-18-18) solução de 10g L<sup>-1</sup>.



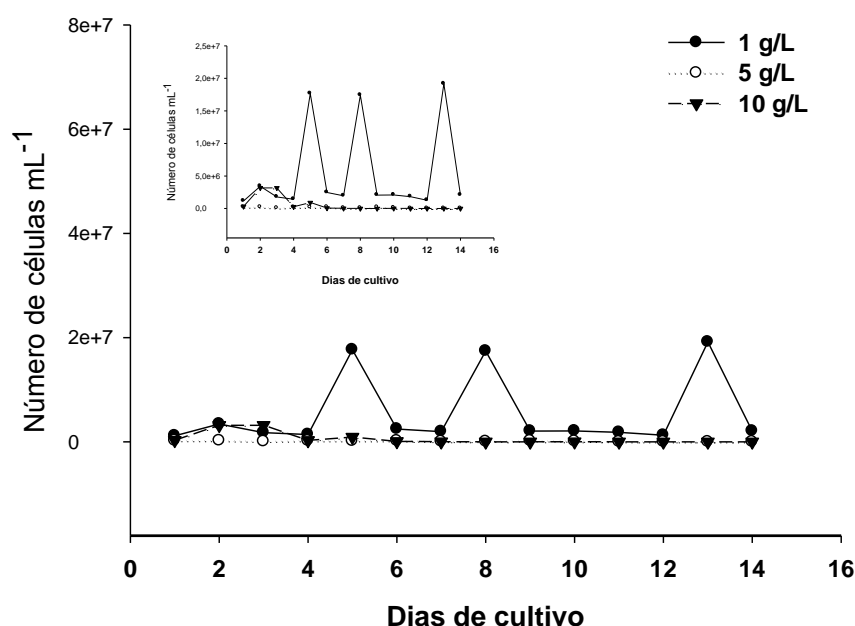


Figura 11 - Curvas de crescimento da microalga *Scenedesmus* sp., nos tratamentos T7 (18-18-18) Solução de 1g L<sup>-1</sup>, T8 (18-18-18) Solução de 5g L<sup>-1</sup> e T9 (18-18-18) Solução de 10g L<sup>-1</sup>.

Com relação ao aumento celular microalgal, houve uma diferenciação nos valores a partir do 5º dia de cultivo, atingindo em seguida o pico máximo de crescimento (fase exponencial), e declínio no 6º dia de cultivo. Esta tendência se repetiu até o início do declínio total no crescimento celular, que foi a partir do 14º dia, até a estabilização no declínio do crescimento celular ao final do experimento (15 dias). Os tratamentos T8 (18-18-18) solução de 5g L<sup>-1</sup> e T9 (18-18-18) solução de 10g L<sup>-1</sup>, apresentaram crescimento celular estável (fase estacionária) ao longo de todos os dias de experimentação. Podendo ser um indicativo de que nestes tratamentos os nutrientes não foram suficientes para o crescimento da microalga *Scenedesmus* sp em estudo.

Analisando-se o número de células aos 15 dias de experimentação, o T7 em relação aos T8 e T9 apresentou diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) pelo teste de Tuckey (Tabela 7).

Tabela 7 – Número de células da microalga *Scenedesmus* sp., submetidas a diferentes quantidades solubilizadas do adubo comercial (18-18-18), aos quinze dias de cultivo.

<b>TRATAMENTOS</b>	<b>NÚMERO DE CÉLULAS</b>
T7 (18-18-18) Solução de 1g L <sup>-1</sup>	1,63E+06a
T8(18-18-18) Solução de 5g L <sup>-1</sup>	1,39E+05b
T9(18-18-18) Solução de 10g L <sup>-1</sup>	1,45E+05b

<sup>1</sup>Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tuckey em nível de 5% de probabilidade.

## DISCUSSÃO

Observando-se a tabela 2, o tratamento T3 (25-05-15) solução de 10g L<sup>-1</sup> apresentou o melhor desempenho no crescimento da microalga *Ankistrodesmus* sp., enquanto o T1 (25-05-15) solução de 1g L<sup>-1</sup> pode ser considerado intermediário para o crescimento microalgal, em relação ao T2 (25-05-15) solução de 5g L<sup>-1</sup>, que apresentou o pior desempenho para o crescimento das células, indicando que no cultivo misto do gênero *Ankistrodesmus* sp., deve ser realizado com o Adubo1 (25-05-15) + 11% de S (enxofre) solução de 10g L<sup>-1</sup> ou (25-05-15) + 11% de S (enxofre) solução de 1g L<sup>-1</sup>.

No cultivo do gênero *Scenedesmus*, as concentrações de T4 (15-09-12) solução de 1g L<sup>-1</sup> e T7 (18-18-18) solução de 1g L<sup>-1</sup> apresentaram o melhor desempenho no crescimento da microalga, ao final dos 15 dias de cultivo, demonstrando diferença significativa (P>0,05) indicada pela análise estatística pelo teste de Tuckey (Tabelas 6 e 7), quando comparado aos tratamentos T5 (15-09-12) solução de 5g L<sup>-1</sup>, T6(15-09-12) solução de 10g L<sup>-1</sup>, T9(18-18-18) solução de 10g L<sup>-1</sup> e T8(18-18-18) solução de 5g L<sup>-1</sup>. Indicando que o cultivo da microalga *Scenedesmus* sp., deve ser realizado pelos Adubo2 (15-09-12) granulado de liberação lenta (solução de 1g L<sup>-1</sup>) e Adubo3 (18-18-18) (solução de 1g L<sup>-1</sup>).

Sipaúba-Tavares e Rocha (1993), Sipaúba-Tavares et al. (1999), Hardy e Castro (2000), também utilizando fertilizantes comerciais N-P-K (20-05-20) como meio de cultivo encontraram resultados satisfatórios como meio alternativo e menos dispendioso para a produção de *Ankistrodesmus gracilis* e *Scenedesmus bijugatus*, alcançando altas densidades e menor custo de produção em um curto espaço de tempo, quando comparados ao meio tradicional CHU<sub>12</sub>. Provavelmente, isso possa estar relacionado com a proporção dos elementos N-P-K que é maior do que outros meios utilizados. Deve-se ainda considerar que o nitrogênio e o fósforo são dois elementos químicos de fundamental importância no cultivo das algas, influenciando diretamente o crescimento do fitoplâncton.

Com relação ao crescimento celular microalgal e o bom estado proteico observados na figura 12, os resultados sugerem que a utilização do adubo comercial N-P-K (25-05-15) + 11% de S (enxofre) solução de 10g L<sup>-1</sup>, para o

gênero *Ankistrodesmus* sp., e a utilização dos fertilizantes comerciais (15-09-12) solução de 1g L<sup>-1</sup> e (18-18-18) solução de 10g L<sup>-1</sup> testados no gênero *Scenedesmus* sp., para a produção em laboratório e, também, em larga escala das microalgas clorofíceas apresentam potencial para a produção e valor nutricional adequado para alimentação de invertebrados e larvas de peixes, crustáceos e bivalves (Sipaúba-Tavares e Rocha, 1993; Sipaúba-Tavares et al., 1999; Hardy e Castro, 2000; Adamsson, 2000; Thomaz et al., 2004; Knuckey et al., 2006; Xu et al., 2006; Sipaúba-Tavares et al., 2009).

O maior desafio dos pesquisadores em algas é a redução dos custos, estabilização e manutenção da qualidade do produto (Brown et al., 1997; Pereira, 2001).

O resultado da análise proteica realizada para as microalgas *Ankistrodesmus* sp., e *Scenedesmus* sp., em cultivo misto aumentou o valor dos teores de Proteína Bruta nos tratamentos T1 (25-05-15) solução de 1g L<sup>-1</sup>, T3 (25-05-15) solução de 10g L<sup>-1</sup>, T4 (15-09-12) solução de 1g L<sup>-1</sup>, T5(15-09-12) solução de 5g L<sup>-1</sup>, T6(15-09-12) solução de 10g L<sup>-1</sup>, T7 (18-18-18) solução de 1g L<sup>-1</sup> e T9 (18-18-18) solução de 10g L<sup>-1</sup>, (Figura 12). Os níveis de proteína foram maiores que os relatados por Lourenço (2006). Corroborando com diversos autores (Sipauba-Tavares e Rocha, 2003; Cabrales e Gonzalez, 2004) que afirmam a necessidade de informações relativas às exigências nutricionais do fitoplâncton dulcícola. Brown et al. (1997), afirmaram que na fase de crescimento, as microalgas apresentam variações na composição química e, na fase estacionária, o nível de proteína é baixo, devido à limitação do nitrogênio. Essa afirmativa atualmente pode ser corrigida nos cultivos controlados, pois os meios de cultura oferecem nutrientes necessários para o crescimento ótimo de cada espécie. As técnicas de cultivo são a base para o estabelecimento da qualidade nutricional das microalgas (Penteado, 2010).

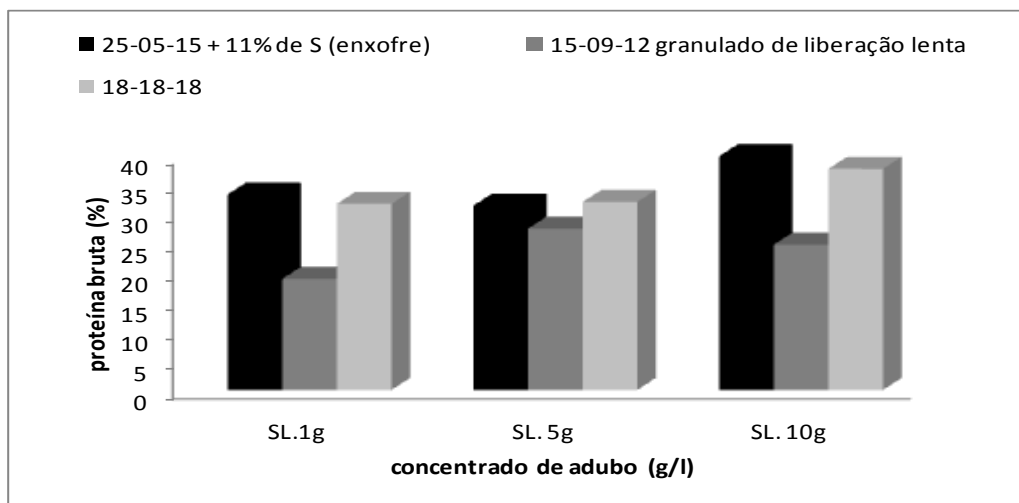


Figura 12 - Análise centesimal da proteína bruta (%) das microalgas *Ankistrodesmus* sp. e *Scenedesmus* sp., submetidas aos diferentes adubos comerciais.

## CONCLUSÕES

As microalgas chlorophyceae *Ankistrodesmus* sp., e *Scenedesmus* sp., adaptaram-se às condições de cultivo misto em laboratório e apresentaram, rápido crescimento, atingindo altas densidades.

A microalga do gênero *Ankistrodesmus* sp., pode ser cultivada com o adubo (25-05-15) + 11% de S (enxofre) solução de 10g L<sup>-1</sup> ou (25-05-15) + 11% de S (enxofre) solução de 1g L<sup>-1</sup>, sem prejuízos no crescimento do número de células.

A microalga do gênero *Scenedesmus* sp., pode ser cultivada com os fertilizantes comerciais (15-09-12) solução de 1g L<sup>-1</sup> e (18-18-18) solução de 1g L<sup>-1</sup>, sem prejuízos no crescimento do número de células.

As microalgas cultivadas de forma mista alcançaram valor nutricional de proteína bruta maior que 30%, sugerindo a utilização direta como alimento para organismos aquáticos.

Os efeitos da utilização de adubos comerciais em diferentes formulações e concentrações solubilizadas em água destilada alcançaram alta densidade celular em um curto espaço de tempo e possivelmente menor custo de produção.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamsson, M. 2000. Potential use of human urine by greenhouse culturing of microalgae (*Scenedesmus acuminatus*), zooplankton (*Daphnia magna*) and tomatoes (*Lycopersicon*). *Ecological Engineering*. 16(2): 243-254.
- Albarez, J. R.; Matos, A. T. Aqüicultura. In: MACEDO, J. A. B. Águas & águas.. 3. ed. Belo Horizonte: CRQ - MG, 2007. (Suplemento)
- AOAC.-(1984), Association of Official Analytical Chemistry, 1984. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 14. ed. Arlington. 1141 p.
- Bachion, M. A. Estudo do crescimento e desenvolvimento de três espécies zooplanctônicas submetidas a diferentes dietas alimentares, Jaboticabal, 1996. (Master Tesis)-Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista.
- Beltrão, M. I. 1992. Cultivo de algas clorofíceas (*Ankistrodesmus densus*, *Chorella vulgaris* e *Scenedesmus bijugatus*) em resíduos líquidos de indústria de suco de laranja concentrado. 1992 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Bertolin, T. B. P.; Costa, J. A. V.; Bertolin, T. E.; Colla, L. M.; Hemkemeier, M. 2005. Cultivo da cianobactéria *Spirulina platensis* a partir de efluente sintético de suíno. *Ciência agrotécnica*, Lavras. 29(1): 118-125.
- BRASIL. Resolução Conama no 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 18 mar. 2005.

- Brown, M. R.; Jeffrey, S. W.; Volkman, J. K.; Dunstan, G. A. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151 (14): 315-331p.
- Cabrales, M. M. Q.; González, M. F. 2004. Utilización de residual aviar como fuente de nutrientes en cultivos de microalgas. *Medisan*, Santiago de Cuba. 8(3): 27-31.
- Ferreira, D. F. 2011 *Sisvar: a computer statistical analysis system*. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*. 35 (6): 1039-1042p.
- Giani, A. 1991. The nutritive value of different algae as food for two *Daphnia* species. *Ver. Internat. Verein. Limnol.* 24: 2788-2791.
- Hardy, E. R.; Castro, J. G. 2000. Qualidade nutricional de três espécies de clorofíceas cultivadas em laboratório. *Acta Amazonica*. 30: 39-47.
- Jussiak, M. P.; Duszota, K.; Mycielski, R. 1984. Intensive culture of *Chlorella vulgaris* as the second stage on biological purification of nitrogen industry wastewater. *Water Research*. 18: 1-7.
- Knuckey, R. M.; Brown, M. R.; Robert, R.; Frampton, D. M. F. 2006. Production of micro-algal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacultural Engineering*. 35: 300-313.
- Lourenço, S. O. 2006. *Cultivo de microalgas marinhas-princípios e aplicações*, Rima Editora, São Carlos, 588p.
- MC Kim e Durnford, D. G. 2006. Translation of light-harvesting complex expression during photo acclimation to high-light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 44: 857-865.



