

CULTIVO DE *Ankistrodesmus gracilis* (REISCH) KORSIKOV (CHLOROPHYTA) EM LABORATÓRIO UTILIZANDO MEIO CHU₁₂ E DE MACRÓFITA COM NPK

Lúcia Helena SIPAÚBA-TAVARES ¹; Luiz C. Coral IBARRA ²; Tatiana Betioli FIORESI ¹

RESUMO

O objetivo do trabalho foi testar a influência de dois meios de cultura, um meio comercial CHU₁₂, e o outro à base de fertilizante químico NPK (20-5-20) associado com extrato de macrófita (*Eichhornia crassipes*) no desenvolvimento da microalga *Ankistrodesmus gracilis*, avaliando a taxa de crescimento, qualidade dos meios cultivados e valor nutricional. *A. gracilis* em meio macrófita+NPK apresentou densidade celular média (333 x10⁵ células/mL) maior que o meio CHU₁₂ (302 x10⁵ células/mL). O teor de proteína (12,52%PS), peso seco (397 x 10⁷pg/célula) e cinzas (4,08 x10⁷ pg/célula) de *A. gracilis* foi maior (p<0,05) no meio macrófita+NPK, já lipídios, carboidrato e fibra foram similares (p>0,05) nos dois meios utilizados. Em relação às variáveis hidrológicas do meio de cultivo de *A. gracilis* somente o oxigênio dissolvido e CO₂ livre não apresentaram diferença significativa (p>0,05) entre os dois meios utilizados. *A. gracilis* em meio à base de macrófita+NPK apresentou valor nutricional similar ao meio comercial CHU₁₂, mostrando bons resultados para o crescimento desta alga, podendo ser utilizado o meio de macrófita para cultivo desta alga em larga escala na alimentação de larvas de peixes.

Palavras-chave: alga; crescimento; aspectos biológicos; valor nutricional

Ankistrodesmus gracilis (REISCH) KORSIKOV (CHLOROPHYTA) LABORATORY CULTURED IN CHU₁₂ AND MACROPHYTE WITH NPK MEDIA

ABSTRACT

Two different culture media, namely CHU₁₂ and inorganic fertilizer NPK (20-5-20) associated with macrophyte (*Eichhornia crassipes*) extract, were used to evaluate the development of *A. gracilis*. Growth rate, development, nutritional value and medium water quality were analyzed. *A. gracilis* in macrophyte+NPK medium had mean cell density (333x10⁵ cells/mL) higher than medium CHU₁₂ (302 x10⁵ cells/mL). Protein rate (12.52%PS), dry weight (397 x 10⁷pg/cell) and ashes (4.08 x10⁷ pg/cell) in *A. gracilis* was higher (p<0.05) than medium macrophyte+NPK. On the other hand, lipids, carbohydrates and fibers had the same rate (p>0.05) in both media. When hydrological variables in the culture medium of *A. gracilis* are taken into account, dissolved oxygen and free CO₂ alone failed to have any significant difference (p>0.05) between the media employed. *A. gracilis* in the macrophyte+NPK medium had the same nutritional rate as the commercial medium CHU₁₂, with excellent results for alga growth. Macrophyte medium may be used for large scale alga culture in the feed of fish larvae.

Key words: algae; growth; biological aspects; nutritional content

Artigo Científico: Recebido em: 30/07/2007 - Aprovado em: 13/05/2009

¹ Universidade Estadual Paulista (UNESP), Centro de Aqüicultura. Via de Acesso Prof. Paulo D. Castellane s/n,- CEP: 14884-900 - Jaboaticabal - SP - Brasil. e-mail:sipauba@caunesp.unesp.br

²Universidad de Nariño, Facultad de Ciencias Pecuarias, Ciudad Universitaria Torobajo, San Juan de Pasto, Nariño, Colombia.

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).

