

Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (Chlorophyta) em laboratório à base de esterco suíno

Tatiana Betioli Fioresi
Lúcia Helena Sipaúba-Tavares*

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, PG em Microbiologia, Centro de Aqüicultura,
Universidade Estadual Paulista-UNESP, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil

*Autora para correspondência
sipaub@caunesp.unesp.br

Submetido em 11/06/2007
Aceito para publicação em 14/11/2007

Resumo

O objetivo do presente trabalho foi testar a influência do meio à base de esterco suíno “*in natura*” e biodigerido, sobre o desenvolvimento, crescimento, comprimento total, peso seco e valor nutricional da microalga *Ankistrodesmus gracilis*. O pico de crescimento para *A. gracilis* foi maior no meio biodigerido ($6,2 \times 10^7$ células.mL⁻¹) no volume de 2L. Alta porcentagem de lipídio foi observada no meio “*in natura*”, e, elevados teores de proteína no meio biodigerido em 2L. O biovolume, teor de cinzas e comprimento total foram diferentes ($p < 0,05$) entre os meios, o mesmo não ocorrendo para peso seco e fibra bruta ($p > 0,05$). O requerimento de luz foi diferente entre os meios, com menor intensidade para o esterco biodigerido ($13,5 \mu\text{E} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), indicando menor custo benefício. O meio a base de esterco suíno, mostrou bons resultados para o crescimento de *A. gracilis*, com qualidade de água adequada para cultivo, podendo ser utilizado para cultura em larga escala.

Unitermos: alga, crescimento, composição bioquímica, esterco suíno, cultivo

Abstract

***Ankistrodesmus gracilis* (Chlorophyta) fertilized in swine manure in the laboratory.** The objective of the present work was to investigate the influence of swine manure media on the growth, total length, dry weight, and nutritional value of *Ankistrodesmus gracilis* microalgae. Two media were measured: “*in natura*” and biodigested. The growth rate peak for *A. gracilis* was highest with biodigester treatment (6.2×10^7 cells.mL⁻¹) on the 5th day, at a volume of 2L. The highest percentage of lipids was verified for “*in natura*” media. Protein was highest ($p > 0.05$) for the biodigested media at 2L. Biovolume, ash rate, and total length were different ($p < 0.05$) between treatments, but the same was not true for dry weight and crude fiber ($p > 0.05$). Light demand was also different between media, with lesser intensity being required for biodigested media ($13.5 \mu\text{E} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). In fact, the biodigested media proved to be cheaper in terms of cost and benefit. Generally, the medium containing swine manure, both “*in natura*” and biodigested, showed better results in *A. gracilis* development, with water quality adequate for culture systems. Swine manure in both forms may also be used in high-density cultures in the laboratory.

Key words: algae, growth, biochemical composition, swine manure, culture

Introdução

O estudo do crescimento de microalgas é um aspecto importante para incrementar o conhecimento da biologia das diferentes espécies, favorecendo a produção em ambientes controlados. Atualmente, diferentes espécies de microalgas são produzidas em escala comercial resultando numa atividade de grande interesse pelo aporte do desenvolvimento de diferentes campos como a Aqüicultura e utilizadas como fonte de alimento para larvas de peixes, camarões e rãs (Sipaúba-Tavares e Rocha, 1993).

Em cultivos controlados de algas, os meios de cultura oferecem os nutrientes necessários para o crescimento ótimo de cada espécie, sendo o meio e técnica de cultivo a base para o estabelecimento da qualidade nutricional da alga.

Um dos principais problemas no cultivo em massa de microalgas utilizadas como alimento vivo, refere-se ao custo das substâncias químicas necessárias para a preparação dos meios de cultura. A redução do custo de produção é necessária e algumas pesquisas têm sido direcionadas neste sentido (Sipaúba-Tavares e Rocha, 1993; Adamsson, 2000; Hardy e Castro, 2000; Sipaúba-Tavares e Rocha, 2001).