- Meseck, S. L.; Alix, J. H.; Wikfors, G. H. 2005. Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by aquaculture feed microalgae, *Tetraselmis chui* (PLY 429). *Aquaculture*. 246: 393-404.
- Nunes, M. 2005. Avaliação da qualidade de pastas de microalgas produzidas em laboratório de larvicultura de moluscos no Sul do Brasil. 2005. 35 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC.
- Oliveira, H. T. de. 1995. Vinasse as substrate to culture *Chlorella vulgaris*. In: International Workshop on Microalgae and Aquatic Plants Culturing, 1995, Anais..., Habana, Cuba. 40p.
- Ono, E. A. e Kubitzka, F. 2003. Cultivo de peixes em tanques-rede. 3. Ed. Jundiaí: F. Kubitzka, 112p.
- Penteado, D. M. R. Estudos da otimização do meio de cultura para a microalga *Phaeodactylum tricornutum* na produção de lipídios. Curitiba, 2010. 101f. (Dissertação de Pós-Graduação em Bioquímica)-São Carlos, Universidade de São Carlos.
- Pereira, A. M. L. Cultura em larga escala da microalga *Ankistrodesmus gracilis* (REINSCH) KORSIKOV (CHLOROPHYCEAE), e do microcrustáceo *Diaphanosoma birgei* (KORINECK, 1981) (CLADOCERA) em laboratório. Jaboticabal, 2001. 92 f. (Doctoral Thesis)-Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista.
- Pipes, W. O. e Gotaas, H. B. 1960. Utilization of organic matter by *Chlorella* grown in sewage. *Applied Microbiology*. 8: 163-169.
- Proença, C. E. M. E Bittencourt, P. R. L. 1994. Manual de piscicultura tropical. Brasília: IBAMA.

- Radunz Neto, 2003. J. Alimento natural versus ração balanceada na larvicultura de peixes. 2003 Disponível em: <[www.sbz.org.br/eventos/PortoAlegre/homepagessbz/Radunz.htm](http://www.sbz.org.br/eventos/PortoAlegre/homepagessbz/Radunz.htm)>. Acesso em: 13 de junho de 2010.
- Rodolfo, B. R.; Marmol, N. H. R.; Embralino, G. A. 1980. Production of *Chlorella* in clarified effluent from hog manure biogas digester. *Phillipp Journal Science*. 109: 51-58.
- Silva, L. O. B. 2004. Utilização de nitrato de sódio em viveiros de camarão marinho. Recife. 45p. Dissertação de Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, (Departamento de Pesca-UFRPE).
- Sipaúba-Tavares, L. H. e Bachion, M. A. 2002. Population growth and development of two species of cladocera, *Moina micrura* and *Diaphanosoma birgei*, in laboratory. *Braz. Journal Biology*. 62: 701-711.
- Sipaúba-Tavares, L. H. e Braga, F. M. S. 1999. Study on feeding habits of *Piaractus mesopotamicus* (pacu) larvae in fish ponds. *NAGA The ICARM Quarterly*. 22(1): 24-29.
- Sipaúba-Tavares, L. H. e Braga, F. M. S. 2007. Feeding activity of *Colossoma macropomum* larvae (tambaqui) in fishpond with water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) fertilizer. *Braz. Journal Biology*. 67: 459-466.
- Sipaúba-Tavares, L. H. e Pereira, A. M. L. 2008. Large scale laboratory cultures of *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) and *Diaphanosoma birgei* Korinek, 1981 (Cladocera). *Braz. Journal Biology*. 68: 875-883.
- Sipaúba-Tavares, L. H.; Coral Ibarra, L. C.; Fioresi, T. B. 2009. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (REISCH) KORSIKOV (CHLOROPHYTA) em laboratório utilizando meio CHU12 e de macrófita com NPK. *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo*. 35(1): 111-118.

- Sipaúba-Tavares, L. H.; Pelicione, L. C.; Oliveira, A. 1999. Use of organic (NPK) and the CHU12 medium for cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* in laboratory. *Revista Brasileira de Biologia*. 1: 10-15.
- Sipaúba-Tavares, L. H.; Rocha, O. 1993. Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes: I, Algas clorofíceas. *Biotemas*, Florianópolis. 6(1): 93-106.
- Sipaúba-Tavares, L. H.; Rocha, O. 2003. Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes: I – algas clorofíceas. *Biotemas*, Florianópolis. 6(1): 93-106.
- Stein, J. 1973 *Handbook of phycological methods; Culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press. 447p.
- Tedesco, M.J.; Gianello, C.; Bissani, C.A.; Bohnen, H.; Volkweiss, S.J. *Análise de solo, plantas e outros materiais*. 2.ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p.
- Thomaz, L. A.; Oshiro, L. M. Y.; Bambozzi, A. C.; Seixas Filho, J. T. de; Rosadas, L. A. S. 2004a. Substituição de *Artemia* sp. pelo rotífero *Brachionus plicatilis* na larvicultura do camarão-d'água-doce (*Macrobrachium rosenbergii* De Man, 1879). *Revista Brasileira de Zootecnia*. 33(6): 1928-1933.
- Thomaz, L. A.; Oshiro, L. M. Y.; Bambozzi, A. C.; Seixas Filho, J. T. 2004b. Desempenho Larval do Camarão de Água Doce (*Macrobrachium rosenbergii* De Man, 1879) Submetido a Diferentes Regimes Alimentares. *Revista Brasileira de Zootecnia-Brazilian Journal Of Animal Science*, Viçosa-Minas Gerais. 33(6): 1934-1939.
- Wong, M. H.; Lay, C. C. 1980. The comparison of soy-bean wastes, used tea leaves and sewage for growing *Chlorella pyrenoidosa*. *Environ. Pollut.* 23: 247-259.

Xu, H.; Miao, X. L.; Wu, Q.Y. 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J Biotechnol* 126:499–507

### 3.2 CAPACIDADE FOTOSSINTÉTICA E NUTRIÇÃO DA MICROALGA *Volvox* sp., SOB DIFERENTES FERTILIZANTES MINERAIS E ESPECTROS DE LUZ EM LABORATÓRIO

*(Preparo de acordo com as normas do Boletim do Instituto de Pesca)*

#### RESUMO

Objetivou-se neste trabalho testar a influência de dois adubos à base de fertilizantes químicos comerciais N-P-K 15-05-30 (Solução de 10g L<sup>-1</sup>) e 15-09-12 (Solução de 10g L<sup>-1</sup>) granulado de liberação lenta em função do tipo de luz (luz branca, luz azul e luz vermelha) no desenvolvimento da microalga *Volvox* sp., avaliando a taxa de crescimento, o valor proteico, o rendimento quântico máximo do fotossistema II e o índice fotossintético. Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado, distribuído em esquema fatorial completo 2<sup>3</sup>, em triplicata. Foram realizados os seguintes testes: Espectro de luz branca (15-09-12) granulado de liberação lenta solução de 10g L<sup>-1</sup> (T1); Espectro de luz azul (15-09-12) granulado de liberação lenta solução de 10g L<sup>-1</sup> (T2); Espectro de luz vermelha (15-09-12) granulado de liberação lenta solução de 10g L<sup>-1</sup> (T3); Espectro de luz branca (15-05-30) solução de 10g L<sup>-1</sup> (T4); Espectro de luz azul (15-05-30) solução de 10g L<sup>-1</sup> (T5); Espectro de luz vermelha (15-05-30) solução de 10g L<sup>-1</sup> (T6). Os resultados do crescimento do número de células ml<sup>-1</sup> da microalga *Volvox* sp., analisados pelo teste de Tuckey demonstraram diferença significativa (P>0,05) e os tratamentos T2 (15-09-12) Luz azul e T5 (15-05-30) Luz azul apresentaram o melhor desempenho no desenvolvimento da microalga *Volvox* sp., enquanto os T3 (15-09-12) Luz vermelha, T6 (15-05-30) Luz vermelha

e o T1(15-09-12) Luz branca e T4(15-05-30) Luz branca apresentaram o pior desempenho para o crescimento celular (número de células mL<sup>-1</sup>). O rendimento quântico máximo do FSII, representado pela relação Fv/Fm, em todos os tratamentos realizados não apresentou diferença significativa (P<0,05). O PI (Índice fotossintético) para os tratamentos T1 (15-05-30) Luz vermelha, T2 (15-05-30) Luz azul, T3 (15-05-30) Luz branca, T4 (15-09-12) Luz vermelha, T5 (15-09-12) Luz azul e T6 (15-09-12) Luz branca, não apresentou diferença significativa (P<0,05), apresentando valores do índice fotossintético entre 0,06-0,08. Demonstrando diferença significativa (P>0,05) quando realizada a análise estatística pelo teste de Tuckey, entre os tratamentos T4 (15-05-30) Luz branca comparado com os tratamentos T5 (15-05-30) Luz azul e T6 (15-05-30) Luz vermelha. O resultado da análise bromatológica, apresentou teores de Proteína Bruta (PB) elevados nos tratamentos: T3 (15-05-30) Luz branca e T6 (15-09-12) Luz branca. Com relação aos demais tratamentos T1 (15-05-30) Luz vermelha, T2 (15-05-30) Luz azul, T4 (15-09-12) Luz vermelha e T5 (15-09-12) Luz azul, não atingiram o valor de 30% PB. Portanto, os resultados demonstraram que a utilização do adubo comercial (15-05-30) Luz branca (fluxos fotossintéticos da Luz branca) apresentou melhor capacidade fotossintética e estado nutricional no desempenho da microalga *Volvox* sp. Podendo ser utilizado para cultivos deste gênero de microalga.

Palavras-chave: Cultivo, nutrição mineral, capacidade fotossintética, espectros de luz.

#### ABSTRACT

PHOTOSYNTHETIC CAPACITY AND NUTRITION MICROALGAE *VOLVOX* SP., LABORATORY UNDER DIFFERENT MINERAL FERTILIZERS AND FLOWS PHOTON PHOTOSYNTHETIC.

The aim of this work is to test the influence of two fertilizer-based commercial chemical fertilizers NPK 15-05-30 (Solution 10g l<sup>-1</sup>) and 15-09-12 (Solution 10g L<sup>-1</sup>) in granular slow release depending on the type of light (white light, blue light and red light) in the development of microalgae *Volvox sp.* assessing the rate of growth, protein value, maximum quantum efficiency of photosystem II and the photosynthetic rate. A completely randomized experimental design, distributed in 23 full factorial design, was used in triplicate. The following tests were performed: Spectrum of white light (15-09-12) slow release granular solution of 10g L<sup>-1</sup>) (T1); Spectrum grainy blue light (15-09-12) slow release solution of 10g L<sup>-1</sup>) (T2); Spectrum of red light (15-09-12) slow release granular solution 10g L<sup>-1</sup>) (T3); Spectrum of white light (15-05-30) solution of 10g L<sup>-1</sup>) (T4); Spectrum of blue light (15-05-30) solution of 10g L<sup>-1</sup>) (T5); Spectrum of red light (15-05-30) solution of 10g L<sup>-1</sup>) (T6). The results of the growth in the number of cells mL<sup>-1</sup> of microalgae *Volvox sp.* Analyzed by Tukey test showed significant differences (P <0.05) and T2 treatments (15-09-12) Blue Light and T5 (15-05-30) blue light showed the best performance in the development of microalgae *Volvox sp.*, while T3 (15-09-12) red light, T6 (15-05-30) red light and the T1 (15-09-12) white light and T4 (15-05-30) white light showed the worst performance for cell growth (number of cells ml<sup>-1</sup>). The maximum quantum yield of PSII, represented by the Fv / Fm ratio in all treatments showed no significant difference (P> 0.05). The PI (photosynthetic index) for T1 (15-05-30) red light, T2 (15-05-30) Light blue, T3 (15-05-30) White light, T4 (15-09-12) treatments red light, T5 (15-09-12) blue light and T6 (15-09-12) white light, showed no significant difference (P> 0.05), with values of photosynthetic rate between 0.06-0.08. Demonstrating a significant difference (P <0.05) when performed statistical analysis by Tukey test between T4 (15-05-30) White light treatments compared with treatments T5 (15-05-30) Light blue and T6 (15-05-30) red light. The result of the chemical analysis showed high levels of crude protein (CP) in the treatments T3 (15-05-30) White light and T6 (15-09-12) white light. With the other treatments T1 (15-05-30) red light, T2 (15-05-30) Light blue, T4 (15-09-12) Red Light and T5 (15-09-12) Light blue, not amounted to 30% CP. Therefore the results showed that the use of commercial fertilizer (15-05-30) White light (photosynthetic fluxes of white light) showed better photosynthetic

capacity and nutritional status in the performance of microalgae *Volvox sp.*, may be used for cultivation of microalgae in this genre.

Keywords: Cultivation, mineral nutrition, photosynthetic capacity, light spectrums.



## INTRODUÇÃO

O estudo do cultivo de microalgas é importante para incrementar o conhecimento da biologia das diferentes espécies, favorecendo posterior produção em ambientes controlados, onde os meios de cultura oferecem nutrientes necessários para o crescimento ótimo de cada espécie.

O objetivo de toda cultura de microalga é a maximização da conversão da eficiência fotossintética para um ótimo de produção de material orgânico (McKim e Durnford, 2006).

A luz é considerada o principal fator que afeta o crescimento das microalgas em ambientes controlados, porém, fatores físicos e químicos como temperatura e disponibilidade de nutrientes também interferem no seu desenvolvimento (Brown et al., 1997).

As clorofilas estão relacionadas diretamente com a eficiência fotossintética e conseqüentemente com o crescimento e a adaptabilidade aos diferentes ambientes, são os pigmentos responsáveis pela captura de luz utilizada na fotossíntese, sendo primordiais na conversão da radiação luminosa em energia química, na forma de ATP e NADPH, (Jesus e Marengo, 2008).

O teor de clorofila pode estar relacionado à senescência das células microalgais e no teor de nitrogênio considerado de suma importância para os estudos fisiológicos das microalgas (Figueredo et al., 2009).

Segundo Figueredo et al., (2009), durante os eventos fotossintéticos, a energia absorvida que não é usada em reações fotoquímicas pode ser dissipada como fluorescência, que permite obter informações detalhadas sobre a estrutura, distribuição de energia e atividade do aparato fotossintético, do fotossistema II (PSII).

Como qualquer outro processo de troca de energia, a conversão de energia luminosa em energia química no processo fotossintético não é perfeita (Peçanha, 2010). Nem todos os elétrons em seu mais alto nível energético são passados para os aceptores. Retornando ao estado inicial (antes de receber energia dos fótons) sem produção de ATP e NADPH<sub>2</sub>. Quando retornados ao estado inicial, a

energia é dissipada em forma de calor ou luz (fluorescência), constituindo quase toda fluorescência proveniente das moléculas de clorofilas associadas ao PSII (Bolhar-Nordenkampf e Öquist, 1993).

O crescimento das microalgas depende unicamente das propriedades intrínsecas das células algais, quando os fatores em condição de laboratório são adequados como a luz, que atua no metabolismo das microalgas, principalmente na síntese de carboidrato e lipídios (Meseck et al., 2005).

Sendo importante enfatizar a importância da relação entre fluorescência variável com a fluorescência máxima ( $F_v / F_m$ ), considerada uma medida da eficiência intrínseca ou máxima do PSII. Esta relação mede a eficiência quântica de todos os centros do PSII. Esta variável indica a probabilidade do elétron absorvido pelos pigmentos fotossintéticos do PSII reduzir quinona A (QA) (Krause e Weis, 1991), sendo correlacionada com o rendimento quântico do processo fotossintético (Kao e Forseth, 1992).

Em ambientes que não causam modificações na relação  $F_v / F_m$ , pode-se utilizar o índice fotossintético ou “Photosynthetic Index” (PI), demonstra a atividade do fotossistema I e II (Strasser et al., 2004). É uma variável mais completa no estudo do aparato fotoquímico.