Um dos principais problemas do cultivo em massa de microalgas para alimentação de organismos aquáticos é o custo dos reagentes químicos necessários para a preparação dos meios de cultivo. Assim, meios alternativos de baixo custo pode ser a saída para 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 *et al.*, 1999; HARDY e CASTRO, 2000; ADAMSSON, 2000; KNUCKEY *et al.*, 2006; XU *et al.*, 2006).

A utilização de meio de cultivo para microalga clorofícea contendo plantas aquáticas e NPK (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA, 1993) pode servir de importante fonte alternativa por apresentar concentrações elevadas de nitrogênio, fósforo e potássio (SIPAÚBA-TAVARES e BRAGA, 2007), essenciais ao desenvolvimento e crescimento das microalgas, com baixo custo e contribuindo para a reciclagem de resíduos de produtos biológicos.

O alimento vivo tem sido utilizado na alimentação de organismos aquáticos, porém, o custo de produção pode chegar a 30% do total da operação. Alternativas para reduzir o custo, mantendo o produto final com valor nutricional adequado para a manutenção e sustento destes organismos, têm gerado pesquisas que produzam algas de qualidade nutricional para posterior uso na aquicultura (SIPAÚBA-

TAVARES e BRAGA, 2007; SIPAÚBA-TAVARES e PEREIRA, 2008).

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

Dentre as microalgas de água doce cultivadas, as unicelulares da classe Chlorophyceae têm sido amplamente utilizadas na alimentação de organismos planctônicos e larvas de peixes, principalmente *Ankistrodesmus gracilis* demonstrando grande aceitação por organismos aquáticos, devido ao tamanho, forma, espessura da parede celular e fácil captura (HARDY e CASTRO, 2000; SIPAÚBA-TAVARES e BACHION, 2002; SIPAÚBA-TAVARES e BRAGA, 1999, 2007).

O objetivo deste estudo foi avaliar o cultivo da microalga *Ankistrodesmus gracilis* em laboratório estudando a biologia da espécie, composição química e qualidade do meio de cultura, usando dois tipos de meio de cultivo, um comercial, CHU₁₂, e outro alternativo, a base de macrófita (*Eichhornia crassipes*), com NPK.

MATERIAL E MÉTODOS

Manutenção e Meios de Cultivo para Ankistrodesmus gracilis

A microalga *Ankistrodesmus gracilis* foi proveniente da Universidade Federal de São Carlos, linhagem nº 005CH, isolada da Represa do Broa (São Carlos, SP, Brasil) e posteriormente, cultivada no Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton (LLPP - UNESP/CAUNESP, Jaboticabal, SP, Brasil) em sistema de cultivo estático não axênico, com aeração constante. A temperatura manteve-se a 22 ± 2,0°C, em regime de luz D light a 24,12 µE/cm²/s e foto período de 24 horas.

Dois meios de cultivo foram utilizados, um comercial usualmente utilizado para algas de ambientes eutróficos o CHU₁₂ e outro elaborado no LLPP a base de NPK (20-5-20) (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA, 1993) associado com macrófita aquática *Eichhornia crassipes* (Mart.)

Solms (SIPAÚBA-TAVARES e BRAGA, 2007). Por meio de ensaios preliminares, foi escolhida a concentração de 2,5 mL de NPK em função do melhor desempenho de *A. gracilis*. Para a preparação do meio de macrófita cerca de cinco quilos de *E. crassipes* colhidas no "wetland" do CAUNESP (SIPAÚBA-TAVARES *et al.*, 2002), foram moídas e posteriormente fervidas em água destilada por uma hora. O extrato ainda quente foi filtrado e autoclavado a 120°C, durante 20 minutos. Após o resfriamento, foi retirada uma sub-amostra de 70 mL e completada para 1.300 mL de água destilada, acrescentando-se 2,5 mL de NPK e 100 mL de inoculo de *A. gracilis*, com densidade ao redor de 3×10^5 células/mL. Foi adicionado ao meio cerca de 0,1g/L de vitamina do complexo B (SIPAÚBA-TAVARES, 1995), com objetivo de incrementar o crescimento da alga. O experimento foi desenvolvido em triplicata durante 15 dias.