O uso de esterco suíno como fonte alternativa para cultivo de microalgas em laboratório possui dois aspectos positivos: o primeiro é a grande disponibilidade do produto em virtude do crescimento da suinocultura no Brasil, ressalta-se que os dejetos produzidos neste seguimento contaminam mananciais e, o segundo aspecto, é a produção de um material de baixo custo, que propicie rápido crescimento e alto valor nutricional da alga cultivada.

Dentre as microalgas cultivadas, as clorofíceas têm sido amplamente utilizadas na alimentação de organismos aquáticos de água doce, particularmente *Ankistrodesmus gracilis*, mostrando-se bastante promissora como incremento da atividade aqüícola, sendo resistente ao manejo de cultivo e, selecionadas como alimento por larvas de peixes (Sipaúba-Tavares et al., 1999).

O conhecimento da biologia e a influência dos fatores tais como temperatura, luz, nutrientes, valor

nutricional, são de grande importância no sucesso do cultivo de microalgas em sistemas controlados e que, posteriormente poderão servir direta ou indiretamente de alimento para larvas e alevinos de peixes.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi verificar a influência do meio a base de esterco suíno, “*in natura*” e biodigerido no crescimento de *Ankistrodesmus gracilis*, focalizando a biologia, valor nutricional e o efeito da qualidade da água de cultivo no desenvolvimento da alga em laboratório.

Materiais e Métodos

Local e seleção da microalga *Ankistrodesmus gracilis*

A microalga *Ankistrodesmus gracilis* foi proveniente da Universidade Federal de São Carlos, linhagem nº 005CH, isolada da Represa do Broa (SP, Brasil) e, posteriormente, cultivada no Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton (Universidade Estadual Paulista-UNESP, Centro de Aqüicultura). O sistema de cultivo foi estático não axênico, com aeração constante, temperatura de $24,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ sob iluminação de lâmpadas fluorescentes, com intensidade de 13,5 a $20,7 \mu\text{E} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ no topo da cultura. Inicialmente, foi mantida em meio de cultura CHU_{12} e NPK (20:5:20) até sua aclimação (Sipaúba-Tavares, 1995).

Meio de Cultura

O esterco suíno utilizado como meio de cultura foi cedido pelo Sistema de Produção de Suínos do Departamento de Zootecnia da UNESP (Jaboticabal-SP) em instalações de crescimento e terminação, compostas de baias de alvenaria com piso de concreto. O meio de cultura biodigerido foi obtido através do armazenamento de esterco suíno em biodigestores do tipo batelada onde ocorre o processo de fermentação, permanecendo armazenado por um período de 30 dias (Ortolani et al., 1991).

Foram utilizados 23,12g do esterco suíno “*in natura*” (IN) e 80,8g do meio biodigerido em 30 dias (B30), ambos diluídos em 2.000mL de água destilada e

posteriormente, autoclavados. Após o resfriamento, foi retirada uma subamostra de 100mL, completada para 1.300mL de água destilada, e mais 100mL de inóculo de *A. gracilis* com densidade ao redor de 3×10^5 células.mL⁻¹, para o cultivo em pequena escala (2L) (Figura 1). Quando o crescimento de *A. gracilis* atingiu a fase exponencial, foi transferido para volume maior (13L), totalizando 26L de inóculo para cada tanque de 250L, na densidade de 10×10^5 células.mL⁻¹ para o meio IN e de $7,1 \times 10^6$ células.mL⁻¹ para B30. No meio B30, foi adicionado 0,01g.L⁻¹ de vitaminas do complexo B (Sipaúba-Tavares e Bachion, 2002), com o objetivo de incrementar o crescimento da alga, cujos resultados não

estavam sendo satisfatórios na ausência da vitamina. O experimento foi desenvolvido em triplicata (Figura 1).