A possibilidade de indicar um efeito fotoinibitório nas plantas pode ser mais eficaz segundo Strasser et al. (1995), fornecendo um grande número de variáveis que caracterizam a amostra fotossintética, mais vantajosa também por indicar precocemente possíveis estresses nas plantas antes que o sintoma do estresse seja exteriorizado (Christen et al., 2007).

Neste contexto, tal método foi considerado uma ferramenta prática, para obtenção de informações rápidas sobre várias possibilidades de efeitos sobre a capacidade fotossintética, em particular sobre o PSII, e para uma extensão limitada do PSI (Stirbet e Govindjee, 2011).

Dessa forma, em virtude de qualquer fator biótico ou abiótico, estudar as respostas da planta por meio do uso da emissão da fluorescência da clorofila tem sido uma prática bastante eficiente na avaliação do processo fotoquímico da fotossíntese (Ribeiro, 2012).

Na aquicultura, o aspecto mais importante do cultivo de microalgas concentra-se na sua utilização como alimento para uma grande variedade de

organismos aquáticos cultivados em nível comercial ou experimental (Hoff e Snell, 1987; Barbieri e Ostrensky, 2001; Maximiniamo et al., 2002). Em função dos custos de produção poder chegar a 30% do total da operação. Alternativas para a redução do custo, mantendo a qualidade do produto final com valor nutricional compatível e facilidade de cultivo em grande escala, têm gerado a busca por pesquisas que produzam algas de qualidade e quantidade adequadas para posterior uso na aquicultura (Thomaz et al., 2004).

A utilização de meio de cultivo para microalga clorofícea à base de fertilizante químico N-P-K (15-05-30) e N-P-K (15-09-12) associado com o tipo de luz adequada, pode servir como ferramentas para o melhor desenvolvimento e crescimento das microalgas. Tal ação pode reduzir custos, uma vez que apresenta quantidades inferiores utilizadas de N-P-K quando previamente preparado de maneira adequada podendo apresentar concentrações suficientes de nitrogênio, fósforo e potássio (Thomaz et al., 2004; Sipaúba-Tavares e Braga, 2007).

Ante ao exposto, objetivou-se avaliar o crescimento, o valor nutricional e a capacidade fotossintética da microalga *Volvox* sp., em dois diferentes fertilizantes químicos comerciais associados a três tipos de espectros de luz (fluxos de fótons fotossintéticos).

## MATERIAL E MÉTODOS

### LOCALIZAÇÃO E GRUPOS EXPERIMENTAIS

O experimento foi realizado no Laboratório de Ecologia Aquática e Produção de Plâncton (LEAPP) do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (Ifes). O Campus de Alegre localiza-se no km 40 da Rodovia Cachoeiro-Alegre, na Fazenda Caixa-D'Água, Distrito de Rive, Município de Alegre, ES. As temperaturas médias (máxima e mínima) do município giram em torno de 29,7 °C e 18,5 °C, respectivamente, sendo a média anual de 23,4°C. A precipitação pluviométrica anual é da ordem de 1325,9 mm, com 233,0 mm no período seco (maio a setembro) e 1092,9mm no período chuvoso (outubro a abril). A espécie microalgal utilizada foi a *Volvox* sp., proveniente do Setor de Piscicultura, com trinta e seis viveiros escavados, totalizando 4 ha de área inundada, e localiza-se nas coordenadas geográficas 20° 45' 30" S e 41° 27' 23" W, a 108, 27 m de altitude.

A microalga *Volvox* sp., foi coletada nos viveiros de piscicultura e posteriormente, cultivada no LEAPP-Ifes/*Campus de Alegre*, Alegre, ES, Brasil. O experimento foi realizado nos meses de novembro/dezembro de 2012, em sistema de cultivo estático não axênico, com aeração constante. Os aspectos físico-químicos da água dos bioensaios foram monitorados e controlados durante todo período experimental. A temperatura manteve-se a  $27 \pm 2,0$  °C, em regime de luz D light a  $64,75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a  $74 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 24 horas. O pH apresentou variação média de 7,0 a 7,2. O oxigênio manteve-se sempre próximo à saturação (7,5- 8,0 ppm). Portanto, os valores destes parâmetros foram mantidos dentro da faixa considerada adequada para o bom desenvolvimento de cultivo da microalga, de acordo com vários autores (Proença e Bittencourt, 1994; Ono e Kubitza, 2003; Brasil, 2005; Albanez e Matos, 2007; Sipaúba-Tavares et al., 2009;).

Foram avaliados o efeito de três tipos de fluxos de fótons de luz (espectros de luz) e dois tipos de fertilizantes minerais a base de N-P-K (15-05-30) e N-P-K

(15-09-12) granulado de liberação lenta em solução concentrada de  $10\text{g L}^{-1}$  na quantidade de 50,0 mL de solução de N-P-K, sobre a taxa de crescimento, o rendimento quântico máximo do fotossistema II ( $F_v/F_m$ ), o índice fotossintético (PI) e o valor nutricional da microalga *Volvox* sp.,

Foram testados os seguintes tratamentos: Espectro de luz Branca (15-09-12) granulado de liberação lenta solução de  $10\text{g L}^{-1}$  (T1); Espectro de luz Azul (15-09-12) granulado de liberação lenta solução de  $10\text{g L}^{-1}$  (T2); Espectro de luz vermelha (15-09-12) granulado de liberação lenta solução de  $10\text{g L}^{-1}$  (T3); Espectro de luz Branca (15-05-30) solução de  $10\text{g L}^{-1}$  (T4); Espectro de luz Azul (15-05-30) solução de  $10\text{g L}^{-1}$  (T5); Espectro de luz vermelha (15-05-30) solução de  $10\text{g L}^{-1}$  (T6).

## PERÍODO PRÉ-EXPERIMENTAL

### Preparação das soluções de fertilizantes

Foram testados os seguintes fertilizantes: Adubo comercial 1 (15-05-30) solúvel completo na concentração de  $10\text{g}$  de adubo  $\text{L}^{-1}$  + micronutrientes: Mg= 1,8%; S= 2%; Fe= 0,07%; B= 0,025%; Cu= 0,01%; Mn= 0,04%; Mo= 0,004%; Zn= 0,025%, fonte de nitrogênio 11,3% de Nitrogênio Nítrico e 3,7% Nitrogênio Amoniacal. 5% Fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) e 30% Potássio ( $\text{K}_2\text{O}$ ).

Adubo comercial 2 (15-09-12) granulado de liberação lenta na concentração de  $10\text{g}$  de adubo  $\text{L}^{-1}$  + micronutrientes: Mg= 1%; S= 2,3%; Cu= 0,05%; Fe= 0,45%; Mg= 0,06% e Mo= 0,02%, sendo a fonte de nitrogênio a ureia, fonte de fósforo o fosfato monoamônico (MAP) e o potássio o cloreto de potássio ( $\text{K}_2\text{O}$ ).

Para a preparação dos meios os adubos foram pesados à quantidade de  $10\text{g}$  dos respectivos adubos comerciais experimentados, em balança digital Mark M5502D, macerados e dissolvidos em um litro de água destilada. As soluções foram acondicionadas em recipientes com capacidade de 1L devidamente tampadas e conservadas em temperatura ambiente (Figura 1).



Figura 1 – Adubos experimentais acondicionados em recipientes com capacidade de 1L.

### Inoculação e manutenção dos cultivos

Cepas de *Volvox* sp., foram repicadas em intervalos regulares de 7 dias, de modo a obter maior densidade de células por mililitros e maiores volumes até alcançar 5L (Figura 2).



Figura 2 – Cultura semicontínua da alga microscópica continental clorofícea *Volvox* sp.

Os cultivos foram iniciados em laboratório em Erlenmeyer graduados com capacidade para 1000 mL, acrescentando-se 50 mL de N-P-K anteriormente diluído e 150 mL de inóculo, em frascos contendo 800 mL de água destilada. O experimento foi desenvolvido em triplicata durante 15 dias (Figura 3).



Figura 3 – Aspecto dos módulos das unidades experimentais sobre bancada.

Os bioensaios foram colocados sobre prateleiras com lâmpadas fluorescentes de diferentes espectros de luz (fluxos de fótons fotossintéticos):

Luz azul (lâmpada T4 actínica com reator integrado ROXIN RX-E023, 26 W, comprimento de 1,02 m e voltagem 110v) simula a luz do luar.

Luz vermelha (lâmpada T4 actínica rosa com reator integrado ROXIN RX-E023, 26 W, comprimento de 1,02 m e voltagem 110v) para o crescimento das plantas.

Luz branca (lâmpada T4 actínica branca com reator integrado ROXIN RX-E023, 26 W, comprimento de 1,02 m e voltagem 110v) para todos os tipos de aquário (Figura 4).



Figura 4 –Aspecto dos bioensaios experimentais sobre as prateleiras.

Com as seguintes quantidades de fótons fotossintéticos de cada luz testada: Luz azul ( $12,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), Luz vermelha ( $12,6 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e Luz branca ( $14,8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), medidos pelo aparelho Quantum Meter (Figura 5).





Figura 5 – Aparelho de medida do fluxo de fótons fotossintéticos.

A temperatura da sala estabilizada em 30°C e cada unidade experimental recebeu aeração constante, por meio de “aerador de aquário” e mangueiras plásticas 3/16” providas de pedras porosas em suas extremidades. A aeração serviu também para proporcionar a distribuição homogênea dos adubos comerciais experimentais, evitando precipitação de adubo no fundo das unidades experimentais e conseqüentemente a desnutrição das microalgas estudadas.

### **Acompanhamento do desenvolvimento no crescimento celular**

O monitoramento da cultura foi realizado a partir de 24 horas após a inoculação das culturas, por contagens de células com câmara de Neubauer, retirando-se de cada unidade experimental amostras de 3 ml diariamente, ao longo de 15 dias, para avaliação do crescimento populacional, sendo estas alíquotas previamente fixadas com solução de lugol 1% e guardadas em frascos de vidro com tampa, retirando dessas alíquotas, duas subamostras de  $1 \mu\text{m L}^{-1}$  sendo as amostras contadas sob microscópio biológico de luz direta, com aumento de 400x, em câmara de Neubauer (Figura 6).

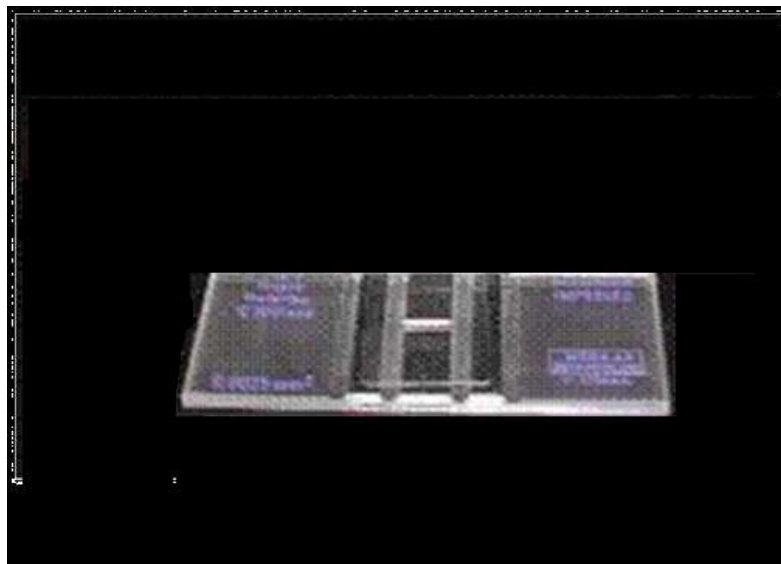


Figura 6 – Câmara de Neubauer (hemocitômetro) usada na contagem celular de *Volvox* sp.

Estabeleceu-se a curva de crescimento de cada microalga. O total foi expresso em números de células  $m L^{-1} \times 10^4$  estabelecendo-se as curvas de crescimento do cultivo misto das microalgas do gênero *Volvox* sp. O experimento foi finalizado no 15º dia de desenvolvimento da cultura, perfazendo 14 dias de contagens.

Fórmula de contagem para determinação do crescimento populacional:

$$D \text{ (células ml-1)} = \frac{\text{contagem total} \times 10^4}{N^\circ \text{ blocos contados}}$$

### **Estimativa do teor de Clorofila a, b e c**

As avaliações e o cálculo de clorofila a, b e c foram obtidos filtrando uma quantidade conhecida de água, em filtro de fibra de vidro com pequena porosidade (0,1 a 1 micrômetros). Em seguida, estes filtros foram congelados a uma temperatura de 20°C por 180 dias. A extração foi realizada após 24 horas de molho em 10 mL de acetona a 90% a frio. Estes processos foram realizados em ambiente com a menor quantidade de luz. O extrato foi centrifugado por 20 minutos a 3500 rpm retirando-se o líquido (sobrenadante), e completando-se a 10

mL com acetona 90%. Em seguida foram feitas as leituras em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 664 nm, 647 nm e 630 nm, utilizou-se como “branco”, acetona 90%. A leitura a 664 nm detectou a absorção da clorofila a, a leitura a 647 nm a absorção da clorofila b e a leitura a 630 nm detectou a absorção da clorofila c, utilizando a fórmula proposta por Golterman et al. (1978).

$$P_{\text{clor}} = \frac{E_{\text{clor}} \times 1000 \times V_{\text{extr}} \text{ (mL)}}{K_{\text{clor}} \times V_{\text{filt}} \text{ (l)}}$$

Cálculo de clorofila a.

$$E_{\text{clor}} = E_{664} - E_{750}$$

E664= leitura a 664nm,  
 E750= leitura a 750 nm,  
 Eclor= leitura corrigida para clorofila a,  
 Pclor= concentração de clorofila a,  
 1000= correção do volume L<sup>-1</sup>,  
 Vextr (ml)= volume do extrato,  
 Kclor= coeficiente de extinção para a clorofila a (89),  
 Vfilt(l)= volume filtrado (em litros).

Cálculo de clorofila b

$$E_{\text{clor}} = E_{647} - E_{750}$$

E647= leitura a 647nm,  
 E750= leitura a 750 nm,  
 Eclor= leitura corrigida para clorofila b,  
 Pclor= concentração de clorofila b,  
 1000= correção do volume L<sup>-1</sup>,  
 Vextr (ml)= volume do extrato,  
 Kclor= coeficiente de extinção para a clorofila b (89),  
 Vfilt(l)= volume filtrado (em litros).

Cálculo de clorofila c

$$E_{\text{clor}} = E_{630} - E_{750}$$

E630= leitura a 630nm,  
 E750= leitura a 750 nm,  
 Eclor= leitura corrigida para clorofila c,  
 Pclor= concentração de clorofila c,

1000= correção do volume  $L^{-1}$ ,  
Vextr (ml)= volume do extrato,  
Kclor= coeficiente de extinção para a clorofila  $c$  (89),  
Vfilt(l)= volume filtrado (em litros).