Crescimento

Na análise do crescimento de *A. gracilis* nos dois meios de cultivo utilizados, alíquotas de 1mL foram removidas diariamente, ao longo de 15 dias consecutivos e, $2 \times 1\mu\text{L}$ de sub-amostra foi contada em hemocitômetro de Neubauer. O total expresso em número de células/mL $\times 10^5$.

A velocidade de crescimento (K) foi obtida utilizando a fase exponencial da curva de crescimento, representada pelo número de divisões celulares da população por dia e o tempo de duplicação (Td) que representa o tempo em que se divide a população, também denominada de tempo de divisão ou geração, foi calculado sobre os resultados obtidos na velocidade de crescimento K (STEIN, 1973).

Composição Bioquímica

Ao final do experimento, ambos os meios de cultivo de *A. gracilis* foram concentrados em desnataadeira, liofilizado para análises de lipídeo, fibra, carboidrato, energia bruta e proteína, seguindo a metodologia proposta por A.O.A.C. (1990). Todas as determinações foram realizadas em tréplica.

Características Morfológicas de Ankistrodesmus gracilis

O peso seco foi determinado obtendo-se 10 mL de cada réplica, sendo colhidas duas vezes por

semana, e, filtradas em filtro de fibra de vidro (GFC 0,7 μm de tamanho de poro), previamente lavado em água destilada. Posteriormente, o filtro seco a 60°C foi submetido a pesagem, até peso constante. Para determinação do conteúdo de cinzas da alga, o material foi incinerado em mufla a 500°C, por 4 horas.

Qualidade do Meio de Cultivo

Algumas variáveis limnológicas foram analisadas para avaliar o efeito da qualidade da água no desenvolvimento e crescimento de *A. gracilis* cultivada em laboratório. As amostras de água foram monitoradas a cada três dias num total de cinco amostras para cada variável analisada. Todo o experimento foi conduzido em triplicata. As características hidrológicas como temperatura, pH e condutividade da água foram medidas utilizando aparelho digital Corning PS 16, PS 15 e PS 17, respectivamente. O oxigênio dissolvido, carbono inorgânico e alcalinidade foram determinados segundo GOLTERMAN *et al.* (1978) e MACKERETH *et al.* (1978). Amônia, nitrito, nitrato e ortofosfato de acordo com KOROLEFF (1976) e GOLTERMAN *et al.* (1978). A clorofila-*a* foi avaliada segundo NUSH (1980).

Análise Estatística dos Dados

Para análise estatística dos dados, foi estabelecido a forma de um delineamento inteiramente casualizado, constituído por dois tratamentos, com 3 repetições para cada um. Os dados foram comparados aplicando-se o teste de Tukey ao nível de 5% de significância utilizando para isto o sistema para análise estatística V. 2,0 - ESTAT.

RESULTADOS

O crescimento de *A. gracilis* foi similar nos dois meios cultivados, com a fase exponencial para o meio macrófita+NPK entre o 3^o e 12^o dia totalizando $525,02 \times 10^5$ células/mL e, para o meio CHU₁₂ entre o 5^o e 11^o dia com $447,93 \times 10^5$ células/mL, com posterior declínio em ambos os meios (Figura 1).

A taxa de crescimento no meio de macrófita+NPK só foi menor (K= 0,36) do que o meio CHU₁₂ na fase exponencial de crescimento, apresentando densidade celular

média maior (333×10^5 células/mL) que o meio CHU₁₂ (302×10^5 células/mL) (Tabela 1). O tempo de duplicação e taxa de crescimento de *A. gracilis* nos dois meios utilizados foram mais elevados na fase de ajuste (0,81 dias e

$K=0,56$, respectivamente) para o meio macrófita e para o CHU₁₂ os maiores valores foram observados na fase exponencial de crescimento (0,56 dias e $K=0,40$, respectivamente) (Tabela 1).