Crescimento

Para o experimento com meio a base de esterco suíno, a alga foi mantida em intensidade de luz no topo da cultura de $20,7 \pm 0,2 \mu\text{E} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ para o meio IN e $13,5 \pm 1,2 \mu\text{E} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ para o B30, em ciclo de 24 horas. Para avaliar o crescimento de *A. gracilis*, alíquotas de 1mL foram removidas diariamente, ao longo de 22 dias de cultivo e 2 x 1μL de sub-amostras foram contados em hemocitômetro de Neubauer.

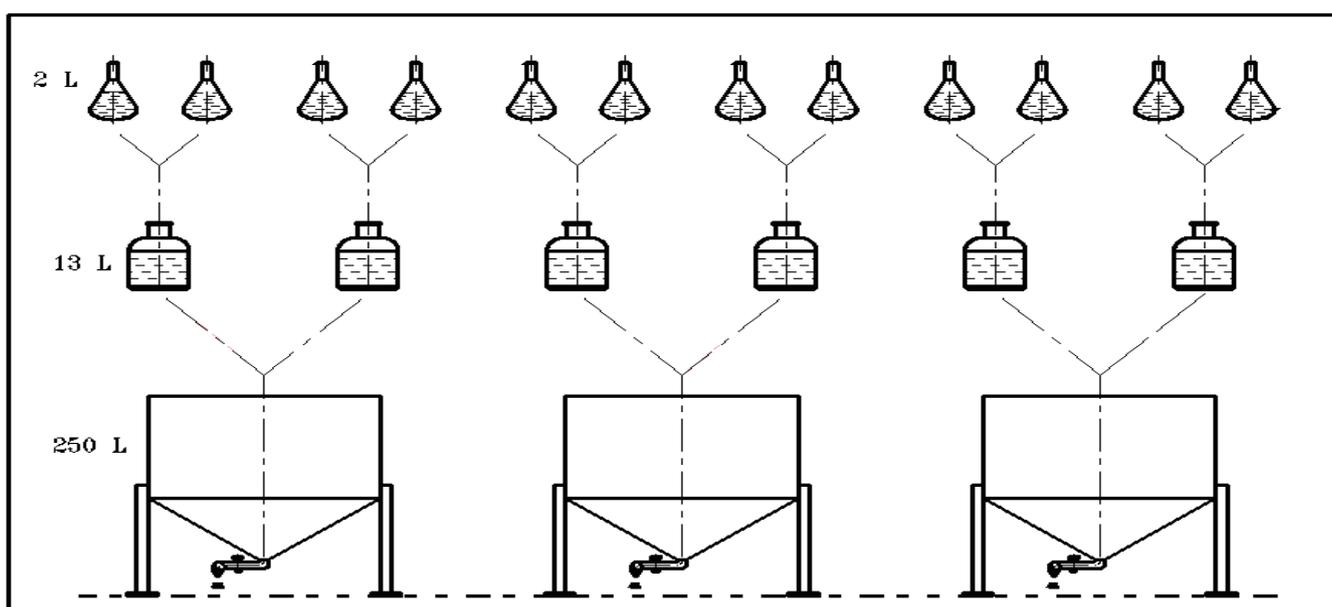


FIGURA 1: Esquema do cultivo da alga *Ankistrodesmus gracilis* em laboratório nos volumes de 2L, 13L e 250 L.

Composição Química

Ao final do experimento, ambos os volumes (2L e 250L) de *A. gracilis* foram concentrados em desnata-deira, liofilizado para análises de lipídeo, fibra e proteína seguindo a metodologia proposta por Association of Official Analytical Chemistry (1990). A composição química do meio de cultura também foi determinada de acordo com a metodologia descrita em Association of Official Analytical Chemistry (1990).