### Rendimento quântico máximo do fotossistema II ( $F_v/F_m$ )

As avaliações da fluorescência inicial ( $F_0$ ), da fluorescência variável ( $F_v$ ), da fluorescência máxima ( $F_m$ ) e do rendimento quântico do fotossistema II (FSII) ( $F_v/F_m$ ) foram obtidas por meio do fluorímetro Pocket PEA (Plant Efficiency Analyser, Hansatech, Inglaterra). Para realizar essas avaliações a massa microalgal foi adaptada ao escuro com o auxílio de pinças, as quais acompanham o equipamento. De acordo com Strasser et al. (2000b), nessas condições os centros de reação estão completamente abertos com perda mínima de calor. Um pulso forte de luz  $1s^{-1}$  ( $3500 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ ) foi aplicado por três diodos emissores de luz (650 nm). Esta avaliação foi realizada no oitavo dia experimental, às 9:00 h (Figura 7).



Figura 7 – Coleta e preparação da microalga *Volvox* sp., para avaliação por meio do fluorímetro Pocket PEA (Plant Efficiency Analyser, Hansatech, Inglaterra) do rendimento quântico máximo do fotossistema II e do índice fotossintético.

### **Índice fotossintético (PI)**

A partir das intensidades de fluorescência armazenadas por meio do Pocket PEA, foi possível obter a relação  $F_v/F_m$  (TR/ABS) (rendimento quântico máximo do FSII) e o PI ( $(F_v/F_0)$  (RC/ABS) (ET/TR-ET)). O PI combina 3 passos da atividade fotossintética dos centros de reações do FSII: a absorção da energia luminosa (RC/ABS); a captura da energia de excitação ( $F_v/F_0$ ) (que representa a contribuição da energia luminosa para a fotoquímica primária. Este componente  $F_v/F_0$  representa a “performance” devido à probabilidade de captura da energia luminosa, (i.e.) a capacidade de reduzir Quinona (Qa) e a conversão da energia luminosa para o transporte de elétrons no FSII (ET/TR-ET) (i.e. a contribuição das reações bioquímicas) (Strasser e Strasser, 1995; Strasser e Tsimili-Michael, 2001; Strasser et al., 2000b e 2004).

### **Análise Bromatológica**

No Laboratório de Bromatologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo (Ifes) – *Campus de Alegre*, foi realizada a análise do teor proteico total na biomassa seca da microalga do gênero *Volvox* sp., em cada tratamento através do método clássico de KJELDHAL, adotando-se o fator de correção de 6,25 para a conversão a partir dos teores de nitrogênio total (OFFICIAL METHODS OF FOOD ANALYSIS, 1984). Esse método baseia-se pela destruição da matéria orgânica com ácido sulfúrico concentrado, em presença de um catalizador e aquecimento, com formação de nitrogênio inorgânico, na forma de sulfato de amônio. Em seguida, em aparelho destilador de nitrogênio, adiciona-se hidróxido de sódio no tubo proveniente da digestão, para alcalinização do meio, e, desta forma, o sal de amônio é convertido à amônia, que é destilada para uma solução saturada de ácido bórico. Posteriormente, titula-se essa solução com ácido clorídrico 0,01N para quantificar a concentração de nitrogênio, utilizou a fórmula (Tedesco et al., 1995):

$$\text{Proteína bruta (\%)} = [(V_a - V_b)/P] \times F \times N \times 6,25 \times 0,014 \times 100$$

Onde:

Va= volume de HCL 0,01 N utilizado na titulação;

Vb= volume de HCL 0,01 N consumido pela prova em branco;

F= fator de correção do HCL 0,01N;

N= normalidade;

6,25= fator de transformação do nitrogênio em proteína, ( considerando 16% nitrogênio);

0,014= miliequivalente grama do nitrogênio;

P= peso da amostra em g.

### **Delineamento experimental e análise estatística**

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, distribuído em esquema fatorial completo  $2^3$ , onde foram testados dois adubos comerciais em três diferentes espectros de luz (fluxos de fótons fotossintético) no cultivo da microalga *Volvox* sp., em triplicata por tratamento perfazendo 24 unidades amostrais.

Os dados obtidos foram analisados por meio do teste de Tuckey em 5% de probabilidade com o auxílio do software SISVAR 5.3 (Build 77), (Ferreira, 2011). Os gráficos foram realizados por meio do Excel 2007.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desempenho da microalga *Vo/vox* sp., variou de acordo com os diferentes fertilizantes comerciais e espectro de luz testados, observado nas figuras (8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14) e nas tabelas (1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) abaixo:

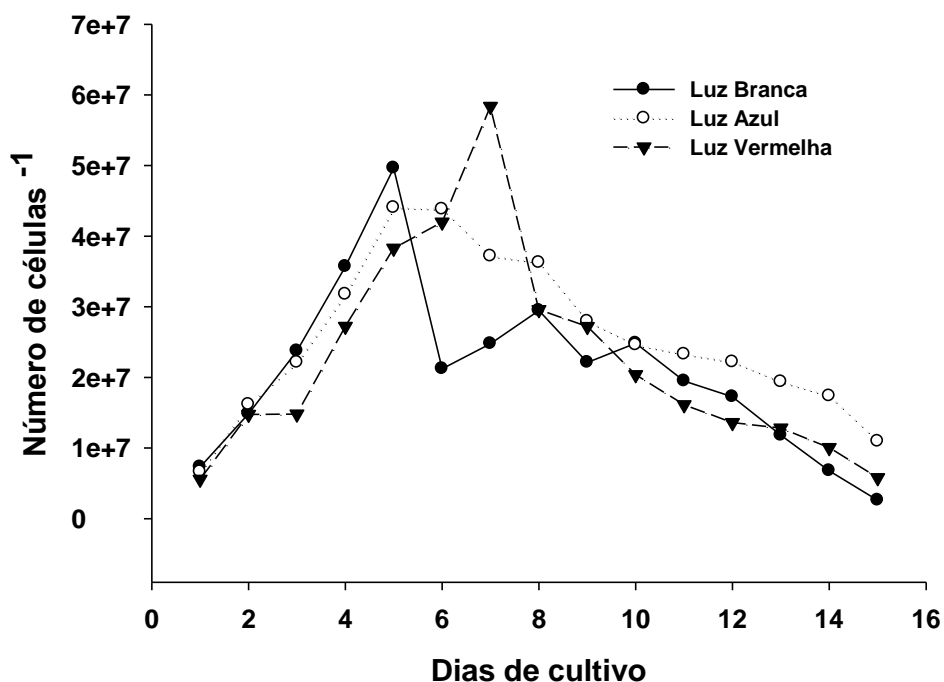


Figura 8: Curvas de crescimento do número de células mL<sup>-1</sup>, nos tratamentos T1 (15-09-12) Luz Branca, T2 (15-09-12) Luz Azul e T3 (15-09-12) Luz Vermelha.

O crescimento da microalga do gênero *Vo/vox* sp., em meio de cultivo adubo comercial de liberação lenta (15-09-12) na solução de 10g L<sup>-1</sup> foi semelhante nos espectros de luz utilizados, com fase exponencial para T2 (15-09-12) Luz Azul entre o 3º e 5º dia, fase estacionária do 5º ao 6º dia com posterior declínio do número de células microalgais do 7º até o 15º dia. O T3 (15-09-12) Luz Vermelha apresentou fase exponencial até o 3º dia de cultivo em seguida, fase estacionária entre o 3º ao 4º dia, posterior aumento do crescimento celular atingindo o pico máximo de crescimento no 7º dia e em seguida declínio do número de células L<sup>-1</sup> no 15º dia. Observou-se no T1 (15-09-12) Luz Branca início da fase exponencial no 3º dia de cultivo, alcançando o pico máximo de crescimento celular no 5º dia, declínio no 6º dia de cultivo em seguida oscilação entre crescimento e declínio do número de células até o 9º dia, com posterior

declínio no 15º dia de experimentação, (Figura 8).

Tabela 1 – Número de células da microalga *Volvox* sp, submetidas a diferentes espectros de luz e adubo comercial de liberação lenta (15-09-12) na solução de 10g L<sup>-1</sup>, aos quinze dias de cultivo.

TRATAMENTOS	NÚMERO DE CÉLULAS
T1(15-09-12) Luz branca	1,77E+07b
T2(15-09-12) Luz azul	2,58E+07a
T3(15-09-12) Luz vermelha	2,01E+07b

<sup>1</sup>Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tuckey em nível de 5% de probabilidade.

O crescimento da microalga do gênero *Volvox* sp., no adubo comercial de liberação lenta (15-05-30) na solução de 10g L<sup>-1</sup>, foi superior no espectro de luz Azul, com fase exponencial no T5 (15-05-30) Luz Azul entre o 1º e 7º dia, fase estacionária no 8º dia com posterior declínio do número de células microalgais do 9º até o 15º dia. O T6 (15-05-30) Luz Vermelha apresentou fase exponencial até o 6º dia de cultivo atingindo o pico máximo de crescimento no 6º dia e em seguida declínio do número de células L<sup>-1</sup> até o 15º dia. O T4 (15-05-30) Luz Branca início da fase exponencial no 2º dia de cultivo, alcançando o pico máximo de crescimento celular no 5º dia e a fase de declínio no 6º dia de cultivo até o 15º dia de experimentação, (Figura 9).



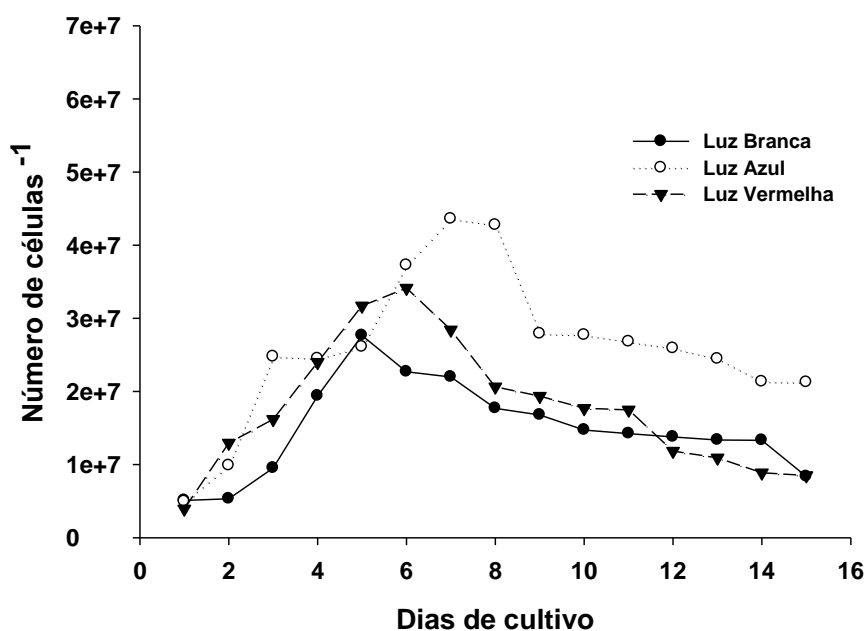


Figura 9: Curvas de crescimento do número de células mL<sup>-1</sup>, nos tratamentos T4 (15-05-30) Luz Branca, T5 (15-05-30) Luz Azul e T6 (15-05-30) Luz Vermelha.

Tabela 2 – Número de células da microalga *Volvox* sp, submetidas a diferentes espectros de luz e adubo comercial (15-05-30) na solução de 10g l<sup>-1</sup>, aos quinze dias de cultivo

TRATAMENTOS	NÚMERO DE CÉLULAS
T4(15-05-30) Luz branca	1,49E+07b
T5(15-05-30) Luz azul	2,59E+07a
T6 (15-05-30) Luz vermelha	1,78E+07b

<sup>1</sup>Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tuckey em nível de 5% de probabilidade.

Realizando-se as análises estatísticas para o crescimento do número de células mL<sup>-1</sup> ao final da experimentação (15 dias) demonstrou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) pelo teste de Tuckey. Observado nas tabelas 1 e 2 que o T2 (15-09-12) Luz azul e T5 (15-05-30) Luz azul apresentaram o melhor desempenho no crescimento celular da microalga *Volvox* sp., enquanto os tratamentos: T3 (15-09-12) Luz vermelha, T6 (15-05-30) Luz vermelha, T1(15-09-12) Luz branca e T4(15-05-30) Luz branca apresentaram o pior desempenho com relação ao crescimento populacional do número de células mL<sup>-1</sup>.

O incremento da densidade celular do gênero *Volvox* sp., durante a fase exponencial de crescimento nos dois meios utilizados poderá estar associado ao período de 24 horas de luz, visto que espectros de luz diferentes influenciaram no crescimento algal. Taxas de crescimento elevadas estão associadas com a aeração e o espectro de luz.

Nas curvas de crescimento foi possível identificar uma fase de ajuste entre o dia 1 e 2, onde o número de células algais não aumenta significativamente em relação ao dia inicial não estando em condições de divisão imediata, dita fase de adaptação ao meio de cultivo, podendo inferir a presença de enzimas inativas, diminuição dos metabólitos em níveis insuficientes para ocorrer divisão celular e maior assimilação de carbono disponível (Pérez et al.,2008). O equilíbrio de ácido glicólico no meio que possa tornar disponível a fixação do carbono e assim promover o crescimento (Xu et al., 2006).

O resultado da análise bromatológica para a microalga do gênero *Volvox* sp., apresentou teores de Proteína Bruta (PB) elevados nos tratamentos: T3 (15-05-30) Luz Branca e T6 (15-09-12) Luz Branca (Figura 10).

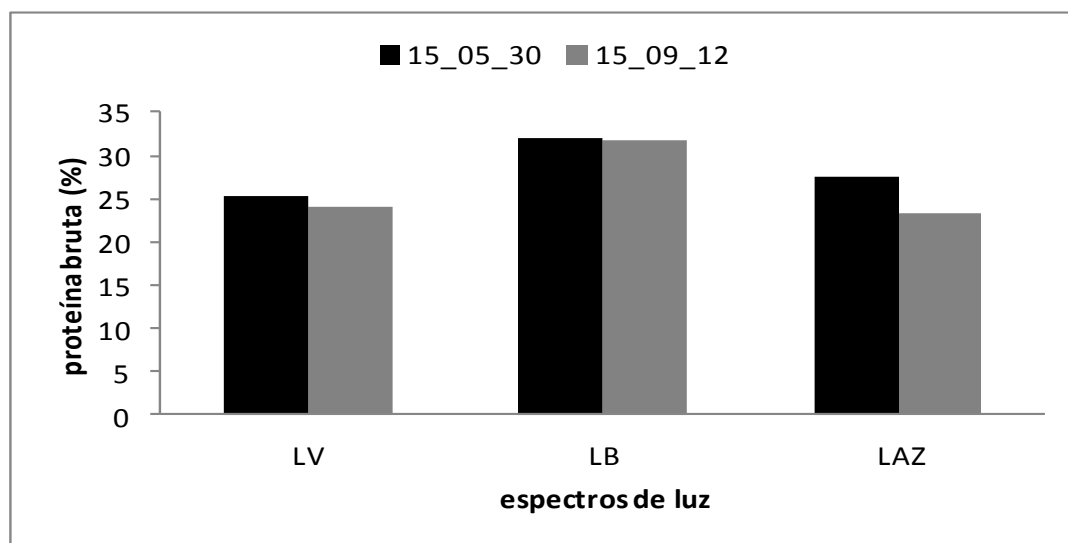


Figura 10: Proteína bruta (%) da microalga *Volvox* sp., nos tratamentos T1 (15-05-30) Luz Vermelha, T2 (15-05-30) Luz Azul, T3 (15-05-30) Luz Branca, T4 (15-09-12) Luz Vermelha, T5 (15-09-12) Luz Azul e T6 (15-09-12) Luz Branca.