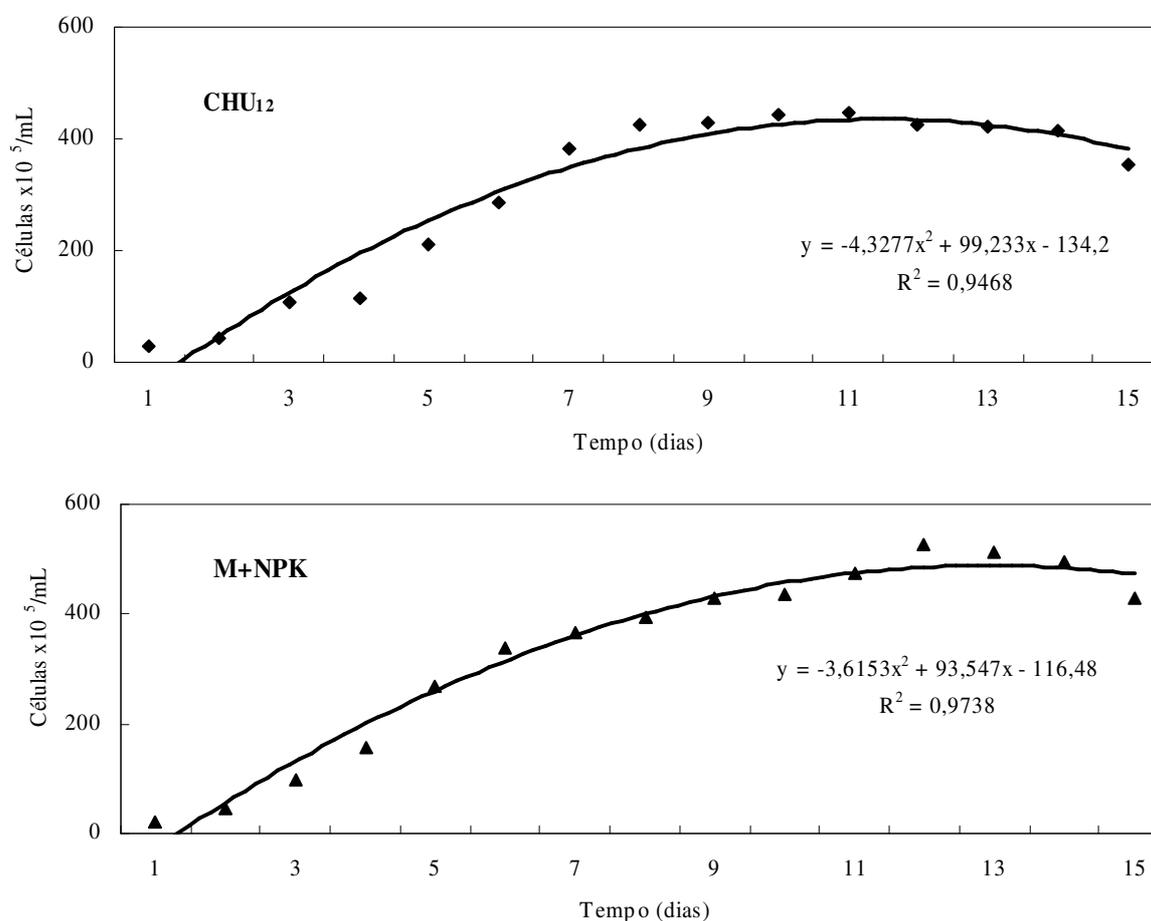


Figura 1. Curva de crescimento de *Ankistrodesmus gracilis* cultivada em meio CHU₁₂ e meio de macrófita + NPK (M+NPK)

O teor de proteína (12,52%PS), peso seco (397×10^7 pg/célula) e cinzas ($4,08 \times 10^7$ pg/célula) de *A. gracilis* foi maior ($p < 0,05$) no meio macrófita+NPK; já lipídios, carboidrato e fibra foram similares ($p > 0,05$) nos dois meios utilizados. A energia bruta foi elevada mantendo-se acima de 5.000 kg/L e similar ($p > 0,05$) nos dois meios estudados (Tabela 2).