Dados Biológicos

O peso seco foi determinado obtendo-se 10mL de cada réplica, sendo colhidas duas vezes por semana, com densidade média de $2,14$ e $1,99 \times 10^7$ células.mL⁻¹ para IN e B30 em 2L e no volume de 250L de $6,6$ e $6,1 \times 10^6$ células.mL⁻¹ para IN e B30. As amostras foram filtradas em filtro de fibra de vidro (GFC 0,7μm de diâmetro de poro), previamente lavado em água destilada. Posteriormente, os filtros foram secos a 60°C e submetidos à pesagem, até peso constante. Para a determinação do conteúdo de cinzas da alga o ma-

terial foi incinerado, em mufla a 500°C, por 4 horas. O comprimento total (μm) de 50 indivíduos de cada tratamento foi determinado em microscópio Olympus BX 50, com uso de sistema de análise de imagens Pro-Plus versão 4.1, Media Cybernetics, U.S.A. com ocular micrométrica em um aumento de 400x. O cálculo do biovolume foi realizado a partir das dimensões médias das células usando a forma geométrica mais apropriada que corresponde à fórmula de dois cones acoplados (Vollenweider, 1974, Bottrel et al., 1976).

Análise Bacteriológica

No meio de 2L, foram colhidas amostras da água de cultivo duas vezes por semana, totalizando sete amostras, para cada meio de cultivo. Foi utilizada a técnica de tubos múltiplos para detecção de coliformes totais e coliformes fecais, sendo expressos em número mais provável (NMP.mL^{-1}) e a técnica de plaqueamento em profundidade (pour plate) para microrganismos mesófilos expressos em unidade formadora de colônia (UFC.mL^{-1}) (American Public Health Association, 1998).

Características Hidrológicas

Para acompanhamento da qualidade do meio de cultura, amostras da solução de água foram colhidas e analisadas três vezes por semana. As características físicas e químicas, como condutividade elétrica, pH e temperatura do meio, foram medidas utilizando aparelho digital Corning PS17, PS15 e PS16, respectivamente. O oxigênio dissolvido, carbono inorgânico e alcalinidade foram determinados segundo Golterman et al. (1978) e Mackereth et al. (1978). Amônia, nitrato, nitrito, fósforo total e ortofosfato foram determinados de acordo com Koroleff (1976) e Golterman et al. (1978). A clorofila-*a* foi avaliada segundo Nush (1980) e a Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO_5), segundo metodologia descrita em American Public Health Association (1998).

Análise Estatística

Para a análise estatística, foi estabelecida a forma de um delineamento inteiramente casualizado, constituído por quatro tratamentos, com três repetições para

cada um. Os dados foram comparados aplicando-se o teste de Tukey ao nível de 5% de significância utilizando-se para isto o Sistema para Análises Estatísticas (V.2,0) - ESTAT.

Resultados e Discussão

Os dejetos de suínos apresentam uma considerável variação na sua composição, devido ao manejo nutricional adotado para os animais, porcentagem de diluição do dejetos, fase de vida que o animal se encontra e ainda, o tipo de tratamento empregado (Perdomo et al., 2001).

A composição química do meio de cultura à base de esterco suíno é mostrada na tabela 1. O meio “*in natura*” (IN) apresentou maiores concentrações de nutrientes quando comparado ao meio biodigerido (B30), principalmente, em relação ao nitrogênio, cálcio e ferro, sendo que o inverso foi observado para o magnésio. Em geral, as menores concentrações dos nutrientes no B30, podem estar associadas ao fato de sofrer biodigestão anaeróbia, ou seja, primeiramente, os compostos orgânicos complexos são hidrolisados a compostos orgânicos simples (hidrólise) formando ácidos graxos de cadeia longa (acidogênese) e, acetato (acetogênese). Finalmente, ocorre a produção de metano (metanogênese) originando moléculas mais simples (Carvalho, 1998).

TABELA 1: Teor de nutrientes contidos no meio de esterco suíno para os meios “*in natura*” (IN) e biodigerido em 30 dias (B30).