Alcançando níveis de proteína semelhante aos relatados por Lourenço (2006). Corroborando com diversos autores (Brown, 2002; Sipaúba-Tavares e Rocha, 2003; Olaizola, 2003; Cabrales e Gonzalez, 2004) que afirmam a

necessidade de informações relativas à exigência nutricional e quanto aos aspectos referentes à espécie e do tipo de fertilizante utilizado, interagindo com as variáveis físico-químicas para o melhor desempenho do fitoplâncton dulcícola. Brown et al. (1997), comprovaram que na fase de crescimento, as microalgas apresentam variações na composição química e, na fase estacionária, o nível de proteína é baixo, devido à limitação do nitrogênio. Essa afirmativa atualmente pode ser corrigida nos cultivos controlados, pois os meios de cultura oferecem nutrientes e quantidade de luz necessária para o crescimento ótimo de cada espécie. Concordando com Sipaúba-Tavares et al. (1999), que afirmam a importância da interação gênero de microalga, tipo de adubo comercial e com as variáveis físico-químicas.

Com relação aos demais tratamentos T1 (15-05-30) Luz vermelha, T2 (15-05-30) Luz azul, T4 (15-09-12) Luz vermelha e T5 (15-09-12) Luz azul, não atingiram o valor de 30% PB, considerado mínimo necessário para produção como alimento para larvas e alevinos de peixes e crustáceos (Sipaúba-Tavares et al., 1999). A variação no teor proteico das microalgas pode comprometer o crescimento e o desenvolvimento de organismos de níveis tróficos superiores (Kilham et al., 1997).

Portanto, meio e técnica de cultivo são a base para o estabelecimento da qualidade nutricional das microalgas (Penteado, 2010).

A concentração de clorofila *a*, observada nos tratamentos T1 (15-05-30) Luz vermelha, T2 (15-05-30) Luz azul, T3 (15-05-30) Luz branca, foi relativamente constante mantendo-se em torno de  $0,004 \mu\text{g L}^{-1}$ , enquanto que a concentração de clorofila *b* foi superior no T1 (15-05-30) Luz vermelha em torno de  $0,007 \mu\text{g L}^{-1}$  quando comparado aos tratamentos: T2 (15-05-30) Luz azul mantendo-se em torno de  $0,001 \mu\text{g L}^{-1}$  e T3 (15-05-30) Luz branca em torno de  $0,001 \mu\text{g L}^{-1}$ . Na última concentração da clorofila *c* o tratamento (15-05-30) Luz vermelha, manteve-se em torno de  $0,004 \mu\text{g L}^{-1}$  e os tratamentos T2 (15-05-30) Luz azul  $0,001 \mu\text{g L}^{-1}$  e T6 (15-09-12) Luz branca  $0,005 \mu\text{g L}^{-1}$ . (Figura 11).

Nas observações realizadas na Figura 12 a concentração da clorofila *a* no tratamento T4 (15-09-12) Luz vermelha foi superior em torno de  $0,008 \mu\text{g L}^{-1}$ , aos demais tratamentos T5 (15-09-12) Luz azul  $0,002 \mu\text{g L}^{-1}$  e T6 (15-09-12) Luz branca  $0,001 \mu\text{g L}^{-1}$ . na concentração de clorofila *b* o tratamento T4 (15-09-12)

Luz vermelha manteve-se em torno de  $0,005 \mu\text{g L}^{-1}$  enquanto os demais tratamentos T5(15-09-12) Luz azul e T6(15-09-12) Luz branca mantiveram-se em nulidade  $0,000 \mu\text{g L}^{-1}$ . Já a concentração da clorofila  $c$  o tratamento T4(15-09-12) Luz vermelha manteve-se em torno de  $0,006 \mu\text{g L}^{-1}$  superior ao tratamento T5(15-09-12) Luz vermelha, que se manteve em torno de  $0,006 \mu\text{g L}^{-1}$  superior aos tratamentos T5(15-09-12) Luz azul e T6(15-09-12) Luz branca que apresentaram nulidade em seus resultados  $0,000 \mu\text{g L}^{-1}$ .

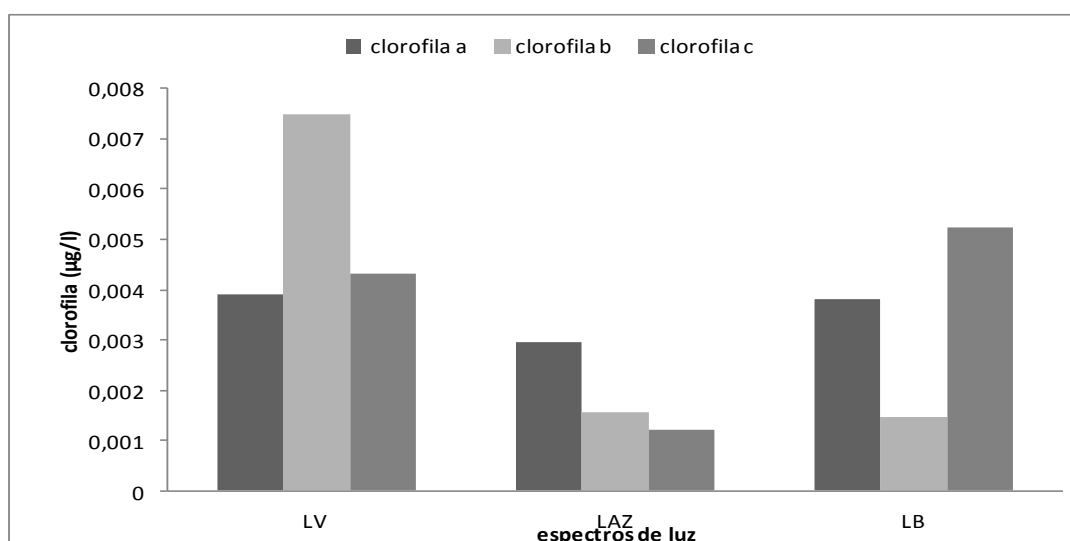


Figura 11: Estimativa do teor de clorofila ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) da microalga *Volvox* sp., nos tratamentos T1 (15-05-30) Luz Vermelha, T2 (15-05-30) Luz Azul e T3 (15-05-30) Luz Branca.

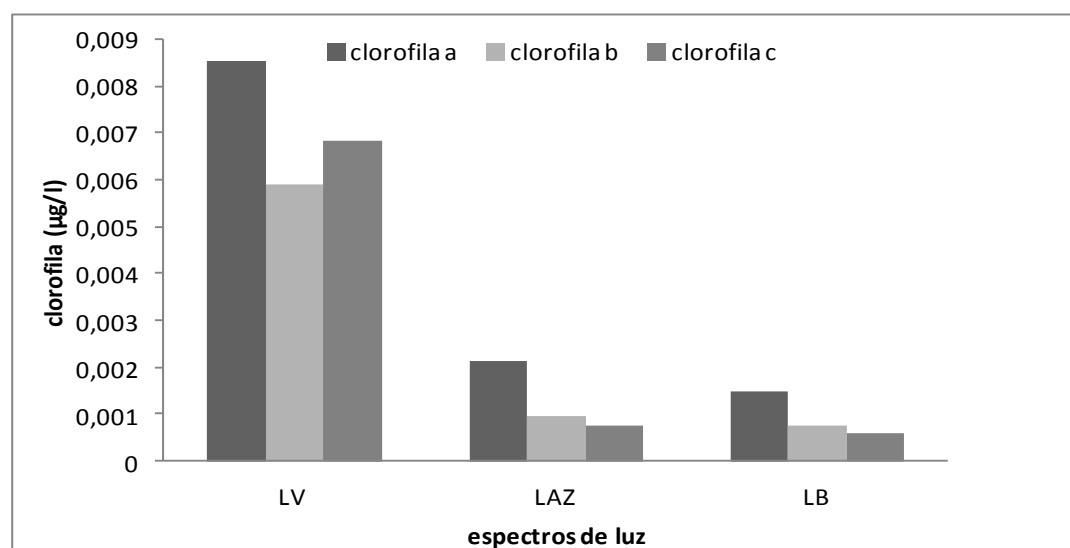


Figura 12: Estimativa do teor de clorofila ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) da microalga *Volvox* sp., nos tratamentos T4 (15-09-12) Luz Vermelha, T5 (15-09-12) Luz Azul e T6 (15-09-12) Luz Branca.

Os resultados obtidos para o teor de clorofila a, b e c demonstrados nas tabelas 3, 4 e 5, em todos os tratamentos T1 (15-05-30) Luz vermelha, T2 (15-05-30) Luz azul, T3(15-05-30) Luz branca, T4 (15-09-12) Luz vermelha, T5(15-09-12) Luz azul e T6 (15-09-12) Luz branca. Comprovaram não haver diferença significativa ( $P < 0,05$ ) ao término do experimento.

Tabela 3 – Análise de variância do teor de clorofila a ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) da microalga *Volvox* sp, submetida a diferentes espectros de luz e adubo comercial, aos quinze dias de cultivo.

<b>FONTE DE VARIAÇÃO</b>	<b>GRAUS DE LIBERDADE</b>	<b>QUADRADO MÉDIO</b>
Adubo	1	0,00000000E+0000 <sup>ns</sup>
Luz	2	0,000050 <sup>ns</sup>
Interação	2	0,000050 <sup>ns</sup>
Resíduo	12	0,000033
C.V		173,21%

ns = não significativo, pelo teste de Fisher em nível de 5% de probabilidade.

Tabela 4 – Análise de variância do teor de clorofila b ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) da microalga *Vo/vox* sp, submetida a diferentes espectros de luz e adubo comercial, aos quinze dias de cultivo.

<b>FONTE DE VARIAÇÃO</b>	<b>GRAUS DE LIBERDADE</b>	<b>QUADRADO MÉDIO</b>
Adubo	1	0,00000000E+0000 <sup>ns</sup>
Luz	2	0,000089 <sup>ns</sup>
Interação	2	0,00000000E+0000 <sup>ns</sup>
Resíduo	12	0,000028
C.V		237,17%

ns = não significativo, pelo teste de Fisher em nível de 5% de probabilidade.

Tabela 5 – Análise de variância do teor de clorofila c ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) da microalga *Volvox* sp, submetida a diferentes espectros de luz e adubo comercial, aos quinze dias de cultivo.

<b>FONTE DE VARIAÇÃO</b>	<b>GRAUS DE LIBERDADE</b>	<b>QUADRADO MÉDIO</b>
Adubo	1	0,00000000E+0000 <sup>ns</sup>
Luz	2	0,000039 <sup>ns</sup>
Interação	2	0,000017 <sup>ns</sup>
Resíduo	12	0,000017 <sup>ns</sup>
C.V		183,71%

ns = não significativo, pelo teste de Fisher em nível de 5% de probabilidade.

A absorvância da clorofila a, b e c como representação da biomassa depende do tamanho, da forma e do brilho das partículas, do comprimento de onda da luz incidente e da concentração de nutrientes (Eker-Develi et al., 2006). Segundo Cullen (1982), a relação clorofila/número de células decresce em condições saturadas de luz. Eker-Develi et al., (2006), encontraram que a relação pode ser mutável dependendo das fases de crescimento de cada espécie estudada. Sendo a relação clorofila/número de células alta na fase exponencial de crescimento e em elevada concentração de nutrientes.

Os resultados obtidos demonstram a determinação da clorofila a, b e c, os estudos com relação à curva de crescimento de microalgas devem ser sempre realizados em conjunto com as medidas de contagem celular. Os parâmetros que mais influenciaram a variação de clorofila a, b e c ao longo do experimento foram os diferentes fluxos de fótons de luz e fertilizantes comerciais. Segundo Jesus e Marengo (2008), as clorofilas estão relacionadas com a eficiência fotossintética e conseqüentemente com o crescimento e a adaptabilidade aos diferentes ambientes. Em cultivo de microalgas, um dos principais objetivos é a maximização da eficiência fotossintética. Segundo Uribe (1989), a fotossíntese e outros processos vitais são regulados por enzimas. Assim, não só a fotossíntese, mas os demais processos vitais que dependem da atividade enzimática podem reduzir ou até cessarem quando não satisfeitas suas exigências físico-químicas.

O rendimento quântico máximo do FSII, representado pela relação  $F_v/F_m$ ,

demonstrado na tabela 6, em todos os tratamentos realizados T1 (15-05-30) Luz vermelha, T2 (15-05-30) Luz azul, T3 (15-05-30) Luz branca, T4 (15-09-12) Luz vermelha, T5 (15-09-12) Luz azul e T6 (15-09-12) Luz branca (figura 13) não apresentou diferença significativa ( $P < 0,05$ ) ao término do experimento.

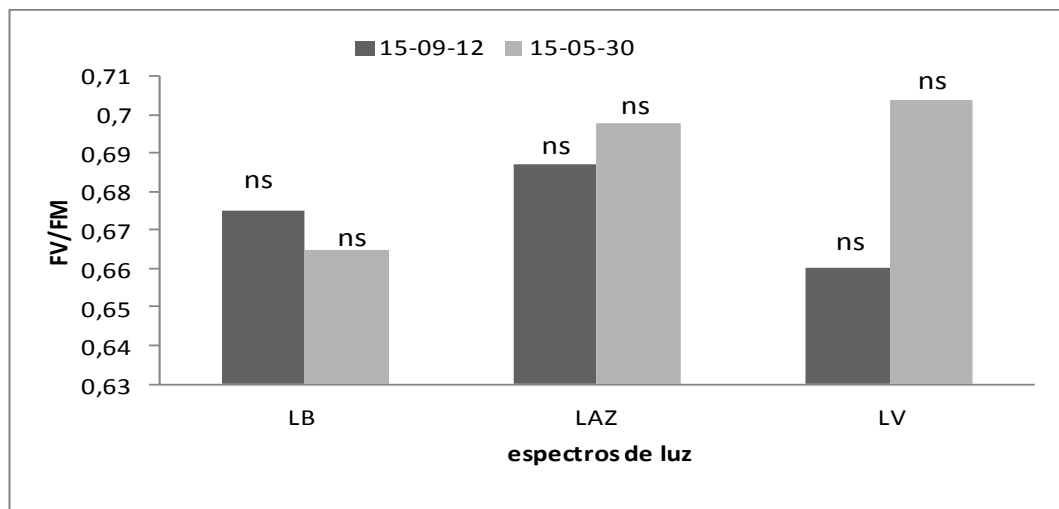


Figura 13: Eficiência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm) da microalga *Volvox* sp., nos tratamentos T1 (15-05-30) Luz Vermelha, T2 (15-05-30) Luz Azul, T3 (15-05-30) Luz Branca, T4 (15-09-12) Luz Vermelha, T5 (15-09-12) Luz Azul e T6 (15-09-12) Luz Branca.

Tabela 6 – Análise de variância da eficiência quântica máxima do fotossistema II (Fv/Fm) da microalga *Volvox* sp, submetida a diferentes espectros de luz e adubo comercial, aos quinze dias de cultivo

FONTE DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO
Adubo	1	0,0000000E+000 <sup>ns</sup>
Luz	2	0,000050 <sup>ns</sup>
Interação	2	0,000050 <sup>ns</sup>
Resíduo	12	0,000033
C.V		216,21%

ns = não significativo, pelo teste de Fisher em nível de 5% de probabilidade.