Em relação as variáveis hidrológicas do meio de cultivo de *A. gracilis*, somente o oxigênio dissolvido e CO₂ livre não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre os dois meios utilizados.

Dentre os compostos nitrogenado, somente amônia foi detectada no meio CHU₁₂ com teores maiores ($p < 0,05$) do que no meio macrófita+NPK. O fósforo e ortofosfato também foram mais elevados ($p < 0,05$) no meio CHU₁₂, em função da concentração deste nutriente neste meio (CHU₁₂= 500mg/L e macrófita+NPK= 91 mg/L) (Tabela 3).

A condutividade foi maior ($p < 0,05$) no meio macrófita+NPK em função da presença de todos os nutrientes e também, associada ao fato de ser um meio constituído em grande parte (70%) de matéria orgânica (*E. crassipes*).

A alcalinidade, bicarbonato e carbonato foram influenciados diretamente pelo pH do meio. O teor de clorofila-*a* foi similar ($p > 0,05$) nos dois meios (Tabela 3).

Tabela 1. Valor médio das características de crescimento, tamanho, duplicação diária e clorofila-*a* de *Ankistrodesmus gracilis*, cultivada em frascos de vidro de 2L, onde AJ=fase de ajuste; EX=fase exponencial e RE=fase de redução de crescimento

Características de Crescimento da Microalga	Meios de Cultivo	
	CHU ₁₂	Macrófita+NPK
Densidade celular ($\times 10^5$ /mL)	302 \pm 157,57 b	333 \pm 173,58 a
Taxa de crescimento (k) AJ	0,29	0,56
Taxa de crescimento (k) EX	0,40	0,36
Taxa de crescimento (k) RE	0,03	0,13
Tempo de duplicação (dias) AJ	0,42	0,81
Tempo de duplicação (dias) EX	0,58	0,52
Tempo de duplicação (dias) RE	0,04	0,02

Letras distintas na linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Tabela 2. Valor nutricional de *Ankistrodesmus gracilis*, cultivada em frascos de vidro de 2L, onde: PS=peso seco

Características da Microalga	Meios de Cultivo	
	CHU ₁₂	Macrófita+NPK
Teor de proteína (%PS)	11,56 \pm 0,003 b	12,52 \pm 0,14 a
Lipídios (%PS)	25,56 \pm 1,10 a	25,80 \pm 0,88 a
Carboidrato (%PS)	52,2 \pm 1,21 a	52,85 \pm 0,55 a
Fibra (%PS)	10,68 \pm 1,83 a	8,83 \pm 0,23 a
Energia bruta (Kcal/kg)	5.247 \pm 418,19 a	5.060 \pm 304,41 a
Peso seco (10^7 pg/célula)	249 \pm 143,54 b	397 \pm 242,2 a
Cinzas (10^7 pg/célula)	2,89 \pm 0,45 b	4,08 \pm 6,09 a

Letras distintas na linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Tabela 3. Média e desvio padrão das variáveis hidrológicas analisadas nos meios de cultivo utilizados para o crescimento de *Ankistrodesmus gracilis*

Variáveis Hidrológicas	CHU ₁₂	Meio de Macrófita + NPK
Oxigênio Dissolvido (mg/L)	5,80 \pm 1,41 a	4,74 \pm 1,57 a
pH	7,51 \pm 0,36 a	6,91 \pm 0,44 b
Condutividade (μ S/cm)	230,67 \pm 67,98 b	381,33 \pm 44,8 a
Alcalinidade (mg/L)	84,13 \pm 3,18 a	31,33 \pm 8,71 b
Carbonato (mg/L)	0,33 \pm 0,32 a	0,02 \pm 0,03 b
Bicarbonato (mg/L)	106,39 \pm 48,22 a	40,34 \pm 11,87 b
CO ₂ livre (mg/L)	4,98 \pm 3,18 a	20,13 \pm 25,02 a
Clorofila- <i>a</i> (μ g/L)	74,38 \pm 10,40 a	74,38 \pm 10,80 a
Amônia (μ g/L)	341,77 \pm 373,14 a	90,22 \pm 101,62 b
Nitrito (μ g/L)	*	0,68 \pm 1,41
Nitrato (μ g/L)	*	144,23 \pm 25,17
Ortofosfato (μ g/L)	1.453,33 \pm 63,99 a	309,25 \pm 407,46 b
Fósforo total (μ g/L)	1.560 \pm 63,25 a	385,69 \pm 426,23 b