Composição Química	Meios	
	IN (mg.L^{-1})	B30 (mg.L^{-1})
Nitrogênio	10990	9380
Fósforo	6,89	4,18
Potássio	0,425	0,375
Enxofre	1,19	0,73
Magnésio	0,25	0,50
Cálcio	1100	500
Manganês	0,275	0,150
Ferro	1,575	0,600
Zinco	0,700	0,225
Cobre	0,900	0,275

A luz é o fator essencial ao crescimento das algas, sem a qual as mesmas não podem processar suas ativi-

dades metabólicas. O uso do esterco suíno para o cultivo de *Ankistrodesmus gracilis*, promoveu alta concentração de alga na cultura e baixo requerimento de luz. Segundo Brown et al. (1997) um dos maiores gastos na produção de algas em laboratório está relacionado à luz, cujas melhores condições estão entre 50 e $100 \mu\text{E} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, alternando de 12 em 12 horas. Neste estudo, a intensidade de luz foi em média de $13,0$ a $20,7 \mu\text{E} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ no período de 24 horas, revelando resultado satisfatório na redução do custo de produção e rápido crescimento algal. No entanto, a baixa intensidade de luz utilizada neste estudo e o uso de tanques de cultivo de fibra de vidro translúcidos, para o volume de 250L, podem ter afetado o crescimento da alga quando comparados com os volumes de 2L, cujos cultivos foram realizados em frascos de vidro transparente promovendo maior biomassa (Figura 2).

Além disso, a diferença na intensidade luminosa pode estar relacionada ao fato de que o meio “*in natura*” apresenta maior concentração de matéria orgânica tornando-o mais turvo e, no caso do meio biodigerido ocorre menor concentração de matéria orgânica, devido à ação de bactérias anaeróbias que fermentam este meio, tornando-o menos turvo facilitando a passagem de luz nos recipientes de cultivo.

No meio IN em 250L, no 5º dia, ocorreu um pico de *Ankistrodesmus gracilis* atingindo $7,1 \times 10^6$ células. mL^{-1} , oscilando ao longo do experimento. Esse mesmo padrão de comportamento foi observado no B30 em 2L com o pico no 5º dia, com maiores concentrações ($6,2 \times 10^7$ células. mL^{-1}) (Figura 2). O cultivo no tratamento IN em 2L mostrou tendência de crescimento até o 12º dia tendo ocorrido, maior pico com $7,4 \times 10^7$ células. mL^{-1} , oscilando ao longo do experimento. Já no B30 em 250L a tendência foi decrescer até o final, com uma concentração algal de $3,7 \times 10^6$ células. mL^{-1} inferior ao IN em 250L com $7,0 \times 10^6$ células. mL^{-1} . Em geral, o B30 em 2L apresentou o melhor resultado (Figura 2).

Carvalho (1998), trabalhando com esterco de poeiras obteve um pico de crescimento para esta mesma alga, no meio IN no 6º dia de cultivo com $1,1 \times 10^6$ células. mL^{-1} e, no meio com esterco biodigerido (20 dias) no 2º dia com aproximadamente $7,0 \times 10^5$ células. mL^{-1} . Rodrigues e Belli Filho (2004), cultivando *Chlorella minutissima* em meio de esterco suíno, obtiveram um pico de crescimento ao redor do 7º dia em menor densidade ($2,1 \times 10^5$ células. mL^{-1}), quando comparado aos resultados deste estudo.