Ambos os tratamentos apresentaram valores da relação Fv/Fm entre 0,66 e 0,71 podendo indicar ocorrência de dano fotoinibitório no PSII (Bilger e Björkmann, 1990). Entretanto, possíveis reduções nos valores de Fv/Fm podem representar tanto uma regulação fotoprotetora reversível como uma inativação

irreversível do PSII (Long et al., 1994; Araus e Hogan, 1994). Diferente do que ocorre com as plantas superiores as microalgas neste experimento não diminuíram o teor de clorofila (Figura 11 e 12). Portanto, não ocorreram danos ao aparato fotossintético da microalga estudada. Segundo Christen et al. (2007), e Oukarroum et al. (2007), consideram essa variável pouco sensível às alterações iniciais na fotossíntese. Neste trabalho, os autores Figueredo et al. (2009), não concordam com o encontrado porque afirmam que a variável PI (Índice fotossintético), quando comparada à relação Fv/Fm, é mais sensível e mais indicada para a resposta da capacidade fotossintética nas microalgas.

O PI (Índice fotossintético) é um índice que também avalia o aparato fotossintético. Entretanto, para ser estimado, o PI utiliza um maior número de parâmetros, o que o pode tornar uma variável mais sensível aos fatores ambientais como luz, temperatura, nutrientes minerais etc, do que a relação Fv/Fm. Esses parâmetros são a densidade dos centros de reação, eficiência de captura e transporte de elétrons (Strasser et al., 2000b; Strasser et al., 2004).

O PI demonstrado na Tabela 7, para os tratamentos T1 (15-05-30) Luz vermelha, T2 (15-05-30) Luz azul, T3 (15-05-30) Luz branca, T4 (15-09-12) Luz vermelha, T5 (15-09-12) Luz azul e T6 (15-09-12) Luz branca (Figura 14), não apresentou diferença significativa ( $P < 0,05$ ), apresentando valores do índice fotossintético entre 0,6-0,8.

No presente estudo o PI demonstrou diferença significativa ( $P > 0,05$ ) quando realizada a análise estatística pelo teste de Tuckey. Observado na tabela 8 em que o T4 (15-05-30) Luz branca apresentou uma melhor atividade do aparato fotossintético da microalga *Volvox* sp., quando comparado com os tratamentos T5 (15-05-30) Luz azul e T6 (15-05-30) Luz vermelha (Figura 14). Reforçando a grande sensibilidade desta variável quanto ao funcionamento fotoquímico da microalga estudada, pois quando em mesma condição de avaliação a mesma resposta não foi encontrada na relação Fv/Fm (Ribeiro, 2012).



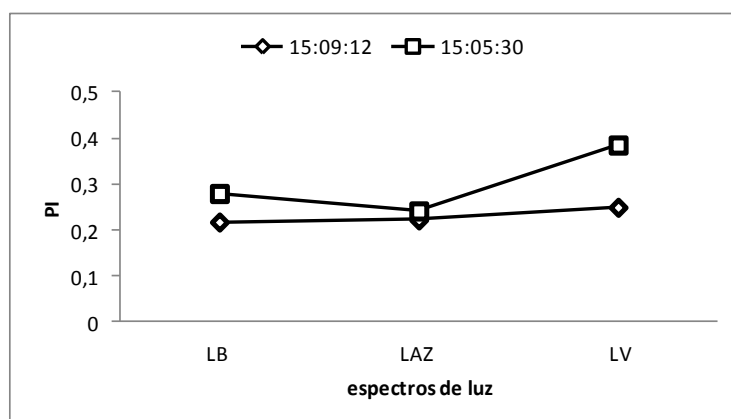


Figura 14: Índice fotossintético da microalga *Vo/vox* sp., nos tratamentos T1 (15-05-30) Luz Vermelha, T2 (15-05-30) Luz Azul, T3 (15-05-30) Luz Branca, T4 (15-09-12) Luz Vermelha, T5 (15-09-12) Luz Azul e T6 (15-09-12) Luz Branca.

Tabela 7 – Índice fotossintético (PI) da microalga *Vo/vox* sp, submetida a diferentes espectros de luz e adubo comercial (15-09-12), na solução de 10g l-1, aos quinze dias de cultivo.

TRATAMENTOS	PI
T1(15-09-12) Luz branca	0,06a
T2(15-09-12) Luz azul	0,07a
T3 (15-09-12) Luz vermelha	0,08a

<sup>1</sup>Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tuckey em nível de 5% de probabilidade.

Tabela 8 – Índice fotossintético (PI) da microalga *Vo/vox* sp, submetida a diferentes espectros de luz e adubo comercial (15-05-30) na solução de 10g l-1, aos quinze dias de cultivo.

TRATAMENTOS	PI
T4(15-05-30) Luz branca	0,15a
T5(15-05-30) Luz azul	0,05b
T6 (15-05-30) Luz vermelha	0,06b

<sup>1</sup>Médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tuckey em nível de 5% de probabilidade.

## CONCLUSÕES

*Volvox sp.*, obteve melhor multiplicação celular (número de células mL<sup>-1</sup>) em meio de cultivo utilizando os adubos comerciais(15-09-12) e (15-05-30) no espectro de Luz azul.

*Volvox sp.* apresentou melhor capacidade fotossintética utilizando o fertilizante químico (15-05-30) Luz branca.

*Volvox sp.* apresentou valor nutricional de proteína bruta satisfatório nos tratamentos: T4 (15-05-30) Luz Branca e T2 (15-09-12) Luz Branca.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albarez, J. R.; Matos, A. T. Aqüicultura. In: MACEDO, J. A. B. Águas & águas.. 3. ed. Belo Horizonte: CRQ - MG, 2007. (Suplemento)
- AOAC.-(1984), Association of Official Analytical Chemistry, 1984. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 14. ed. Arlington. 1141 p.
- Araus, J. L. e Hogan, K. P. 1994. Comparative leaf structure and patterns of photoinhibition of the neotropical palms. *Scheelea zonensis* and *Socratea durissima* growing in clearing and forest understory during the season in Panama. *Am. J. Bot.* 81(6): 726-738.
- Barbieri-Júnior, C. e Ostrensky, A. 2001. Camarões Marinhos, reprodução, maturação e larvicultura Vol.1 Aprenda Fácil. Viçosa, MG. 243p.
- Bilger, W. e Björkmann, O. 1990. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth. Res.* 25: 173–185.
- Bolhàr-Nordenkampf, H. R. e Öquist, G. 1993. Chlorophyll fluorescence as a tool in photosynthesis research. In: Photosynthesis and production in a changing environment: a field and laboratory manual (D. Hall, J. M. O. Scurlock, H. R. R. Bolhàr-Nordenkampf, C. R. C. Leegood, S. P. Long, (eds). Chapman e Hall, London. p. 193-206.

- BRASIL. Resolução Conama no 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 mar. 2005.
- Brown, M. R. e Robert, R. 2002. Preparation and assessment of microalga concentrates as feeds for larval and juvenil e Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*. 207: 289-309.
- Brown, M. R. 2002. Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. In: CRUZ-SUÁRES, L. E., RICQUE-MARIE, D., TAPIA-SALAZAR, M., GASCIOLA-CORTÉS, M. G., SIMOES, N. *Avances in nutrición acuícola. VI Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición acuícola*. Cancún, Quintana Roo, México.
- Brown, M. R; Jeffrey, S. W; Volkman, J. K. & Dunstan, G. A. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151 (14): 315-331p.
- Cabrales, M. M. Q.; González, M. F. 2004. Utilización de residual aviar como fuente de nutrientes en cultivos de microalgas. *Medisan*, Santiago de Cuba. 8(3): 27-31.
- Christen, D.; Schönmann, S.; Jermini, M.; Strasser, R. J.; Défago, G. 2007. Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to esca disease by in situ chlorophyll fluorescence and comparasion with drought stress. *Environ. Exp. Bot.* 60: 504-514.
- Cullen, J. J. 1982. The deep chlorophyll máximo: comparing vertical profiles of chlorophyll a. *Can. Journal Fish. Aquatic. Seit.* 39: 791-803.
- Eker-Develi, E.; Kideys, A. E. E Tugrul, S. 2006. Effect of nutrients on cultura dynamic of marine phytoplankton. *Aquat. Sci.* 68: 28-39.

- Ferreira, D. F. 2011 Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*. 35 (6): 1039-1042p.
- Figueredo, C. C.; GIANI, A. E LEMOS-FILHO, J. P. 2009. Photosynthetic capacity of three phytoplanktonic species measured by a pulse amplitude fluorometric method. *Brazilian Society of Plant Physiology*. 21(3): 167-174.
- Golterman, H. L.; Clymo, R. S. E Ohnstad, M. A. M. 1978. *Methods for Physical and Chemical Analysis of freshwaters*. Blackweel Sci. Publ. London, IBP Handbook number 8. 214p.
- Hoff, F. H. E Snell, T. W. 1987. *Plankton Culture Manual*. Published by Florida Aqua Farms, Inc. Florida, 126p.
- Jesus, S. V. E Marengo, R. J. 2008. O SPAD-502 como alternativa para a determinação dos teores de clorofila em espécies frutíferas. *Acta amazônica*. 38: 815-818.
- Kao, W. Y.; Forseth, I. N. 1992. Diurnal leaf movement, chlorophyll fluorescence and carbon assimilation in soybean grown under different nitrogen and water availabilities. *Plant. Cell and Environment*. Oxford. 15: 703-710.
- Kilhan, S. S.; Kreeger, D. A.; Goulden, C. E.; Lynn, S. G. 1997. Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*. *Freshwater Biology*. 38: 591-596.
- Krause, G. H. E Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics, *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 313-349.
- Lefebvre, S.; Mouget, J. L.; Loret, P.; Rosa, P. E Tremblin, G. 2007. Comparison between fluorimetry and oximetry techniques to measure photosynthesis in the diatom *Skeletonema costatum* cultivated under simulated seasonal conditions. *J. Photochemistry and Photobiology B. Biology*. 86:131-139.

- Long, S. P.; Humphries, S. Falkowski, P. G. 1994. Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 45: 633-662.
- Lourenço, S. O. 2006. *Cultivo de microalgas marinhas-princípios e aplicações*, Rima Editora, São Carlos, 588p.
- Maximiano, N.; Lordeiros, C.; Donato, M.; Graziani, C. 2002 evaluation of microalgae evaluation of microalgae diets for *Litopenaeus vannamei* larvae using a simple protocol. *Aquaculture International, netherlands*. 10: 177-187.
- Kim E Durnford, D. G. 2006. Translation of light-harvesting complex expression during photo acclimation to high-light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 44: 857-865.
- Meseck, S. L.; Alix, J. H.; Wikfors, G. H. 2005. Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by aquaculture feed microalgae, *Tetraselmis chui* (PLY 429). *Aquaculture*. 246: 393-404.
- Olaizola, M. 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*. 20: 459-466.
- Ono, E. A. e Kubitza, F. 2003. *Cultivo de peixes em tanques-rede*. 3. Ed. Jundiaí: F. Kubitza, 112p.
- Oukarroum, A.; EL madidi, S.; Schansker, G.; Strasser, R. J. 2007. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll a fluorescence OJIP under drought stress and re-watering. *Environmental and Experimental Botany*. 60: 438-446.

- Peçanha, A. L. 2010. Metabolismo fotossintético, crescimento e estado nutricional do mamoeiro (*Carica papaya* L.) em resposta à condutividade elétrica da solução de cultivo. Tese (Doutorado em Produção Vegetal), Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes-RJ, 131p.
- Penteado, D. M. R. Estudos da otimização do meio de cultura para a microalga *Phaeodactylum tricornutum* na produção de lipídios. Curitiba, 2010. 101f. (Dissertação de Pós-Graduação em Bioquímica)-São Carlos, Universidade de São Carlos.
- Proença, C. E. M. E Bittencourt, P. R. L. 1994. Manual de piscicultura tropical. Brasília: IBAMA.
- Ribeiro, M. S. 2012. Efeitos da aplicação diferencial de água no substrato sobre a capacidade fotossintética, relações hídricas e crescimento inicial em cana-de-açúcar. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes-RJ, 133p.
- Rocha, J. M. S.; Garcia, J. E. C. E Henriques, M. H. F. 2003. Growth aspects of the marine microalgae *Nannochloropsis gaditana*. *Biomolecular Engineering*. 20: 237-242.
- Sipaúba-Tavares, L. H. e Braga, F. M. S. 2007. Feeding activity of *Colossoma macropomum* larvae (tambaqui) in fishpond with water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) fertilizer. *Braz. Journal Biology*. 67: 459-466.
- Sipaúba-Tavares, L. H.; Coral Ibarra, L. C.; Fioresi, T. B. 2009. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (REISCH) KORSIKOV (CHLOROPHYTA) em laboratório utilizando meio CHU12 e de macrófita com NPK. *Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo*. 35(1): 111-118.

- Sipaúba-Tavares, L. H.; Pelicione, L. C. e Oliveira, A. 1999. Use of organic (NPK) and the CHU12 medium for cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* in laboratory. *Revista Brasileira de Biologia*. 1: 10-15.
- Sipaúba-Tavares, L. H.; Rocha, O. 1993. Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes: I, Algas clorofíceas. *Biotemas*, Florianópolis. 6(1): 93-106.
- Sipaúba-Tavares, L. H.; Rocha, O. 2003. Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes: I – algas clorofíceas. *Biotemas*, Florianópolis. 6(1): 93-106.
- Stirbet, A. e Govindjee. 2011. On the relation between the Kautsky effect (Chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology B. Biology*. 104: 236-257.
- Strasser, B. J. e Strasser, R. J. 1995. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test. In: Mathis, P. (Ed), *Photosynthesis: From Light to Biosphere*, vol. V. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands. p. 977-980.
- Strasser, B. J. e Tsimilli-Michel, M. 2001. Stress in plants, from daily rhythm to global changes, detected and quantified by the JIP-test. *Chimie Nouvelle* 75. p. 3321-3326.
- Strasser, B. J.; Srivasta, A.; Tsimilli-Michel, M. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Yunus, M.; Pathre, U.; Mohanty, P. (eds), *Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation*. London, Taylor and Francis, p. 445-483.



- Strasser, B. J.; Srivasta, A.; Tsimilli-Michel, M. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In: Yunus, M.; Streck, N. A., 2003. Stomatal response to water vapor pressure deficit: an unsolved issue. *Revista Brasileira de Agrociência*. Pelotas. 9(4): 317-322.
- Strasser, B. J.; Srivasta, A.; Tsimilli-Michel, M. 2004. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In: Papageorgiou, G., Govindjee (eds.), *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Vol 19: Chlorophyll fluorescence: a Signature of photosynthesis. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, p. 321-362.
- Tedesco, M.J.; Gianello, C.; Bissani, C.A.; Bohnen, H.; Volkweiss, S.J. *Análise de solo, plantas e outros materiais*. 2.ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p.
- Thomaz, L. A.; Oshiro, L. M. Y.; Bambozzi, A. C.; Seixas Filho, J. T. de; Rosadas, L. A. S. 2004a. Substituição de *Artemia* sp. pelo rotífero *Brachionus plicatilis* na larvicultura do camarão-d'água-doce (*Macrobrachium rosenbergii* De Man, 1879). *Revista Brasileira de Zootecnia*. 33(6): 1928-1933.
- Thomaz, L. A.; Oshiro, L. M. Y.; Bambozzi, A. C.; Seixas Filho, J. T. 2004b. Desempenho Larval do Camarão de Água Doce (*Macrobrachium rosenbergii* De Man, 1879) Submetido a Diferentes Regimes Alimentares. *Revista Brasileira de Zootecnia-Brazilian Journal Of Animal Science*, Viçosa-Minas Gerais. 33(6): 1934-1939.
- Uribe, E. 1989. Cultivo de microalgas. In: *Curso Internacional sobre Cultivo de Microalgas*, 2, Coquimbo: Universidad Católica Del Norte. 39-84p.
- Xu, H.; Miao, X. L.; Wu, Q.Y. 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J Biotechnol* 126:499–50.