* não detectado pelo método.

Letras distintas na linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

DISCUSSÃO

O uso de meios alternativos, como NPK e macrófita, para o desenvolvimento e posterior crescimento em massa de algas como alimento para larvas e alevinos de peixes, são alternativas econômicas na produção de alimento vivo, garantindo alta rentabilidade, contribuindo com a reciclagem de produtos biológicos. A densidade de cultivo depende da espécie e do tipo de fertilizante utilizado, interagindo com as variáveis físico-químicas no desenvolvimento e crescimento da microalga (SIPAÚBA-TAVARES *et al.*, 1999).

A taxa de crescimento exponencial observada neste estudo foi maior que a obtida por SIPAÚBA-TAVARES e PEREIRA (2008) no cultivo de *A. gracilis* ($K=0,22$) em meio NPK com vitamina B. O crescimento de *A. gracilis* no meio a base de macrófita+NPK foi similar ao meio comercial CHU₁₂, indicando a possibilidade do uso do meio alternativo para cultivo desta alga clorófica.

Densidade celular de *A. gracilis*, acima de 95×10^5 células/mL durante a fase exponencial de crescimento nos dois meios utilizados, está associada ao período de 24 horas de luz, visto que a irradiação influencia no crescimento algal. Taxas de crescimento elevadas também estão associadas a aeração do meio que permite maior assimilação de carbono disponível (PÉREZ *et al.*, 2008).

Na curva de crescimento é 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, principalmente, pela adaptação ao meio de cultivo, presença de enzimas inativas, diminuição dos metabólitos à níveis insuficientes para permitir que ocorra divisão celular havendo, portanto, o equilíbrio de ácido glicólico no meio para que os produtos de fixação do carbono possam tornar-se disponíveis e assim, promover o crescimento algal (XU *et al.*, 2006).

A taxa de crescimento é função da intensidade luminosa diária, e a manutenção controlada em laboratório da luz, temperatura e aeração, é fundamental para o desenvolvimento e crescimento exponencial da alga (SIPAÚBA-TAVARES *et al.*, 1999). Esses fatores influenciam

diretamente o teor de clorofila-*a* o qual foi similar ($p>0,05$) entre os dois meios de cultivo utilizados.

As condições da qualidade da água de cultivo é outro fator determinante no bom desempenho da taxa de crescimento da alga. Valores de pH entre 6 e 9 favorece o crescimento da alga com pH ótimo ao redor de 7,8 (PÉREZ *et al.*, 2008), neste estudo o pH manteve-se na faixa recomendada.

O valor nutricional varia com a condição de crescimento da alga e tipo de meio de cultivo. Algas com níveis muito baixos de lipídio não possuem reserva energética adequada para ser transferida a outros níveis da cadeia trófica (ALLGREN *et al.*, 1993).

No cultivo de *A. gracilis* em meio NPK no volume de 850L, SIPAÚBA-TAVARES e PEREIRA (2008) observaram elevados teores de proteína (47,3%PS) e baixos níveis de lipídio (7,4%PS), relacionando esses fatores, aos nutrientes presentes no meio de cultivo.