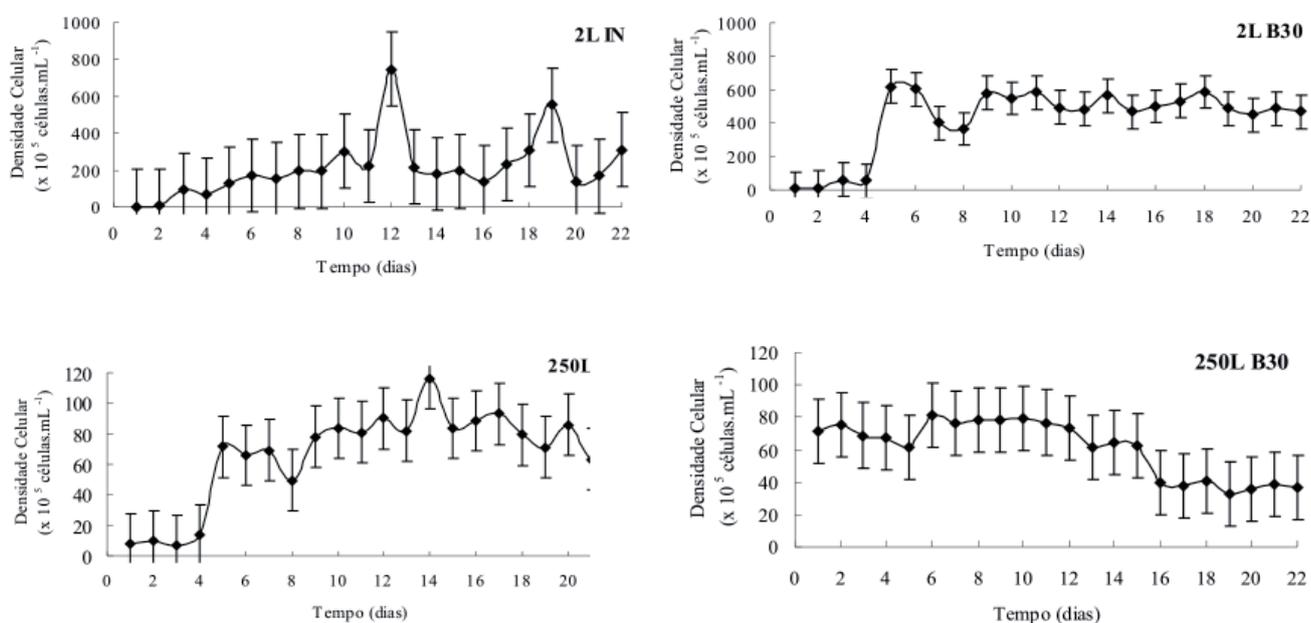


FIGURA 2: Crescimento da alga *Ankistrodesmus gracilis* cultivada em 2L e 250L em meios “*in natura*” (IN) e biodigerido em 30 dias (B30).

Uma das características utilizadas para avaliação das algas como alimento é o tamanho, devido às grandes variações na forma e dimensões da célula, indicando o biovolume disponível como alimento (Sipaúba-Tavares e Rocha, 2001).

O biovolume (Figura 3) de *A. gracilis* em meio de esterco suíno variou de 70,33 a 427,86 μm^3 para o meio IN e 73,03 a 427,86 μm^3 para B30 apresentando diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os meios, com valores superiores aos encontrados por Sipaúba-Tavares e Rocha (1993), Sipaúba-Tavares et al. (1999) e Sipaúba-Tavares e Rocha (2001), porém similar ao obtido por Hardy e Castro (2000) utilizando meios tradicionais como CHU_{12} e NPK (20:5:20).

O valor nutricional de um organismo é de extrema importância em estudos de alimentação. A composição química bruta de uma espécie de microalga referente a aminoácidos, grau de insaturação de ácidos graxos ou conteúdo de vitaminas depende das condições de cultivo e do período de crescimento. No entanto, é possível generalizar a resposta de crescimento algal devido às alterações ambientais para as diferentes espécies (Brown et al., 1997).