#### 4. CONCLUSÕES GERAIS

O Experimento I objetivou avaliar crescimento populacional e o valor proteico do cultivo misto de *Ankistrodesmus* sp. e *Scenedesmus* sp., em laboratório, sob efeito de três adubos comerciais N-P-K (25-05-15) + 11% de S (enxofre) mistura de grânulos, (em concentração de 1g, 5g e 10g de adubo L<sup>-1</sup>), N-P-K (15-9-12) granulado de liberação lenta (em concentração de 1g, 5g e 10g de adubo L<sup>-1</sup>) e N-P-K (18-18-18) (em concentração de 1g, 5g e 10g de adubo L<sup>-1</sup>) solubilizados em água destilada testados nas microalgas continentais estudadas.

Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que:

- As chlorophyceae *Ankistrodesmus* sp., e *Scenedesmus* sp., adaptaram-se às condições de cultivo misto em laboratório realizadas neste trabalho. Esses gêneros apresentaram, em laboratório, rápido crescimento populacional, atingindo altas densidades, além de suportarem o manejo realizado. O perfil químico demonstrou alto valor proteico, sugerindo que

podem ser utilizadas diretamente como alimento para organismos aquáticos;

- A utilização de um meio de cultura alternativo (N-P-K) pode reduzir custos quando comparado ao meio de cultura tradicional (CHU<sub>12</sub>), sem prejuízos no crescimento populacional do número de células algáceas. Os sistemas empregados neste trabalho para a concentração das microalgas necessitam de maiores estudos, apresentando dificuldades quanto ao rendimento e à coleta do material concentrado;
- Necessidade na realização de pesquisas em cultivo em larga escala para uma maior massa algácea para realização completa da composição química das microalgas em cultivo misto, sugerindo a utilização direta como alimento para organismos aquáticos.

Futuros estudos são necessários para o aprimoramento das técnicas de utilização dos fertilizantes comerciais N-P-K devido à falta de tecnologia na produção das microalgas continentais para utilização como alimentação dos organismos aquáticos, viabilizando com maior autonomia a produção comercial nos cultivos das microalgas.

O Experimento II objetivou avaliar o crescimento populacional, o valor proteico e a capacidade fotoquímica da microalga *Volvox* sp., em laboratório, o efeito de dois fertilizantes químicos comerciais N-P-K (15-9-12) granulado de liberação lenta (em concentração de 10g de adubo L<sup>-1</sup>) e N-P-K (15-05-30) (em concentração de 10g de adubo L<sup>-1</sup>) solubilizados em água destilada submetidos sob o efeito de diferentes tipos de espectros de luz (Espectro de luz Branca, Espectro de luz Azul e o Espectro de luz Vermelha).

Os resultados encontrados neste trabalho sugerem que:

- A microalga chlorophyceae do gênero *Volvox* sp., possui grande potencial de crescimento populacional e capacidade fotoquímica nas condições de cultivo em laboratório, atingindo altas densidades, além de suportarem o manejo realizado. O perfil químico demonstrou valor proteico satisfatório, sugerindo que podem ser utilizadas diretamente como alimento para organismos aquáticos;
- *Volvox* sp. obteve melhor crescimento celular (número de células mL<sup>-1</sup>) em meio de cultivo utilizando os adubos comerciais(15-09-12) e (15-05-30) na solução de 10g L<sup>-1</sup>, no espectro de Luz azul. Podendo ser cultivada em um meio de cultura alternativo (N-P-K), reduzindo possivelmente custos quando comparado ao meio tradicional utilizado (CHU<sub>12</sub>);
- Necessidade na realização de pesquisas em cultivo em larga escala para produção de maior massa algácea para realização completa da composição química da microalga estudada, sugerindo a utilização direta como alimento para organismos aquáticos;

- *Volvox sp.* apresentou satisfatório valor proteico associado à capacidade fotoquímica utilizando os fertilizantes químico (15-05-30) e (15-09-12) em espectro de Luz branca, sugerindo a possibilidade em ser utilizada diretamente como alimento para organismos aquáticos.

Futuros estudos são necessários para o aprimoramento das técnicas de utilização dos fertilizantes comerciais N-P-K devido à falta de tecnologia na produção da microalga continental do gênero *Volvox* para utilização como alimentação dos organismos aquáticos, viabilizando com maior autonomia a produção comercial nos cultivos das microalgas.

## 5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamsson, M. 2000. Potential use of human urine by greenhouse culturing of microalgae (*Scenedesmus acuminatus*), zooplankton (*Daphnia magna*) and tomatoes (*Lycopersicon*). **Ecological Engineering**. 16(2): 243-254.
- Ahlgren, G.; Gustafsson, I. B.; Boberg, M. 1992. Fatty acid content and chemical composition of freshwater microalgae. **Journal Phycology**. 28: 37-50.
- Ahlgren, G.; Lundstedt, L.; Brett, M.; Forsberg, C. 1990. Lipid composition and food quality of some freshwater phytoplankton for cladoceran zooplankters. **Journal of Plankton research**. 12(4): 809-818.
- Arredondo-Figueroa, J. L.; Lara-Isassi, G.; Alvarez-Hernandez, S. 1998. Liquid manure as a culture médium for three species of *Chlorella* (Chlorophyta), Cryptogamie. **Algology**. 19(3): 229-235.

Barros, H.; Valenti, W. C. **Comportamento alimentar do camarão de água doce, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879) durante a fase larval.** 1996. 100f. Tese (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

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

Beltrão, M. I. 1992. **Cultivo de algas clorofíceas (*Ankistrodesmus densus*, *Chorella vulgaris* e *Scenedesmus bijugatus*) em resíduos líquidos de indústria de suco de laranja concentrado.** 1992 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

Bertolin, T. B. P., Costa, J. A. V., Bertolin, T. E., Colla, L. M. & Hemkemeier, M. 2005. Cultivo da cianobactéria *Spirulina platensis* a partir de efluente sintético de suíno. **Ciência agrotécnica**, Lavras. 29(1): 118-125.

Bhattacharya, D.; Medlin, L. 1998. **Plant. Physiology.** 9:116.

Bicudo, C. E. M; Menezes, M. Gênero de algas continentais do Brasil (chave para identificações e descrições). 2. ed., São Carlos: Editora Rima, 2006, 502p.

Boersma, M.; Vijverberg, J. 1996. Food effect on life history traits and seasonal dynamics of *Ceriodaphnia pulchella*. **Freshwater Biology.** 35: 25-34.

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

- Borges, L.; Faria, B. M.; Odebrecht, C.; Abreu, P. 2007. Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas usadas na aquicultura: Primeiros passos para o desenvolvimento de um “mecanismo de desenvolvimento limpo”. **Atlântica**. 29(1): 35-46.
- Borowitzka, M. A. 1992. Algal biotechnology products and process-matching Science and economics. **Journal of Applied Phycology**. 4: 267-279.
- Borowitzka, M. A. & Borowitzka, L. J. 1988. **Microalgal Biotechnology**. Cambridge University Press, Cambridge, U. K. 197-221.
- Borowitzka, M. A. 1997. Microalgae for aquaculture: opportunities and constrains. **Journal. appl. Phycol**. 9: 393-401.
- Brett, M. T. e Müller-Navarra, D. C. 1997. The role of highly unsaturated fatty acids in aquatic food web processes. **FreshwBiol** 38:483–500
- Brett, M. T.; Müller-Navarra, D. C. 1997. The role of highly unsaturated fatty acids in foodweb processes. **Freshwater Biology**. 38: 483-499.
- Brown, M. R. & Robert, R. 2002. Preparation and assessment of microalga concentrates as feeds for larval and juvenil e Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). **Aquaculture**. 207: 289-309.
- Brown, M. R. 2002. Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. *In*: CRUZ-SUÁRES, L. E., RICQUE-MARIE, D., TAPIA-SALAZAR, M., GASCIOLA-CORTÉS, M. G., SIMOES, N. Avances in nutrición acuícola. **VI Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición acuícola**. Cancún, Quintana Roo, México.
- Brown, M. R; Jeffrey, S. W; Volkman, J. K. & Dunstan, G. A. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, 151 (14): 315-331p.
- Buelma, G.; Bhattarai, K. K.; De La Noüe, J.; Taiganides, E. P. 1990. Evaluation of various flocculants for the recovery of algal biomass grown on pig wast. **Biological Wastes**. 31: 211-222.



- Cabrales, M. M. Q.; González, M. F. 2004. Utilización de residual aviar como fuente de nutrientes en cultivos de microalgas. **Medisan**, Santiago de Cuba. 8(3): 27-31.
- Carié, J. M.; Njri, S.; Skaramuca, B. 1993. Dietary effects different feeds on the biochemical composition of the rotifer (*Brachionus plicatilis*, Müller). **Aquaculture**, Amsterdam. 110: 141-150.
- Chen, C. Y.; Folt, C. L. 1993. Measures of food quality as demographic predictors in freshwater copepods. **Journal of Plankton Research**. 15(11): 1247-1261.
- Chen, Y. M.; Liu, J. C.; Ju, Y. 1998. Flotation removal of algal from water. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. 12: 49-55.
- Coutteau, P. (1996) Microalgae. In: Manual on the production and use of live food for aquaculture. Lavens, P. and Sorgeloos, P., (Eds). FAO Fisheries Technical Paper, 361: 7-48.
- Coutteau, P.; Sorgeloos, P. 1992. The use of algal substitutes and the requirement for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve mollusks: an international survey. **Journal Shellfish Research**. 11:467-476.
- Cowgill, V. M.; Meating, K. I.; Takahashi, I. T. 1985. Fecundity and longevity of *Ceriodaphnia dubia affinis* in relation to diet at two different temperatures. **Journal Crustacean Biology**. 5: 420-429.
- Derner, R. B. 2006. **Efeitos de fontes de carbon no crescimento e na composição química das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *T. fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poli-insaturados**. Tese (curso de pós-graduação em Ciências de alimentos-Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos), Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina.

- Dismukes, G. C.; Carrieri, D.; Bennette, N.; Ananyev, G. M.; Posewitz, M. C. 2008. Aquatic phototrophs: efficient alternatives to land-based crops for biofuels. **Current Opinion in Biotechnology**. 19: 235-240.
- Elendt, B. H. 1989. Effects of starvation on growth, reproduction, survival and biochemical composition of *Daphnia magna*. **Arch. Hydrobiology**. 116(4): 415-433.
- Esteves, F. de A. 1998. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro, Interciência. 602p.
- Esteves, F. A. 2011. **Fundamentos de Limnologia**. 3.ed. Rio de Janeiro, Interciência. 620p.
- Fábregas, J.; Otero, A.; Morales, E. D.; Arredondo-Veja, B. O.; Patiño, M. 1998. Modification of the nutritive value of *Phaeodactylum tricornutum* for *Artemia* sp. in semicontinuous cultures. **Aquaculture**. 169: 167-176.
- Falkowski, P. G. & Raven, J. A. 1997. Aquatic Photosynthesis. U.S.A., Blackwell Science. 374p.
- Faria, A. C. E. A. de; Hayashi, C.; Soares, C. M.; Furuya, W. M. 2001. Dinâmica da comunidade fitoplanctônica e variáveis físicas e químicas em tanques experimentais submetidos a diferentes adubações orgânicas. **Acta Scientiarum**, Maringá. 23(2): 291-297.
- Ferreira, S. P.; Souza-Soares, L.; Costa, J. A.V. 2013. Revisão: microalgas: uma fonte alternativa na obtenção de ácidos gordos essenciais. **Revista de Ciências Agrárias**, 36(3): 275-287.
- Fioresi, T. B. e Sipaúba-Tavares, L. H. 2008. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (CHLOROPHYTA) em laboratório à base de esterco suíno. **Biotemas**, 21 (1): 7-16.

- Galvão, M. S. N.; Barreto, O. J. S.; Yamanaka, N. 1998. Cultivo intensivo dos rotíferos *Brachionus plicatilis* O. F. Muller, 1786 e *Brachionus rotundiformis* Tschugunoff, 1921 (Rotifera, Brachionidae). **Boletim Técnico**, São Paulo. 24: 1-15.
- Giani, A. 1991. The nutritive value of different algae as food for two *Daphnia* species. **Ver. Internat. Verein. Limnol.** 24: 2788-2791.
- Goldman, J. C. 1979. Outdoor algal mass cultures. I: Applications. **Water Research**, 13: 85-94.
- Graham, L. E. e Wilcox L. W. 2000. Cyanobacteria (Chloroxybacteria) Algae. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice-Hall, 97-131.
- Gulati, R. M.; Demott, W. R. 1997. The role of food quality for zooplankton: remarks on the state-of-art, perspectives and priorities. **Freshwater biology**. 38: 753-768.
- Happey-Wood, C. M. Ecology of freshwater planktonic green algae. In: Sandgren, C. D. (ed). Growth and reproduction strategies of freshwater phytoplankton. Cambridge: Syndicate of the University of Cambridge, 1988. P. 175-226.
- Hardy, E. R.; Castro, J. G. 2000. Qualidade nutricional de três espécies de clorófitas cultivadas em laboratório. **Acta Amazonica**. 30: 39-47.
- Hirayama, K.; Nakamura, K. 1976. Fundamental studies on the physiology of rotifers in mass culture – V. dry *Chlorella* powder as a food for rotifers. **Aquaculture**, Amsterdam. 8(4): 301-307.
- Hou, X.; Yan, X. 1998. Study on the concentration and seasonal variation of inorganic elements in 35 species of marine algae. **The Science of Total Environment**. 222: 141-156.