No estudo da alga clorófica, *Chlorella vulgaris* apresentou teor de lipídio acima de 50% quando no meio de cultivo houve redução do teor dos compostos nitrogenados (ILLMAN *et al.*, 2000). Os baixos teores dos compostos nitrogenados no meio macrófita+NPK e ausência de nitrito e nitrato no meio CHU₁₂ influenciaram diretamente os teores de lipídios da alga *A. gracilis* sendo duas vezes mais alto que o teor de proteína. Outro fator importante para os maiores teores de lipídios em relação à proteína, foi a concentração de fósforo mais alta que a de nitrogênio, sendo o fósforo importante componente em muitas classes de lipídios (RHEE, 1978).

A variação no teor protéico das microalgas pode comprometer o crescimento e o desenvolvimento de organismos de níveis tróficos superiores (KILHAM *et al.*, 1997).

Parte do nitrogênio celular disponível se encontra incorporado as moléculas protéicas e a limitação externa deste nutriente pode prejudicar a síntese e armazenamento de proteína (SMIT *et al.*, 1997). A presença da amônia nos dois meios é importante não só por ser o elemento primário na síntese metabólica da alga, como também, apresenta vantagem sobre o nitrato e nitrito, não precisando de redução para sua assimilação sendo, portanto, energeticamente mais econômica

(ILLMAN *et al.*, 2000). Além disso, fatores físicos com gradiente de luz e temperatura estão associados ao metabolismo dos compostos bioquímicos (ILLMAN *et al.*, 2000).

A energia bruta é o ponto de partida para avaliação energética do alimento e nutrientes, apresentando relação inversa entre gordura com a proteína e carboidrato, sendo 2,25 vezes mais energética que os carboidratos (SOUZA, 2004).

Altos valores de energia bruta (>5.000 Kcal/Kg) com elevados teores de lipídios (>25%PS) indicam que a alga *A. gracilis* apresenta altos teores de gordura. A relação inversa da proteína e carboidrato com a energia bruta foi verificada neste estudo.

Os valores de energia bruta observados para *A. gracilis* neste estudo foram superiores aos encontrados pela FAO (2006) para *Chlorella vulgaris* (3.086Kcal/kg). Diferenças nos valores energéticos estão associados a composição mineral e protéica do alimento (SOUZA, 2004).

A fibra constitui o resíduo orgânico insolúvel, geralmente considerado como carboidrato não disponível numa dieta e facilita o processo digestivo. Neste estudo os valores obtidos para fibra foram superiores aos de MORRIS (1999) para *Chlorella vulgaris* (7,5%).

A utilização de fertilizante químico (NPK) associado com extrato de macrófita (*Eichhornia crassipes*) resultou em excelente alternativa como meio de cultura para a microalga *A. gracilis* convertendo-se em boa opção para produção de alimento vivo para organismos zooplanctônicos ou larvas de peixes, podendo incrementar a rentabilidade das atividades neste setor. *A. gracilis* em meio a base de macrófita+NPK apresentou valor nutricional similar ao meio comercial CHU₁₂, mostrando bons resultados para o crescimento desta alga, com qualidade da água adequada, podendo ser utilizado o meio de macrófita para cultivo desta alga em larga escala na alimentação de larvas de peixes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), processo 300647/88-3, pelo suporte

financeiro e a Fernanda Travaini de Lima, pelo auxílio na análise estatística.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMSSON, M. 2000 Potential use of human urine by greenhouse culturing of micro-algae (*Scenedesmus acuminatus*), zooplankton (*Daphnia magna*) and tomatoes (*Lycopersicon*). *Ecological Engineering*, 16: 243-254.
- ALLGREN, G.; GUSTAFSSON, I.B.; BOBERG, M. 1992 Fatty acid content and chemical composition of freshwater microalgae. *J. Phycol.*, 28: 37-50.
- A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists. 1990 *Official methods of analysis*. 15TH ed., Arlington, Virginia, 683p.
- BROWN, M.R.; JEFREY, S.W.; VOLKMAN, J.K.; DUSTAN, G.A. 1997 Nutritional properties of micro-algae for marine culture. *Aquaculture*, 151: 315-331.
- FAO - Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação 2006 Aquicultura mais do que uma indústria de exploração. Roma: FAO, 2006. Disponível em Internet (<http://www.fao.org/spanish/newsroom/news/2003/21619-es.html>). > Acesso em: 18 abril 2006.
- GOLTERMAN, H.L.; CLYMO, R. S.; OHNSTAD, M. A. 1978 *Methods for physical and chemical analysis of freshwater*. London: Blackwell Scientific Publication. 213p.
- HARDY, E. R. e CASTRO, J. G. D. 2000 Qualidade nutricional de três espécies de clorófitas cultivadas em laboratório. *Acta Amazônica*, 30: 39/47.
- ILLMAN, A.M.; SAAGG, A.H.; SHALES. S.W. 2000 Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microb. Tech.*, 27: 631-635.
- KILHAM, S.S.; KREEGER, D.A.; GOULDEN, C.E.; LYNN, S.G. 1997 Effects of algal food quality on fecundity and population growth rates of *Daphnia*. *Fresh. Biol.*, 38: 639-647.
- 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.
- KOROLEFF, F. 1976 Determination of nutrients. In: GRASSNOF, E. e KREMLING, E. (Ed.). *Methods of seawater analysis*. New York: Verlag Chemie, Weinheim. p.117-181.
- MACKERETH, F. J. H.; HERON, J.; TALLING, J. F. 1978 *Water analysis: some revised methods for limnologists*. Oxford: Titus Wilson and Sons Ltda. Freshwater Biological Association. Scientific Publication, n. 36. 121p.
- McKIM, S.M. e DURNFORD, D.G. 2006 Translational regulation 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 microalga, *Tetraselmis chui* (PLY 429). *Aquaculture*, 246: 393-404.
- MORRIS, H. 1999 Composición bioquímica y evaluación de la calidad protéica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*. *Revista Cubana de Alimentación y Nutrición*, 13: 2-14.
- NUSH, E. A. 1980 Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. *Archiv für Hydrobiol*, 14: 14-36.
- PÉREZ, E.B.; PINA, J.C.; RODRIGUEZ, L.P. 2008 Kinetic model for growth of *Phaeodactylum tricornutum* in intensive culture photobioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 40: 520-525.
- RHEE, G.Y. 1978 Effects of N:P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition, and nitrate uptake. *Limnol.Oceanogr.*, 23: 10-25.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H. 1995 *Limnologia Aplicada à Aqüicultura*. Boletim Técnico número1, FUNEP, Jaboticabal, SP. 70p.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H. e ROCHA, 1993 Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes: I- algas clorofíceas. *Biotemas*, 6: 93-106.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; PELICIONI, L. C.; OLIVERA, A. 1999 Use of inorganic (NPK) and the CHU₁₂ medium for cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* in laboratory. *Brazilian Journal of Ecology*, 1: 10-15.
- 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. J. Biol.*, 62: 701-711.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; FAVERO, E.G.P.; BRAGA, F.M. de S. 2002 Utilization of macrophyte biofilter in effluent from aquaculture: I- Floating Plant. *Braz. J. Biol.*, 62: 713-723.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H. e BRAGA, F.M. de S. 2007 Feeding activity of *Colossoma macropomum* larvae (tambaqui) in fishpond with water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) fertilizer. *Braz. J. Biol.*, 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. J. Biol.*, 68: 875-883.
- SMIT, A.J.; ROBERTSON, B.L.; DU-PEREZ, D.R. 1997 Influence of ammonium -N pulse concentrations and frequency, tank condition ad nitrogen starvation on growth rate and biochemical composition of *Gracilaria gracilis*. *J.Appl. Phycol.*, 8: 473-481.
- SOUZA, J.S.I. de 2004 *Enciclopédia Agrícola Brasileira*. SãoPaulo: Editora da Universidade de São Paulo-EDUSP/ESALQ. 512p.
- STEIN, J. 1973 *Handbook of phycological methods; Culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press. 447 p.