- Infante, A. G. El plâncton de las águas continentales. Washington: The General Secretariat of the Organization of American States, 1988. 130p.
- Infante, A.; Litt, A. H. 1985. Differences between two species of *Daphnia* in the use of 10 species of algae in Lake Washington. **Limnology Oceanogr.** 30(5): 1053-1059.
- Jusiak, M. P.; Duszota, M.; Matusiak, K.; Mycielski, R. 1984. Intensive culture *Chlorella vulgaris* as the second stage of biological purification of nitrogen industry wastes waters. **Water Res.** 18: 1-7.
- Kawamura, K. and Sakaguchi, F. 1999. Molecular distributions of water soluble dicarboxylic acids in marine aerosols over the Pacific Ocean including tropics', **Journal of Geophysical Research-Atmospheres**, 104, 3501-3509.
- Kerfoot, W. C.; De Mott, W. R.; De Angelis, D. L. 1985. Interaction among cladocerans: food limitation and exploitative competition. **Arch. Hydrobiolgy Beih. Ergebn. Limnol.** 21: 431-451.
- Kibria, G.; Nugegoda, D.; Fairclough, R.; Lam, P.; Bradly, A. 1997. Zooplankton: Its biochemistry and significance in aquaculture. **Naga The ICLARM Quarterly.** April-june, p. 9-15.
- Kilhan, S. S.; Kreeger, D. A.; Goulden, C. E.; Lynn, S. G. 1997. Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*. **Freshwater Biology.** 38: 591-596.
- Kurano, N. Ikemoto, H. Miyashita, H. Hasegawa, T. Hata, H. Miyachi, S. 1995. Fixation and utilization of carbon dioxide by microalgal photosynthesis. **Energy Convers. Mgmt.** 36: 6-9.
- Laing, I. e Ayala. 1991. Commercial mass culture techniques for producing microalgae. *In*: Akatsuka, I. (ed.) **Introduction to applied Phycology.** SPB, The Hague, Netherlands, p. 447-477.

- Lavens, P. & Sorgeloos, P. 1996. Manual on the production and use of live food for aquacultures. **FAO (Fisheries Technical Paper)**. Rome, FAO. (361): 295p.
- Lee, R.E. 1989. **Phycology**. Cambridge University Press, Cambridge.
- Li, Y.; Horsman, M.; Wu, N.; Lan, C. Q.; Dubois-Calero, N. 2008. Biofuels from Microalgae. **Biotechnology. Prog.** 24(4): 815-820.
- Lourenço, S. O. 2006. **Cultivo de microalgas marinhas**-princípios e aplicações, Rima Editora, São Carlos, 588p.
- Lubián, L. 1989. Concentrate cultured marine microalgae with Chitosan. *Aquaculture*. 8: 257-265.
- Lürling, M.; de Lange, H. J.; Van Donk, E. 1997. Changes in food quality of the green algae *Scenedesmus* induced by *Daphnia* infochemicals: Biochemical composition and morphology. **Freshwater Biology**. 38: 619-628.
- Macedo, C. F. 1999. **O estudo da qualidade nutricional de duas espécies de cladóceros em relação às clorofíceas *Ankistrodesmus gracilis* e *Scenedesmus quadricauda***. Belo Horizonte. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Minas Gerais.
- Macedo, C. F.; Pinto-Coelho, R. M. 2000. a Taxas de filtração de *Daphnia laevis* e *Moina micrura* em relação às clorofíceas *Scenedesmus quadricauda* e *Ankistrodesmus gracilis*. **Acta Limnol. Bras.** 12: 1-10.
- Macedo, C. F.; Pinto-Coelho, R. M. 2000. b Efeito das algas *Ankistrodesmus gracilis* e *Scenedesmus quadricauda* no crescimento e no índice lipídico de *Daphnia laevis* e *Moina micrura*. **Acta Scientiarum**, 22(2): 397-401.
- Margalef, R. 1995. **Ecologia**. Barcelona, Omega S.A., 958p.
- Morales, J.; de La Noüe, L.; Picard, G. 1985. Harvesting marine microalgae species by Chitosan flocculation. **Aquacultural Engineering**. 4: 257-270.

- Muller-Fuega, A.; Moal, J. e Kaas, R. 2003. The Microalgae of Aquaculture. *In*: "Live Feeds in Marine aquaculture" (Stottrup, J. G. and McEvoy L. A., eds.), p.206-252. Blackwell Publishing. Oxford, UK.
- Nayar, S.; Hegde, S.; Rao, P. S.; Sudha, P. 1998. Live organisms as feed in aquaculture. **INFOFISH International**, Malásia. 4: 36-40.
- Nunes, M. 2005. **Avaliação da qualidade de pastas de microalgas produzidas em laboratório de larvicultura de moluscos no Sul do Brasil**. 2005. 35 f. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC.
- Ohse, S.; Dener, R. B.; Ozório, R. A.; Braga, M. V. da C.; Cunha, A, P.; Lamarca, C. P.; Santos, M. E. 2009. Produção de biomassa e teores de carbono, hidrogênio, nitrogênio e proteína em microalgas. **Ciência Rural**. 39: 1760-1767.
- Olaizola, M. 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**. 20: 459-466.
- Oliveira, H. T. de. 1995. Vinasse as substrate to culture *Chlorella vulgaris*. *In*: International Workshop on Microalgae and Aquatic Plants Culturing, 1995, **Anais...**, Habana, Cuba. 40p.
- Oliveira, O. S. B. C. 2009. **Optimização da produtividade lipídica da microalga *Arthrospira platensis* como matéria-prima para biocombustíveis**. 2009. 69 f. Dissertação (Mestrado em Bioenergia) - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal.
- Olivera, A.; Sipaúba-Tavares, L. H. Composição química das microalgas *Chaetoceros calcitrans* e *Tetraselmis tetraele* utilizados na larvicultura de *Farfantepenaeus paulensis*. *In*: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 11, 2000, Florianópolis, SC, **Anais...**, Florianópolis: SIMBRAQ, 2000. CD-ROM.

- Oswald, W. J. 1960. Light conversion: efficiency of algae grown in sewage. **J. San. Eng. Div.** July.
- Oswald, W. J; Golueke, G. G. 1968. Harvesting and processing of wastewater-grown microalgae. *In*: Jackson, D. F., ed. *Algae, man and the environment*. 1. ed., New York, USA, Syracuse Univ. Press. 371-389.
- Packer, M. 2009. Algal capture of carbon dioxide; biomass generation as a tool for greenhouse gas mitigation with reference to New Zealand energy strategy and policy. **Energy Policy**. 37(9): 3428-3437.
- Palmer, F. E.; Ballard, K. A. e Taub, F. B. A. 1975. Continuous culture apparatus for the mass production of algae. **Aquaculture**. 6: 319-331.
- Patil, V.; Tran, K. Q.; Giselrod, H. R. 2008. Towards sustainable production of biofuel from microalgae. **International Journal of Molecular Sciences**. 9(7): 1188-1195.
- Penteado, D. M. R. Estudos da otimização do meio de cultura para a microalga *Phaeodactylum tricornutum* na produção de lipídios. Curitiba, 2010. 101f. (Dissertação de Pós-Graduação em Bioquímica)-São Carlos, Universidade de São Carlos.
- Pereira, A. M. L. **Cultura em larga escala da microalga *Ankistrodesmus gracilis* (REINSCH) KORSIKOV (CHLOROPHYCEAE), e do microcrustáceo *Diaphanosoma birgei* (KORINECK, 1981) (CLADOCERA) em laboratório**. Jaboticabal, 2001 (Doctoral Thesis)-Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista.
- Pipes, W. O.; Gotas, H. B. 1960. Utilization of organic matter by *Chlorella* grown in sewage. **Appl. Microbiol.** 8: 163-169.

Portella, M. C. **Efeito da utilização de dietas vivas e artificiais enriquecidas com fontes de ácidos graxos essenciais, na sobrevivência, desenvolvimento e composição corporal de larvas e alevinos de curimatá *Prochilodus scrofa*** (Pisces, Prochilodontidae). São Carlos, 1995 (Doctoral Thesis)-Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos.

Pozuelo, M. 1975. Cultivo del rotífero “ *Brachionus plicatilis*”: obtención de un “zooplankton artificial”. **Publ. Tec. Junta Esc. Pesca.** 11: 401-416.

Queiroz, J. F, Lourenço J. N. P, Kitamura P. C. A. 2002 Embrapa e a aqüicultura: demandas e prioridades de pesquisa. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica.

Radmann, E. M. e Costa, J. A. V. 2008. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> e NO. **Quimica Nova.** 31(7): 1609-1612.

Radunz Neto, 2003. J. **Alimento natural versus ração balanceada na larvicultura de peixes.** 2003 Disponível em: <[www.sbz.org.br/eventos/PortoAlegre/homepagesbz/Radunz.htm](http://www.sbz.org.br/eventos/PortoAlegre/homepagesbz/Radunz.htm)>. Acesso em: 13 de junho de 2010.

Rainuzzo, J. R.; Olsen, Y.; Rosenlund, G. 1989. The effect of enrichment diets on the rotifer *Brachionus plicatilis*. **Aquaculture**, Amsterdam. 79: 157-161.

Raven, P. H.; Evert, R. F.; Eichhorn, S. E. 2001. **Biologia Vegetal.** 6 ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 906p.

Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R., & Olsen, Y. 1994. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae **J. Phycol.** 30: 972-979.

Repka, S. 1996. Inter-and intraspecific differences in *Daphnia* life histories in response to two food sources: the green alga *Scenedesmus* and the filamentous cyanobacterium *Oscillatoria*. **Journal of Plankton Research.** 18: 1213-1223.



- Rocha, O.; Duncan, A. 1985. The relationship between cell carbon and cell volume in freshwater algae species used in zooplanktonic studies. **Journal of Plankton Research**. 7(2): 279-294.
- Rocha, O.; Sipaúba-Tavares, L. H. 1994. Cultivo em larga escala de organismo planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes: II, organismos zooplanctônicos. **Biotemas**. 7(1/2): 94-109.
- Rodulfo, B. R.; Marmol, N. H.; Embralino, G. A. 1980. Production of *Chlorella* in clarified effluente from hog marine biogas digester. Phillip. **Journal. Sci.** 109: 51-58.
- Scott, A. P.; Baynes, S. M. 1978. Effect of algal diet and temperature on the biochemical composition of the rotifers, *Brachionus plicatilis*. **Aquaculture**, Amsterdam. 14(3): 247-260.
- Shaw, W. N. 1979. The use of phytoplankton for aquaculture needs- a status report. 19-24p.
- Sicko-Goad, L.; Andersen, N. A. 1991. Effect of growth and light/dark cycles on diatom lipid content and composition. **Journal Phycol.** 27: 710-718.
- Silva, F. C.; Pereira, A.; Canozzi, M. B.; Araújo, S. C. 2004. Cultivo de microalgas marinhas. In: POLI, C.R.; POLI, A.T.B.; ANDREATTA, E.; BELTRAME, E. (Org.). **Aquicultura: experiências brasileiras**. Florianópolis: Multitarefa Editora. 93-120.
- Sipaúba-Tavares, L. H. 2005. **Uso racional da água: limnologia e plâncton**. 2005. 217 f. Tese (Livre - Docência) - Centro de Aqüicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-SP.
- Sipaúba-Tavares, L. H. & Braga, F. M. S. 1999. Study on feeding habits of *Piaractus mesopotamicus* (pacu) larvae in fish ponds. **NAGA The ICARM Quarterly**. 22(1): 24-29.

- Sipaúba-Tavares, L. H. 1988. **Utilização do plâncton na alimentação de larvas e alevinos de peixes**. São Carlos. Tese (Doutorado)-Universidade Federal de São Carlos.
- Sipaúba-Tavares, L. H. e Bachion, M. A. 2002. Population growth and development of two species of cladocera, *Moina micrura* and *Diaphanosoma birgei*, in laboratory. **Braz. Journal Biology**. 62: 701-711.
- Sipaúba-Tavares, L. H.; Bachion, M. A. 2001. Influence of dietary habits (algae+supplement) on laboratory population growth and development of two species of Cladocera, *Moina micrura* and *Diaphanosoma birgei*. **Revista Brasileira de Biologia**. (in press).
- Sipaúba-Tavares, L. H.; Bachion, M. A.; Rocha, O. 1994. Estudo do crescimento populacional de três espécies zooplanctônicas em laboratório e o uso do plâncton na alimentação de alevinos de *Oreochromis niloticus* (tilápia) e *Astyanax scabripinis paranae* (lambari). **Revista UNIMAR**. 16(3): 189-201.
- Sipaúba-Tavares, L. H.; Pereira, A. M. L. 2008. Cultivo em large escala de *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) and *Diaphanosoma birgei* Korinek, 1981 (Cladocera) em laboratório. **Braz. J. Biol.** 68(4): 875-883.
- Sipaúba-Tavares, L. H.; Coral Ibarra, L. C.; Fioresi, T. B. 2009. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (REISCH) KORSIKOV (CHLOROPHYTA) em laboratório utilizando meio CHU<sub>12</sub> e de macrófita com NPK. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo. 35(1): 111-118.
- Sipaúba-Tavares, L. H.; Pelicione, L. C. e Oliveira, A. 1999. Use of organic (NPK) and the CHU<sub>12</sub> medium for cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* in laboratory. **Revista Brasileira de Biologia**. 1: 10-15.

- Sipaúba-Tavares, L. H.; Rocha, O. 2001. **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. São Carlos: RiMa. 106p.
- Sipaúba-Tavares, L. H.; Rocha, O. 1993. Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes: I, Algas clorofíceas. **Biotemas**, Florianópolis. 6(1): 93-106.
- Sipaúba-Tavares, L. H.; Rocha, O. 2003. Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes: I – algas clorofíceas. **Biotemas**, Florianópolis. 6(1): 93-106.
- Solari, C. A. 2008. *Volvox Barberi*, The fastest swimmer of the Volvocales (CHLOROPHYCEAE). **Journal Phycol.** 44, 1395-1398.
- Sterner, R. W.; Hagemeyer, D. D.; Smith, R. F.; Smith, W. L. 1992. Lipid-ovary indices in food-limited *Daphnia*. **Journal Plankton of Research.** 14(10): 1449-1460.
- Tavares, L. H. S.; Matsumura-Tundisi, T. 1984. Feeding in adult females of *Argyrodiaptomus furcatus* (Sars, 1901), Copepoda-Calonioda, of Lobo Reservoir (Broa), São Carlos, São Paulo, Brazil. **Hidrobiologia.** 113: 15-23.
- Thomaz, L. A.; Oshiro, L. M. Y.; Bambozzi, A. C.; Seixas Filho, J. T. de; Rosadas, L. A. S. 2004a. Substituição de *Artemia* sp. pelo rotífero *Brachionus plicatilis* na larvicultura do camarão-d'água-doce (*Macrobrachium rosenbergii* De Man, 1879). **Revista Brasileira de Zootecnia.** 33(6): 1928-1933.
- Thomaz, L. A.; Oshiro, L. M. Y.; Bambozzi, A. C.; Seixas Filho, J. T. de. 2004b. Desempenho Larval do Camarão de Água Doce (*Macrobrachium rosenbergii* De Man, 1879) Submetido a Diferentes Regimes Alimentares. **Revista Brasileira de Zootecnia-Brazilian Journal Of Animal Science**, Viçosa-Minas Gerais. 33(6): 1934-1939.

- Venkataraman, L. V.; Becker, E. W. 1985. **Biotechnology & utilization of algae-The Indian experience**. Mysore: Central Food Technological Research Institute.
- Watanabe, T.; Kitajima, C.; Fujita, S. 1983. Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. **Aquaculture**. 34: 115-143.
- Wong, M. H.; Lay, C. C. 1980. The comparison of soy-bean wastes, used tea leaves and sewage for growing *Chlorella pyrenoidosa*. **Environ. Pollut.** 23: 247-259.
- Zhu, X. G.; Long, S. P. e Ort, D. R. 2008. What is the maximum efficiency with photosynthesis can convert solar energy into biomass? **Curr Opin Biotechnology**. 19: 153-159.