A porção mineral da alga formada por cinzas variou de 4,21 a 7,53 pg.cél.^{-1} para o meio IN e de 3,2 a 3,36 pg.cél.^{-1} para B30, sendo superior a obtida por

Sipaúba-Tavares e Rocha (1993) para a mesma alga cultivada em meio NPK (0,01 pg.cél.^{-1}) e inferiores ao obtido por Habib et al. (1997) para *Chorella vulgaris* (18,6%) cultivada em efluente de moinho de óleo de palma (Tabela 2).

Os valores de proteína encontrados neste estudo estiveram acima de 30% de peso seco, com exceção do meio IN em 2L (19,3%) (Tabela 2) sendo significativo ($p < 0,05$) somente no meio B30 em 250L (36,6%). Brown et al. (1997) também observaram níveis de proteína acima de 30% de peso seco atribuindo estes valores à aeração do meio.

O peso seco celular varia tanto em função da fonte de nitrogênio como nas fases de crescimento. No caso de *A. gracilis* as células cultivadas no meio IN em 2L foi mais elevado (85,0 pg.cél.^{-1}) quando comparado com o B30 no mesmo volume (31 pg.cél.^{-1}), porém em larga escala (250L) o B30 (70,8 pg.cél.^{-1}) foi maior (Tabela 2).

Esses resultados foram superiores aos encontrados por Sipaúba-Tavares e Rocha (1993) trabalhando com *A. gracilis* utilizando o meio CHU_{12} (1,40 pg.célula^{-1}). Em contra partida, Hardy e Castro (2000) utilizando meio de cultura NPK (20:5:20) para o cultivo de *A. gracilis* obtiveram resultados de peso seco superiores (125,0 \pm 13,1 pg.célula^{-1}) aos encontrados neste estudo.

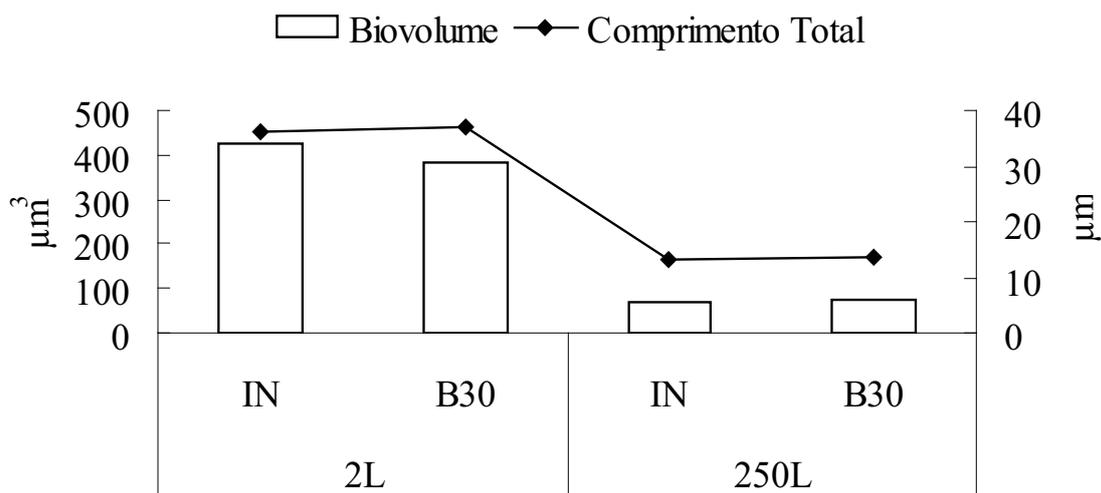


FIGURA 3: Biovolume e comprimento total da alga *Ankistrodesmus gracilis* cultivada em 2L e 250L nos meios “in natura” (IN) e biodigerido em 30 dias (B30).

TABELA 2: Composição química da alga *Ankistrodesmus gracilis* cultivada em 2L e 250L nos meios “*in natura*” (IN) e biodigerido em 30 dias (B30).

Características	2L		250L	
	IN	B30	IN	B30
Cinzas (pg.cél. ⁻¹)	7,5 ± 1,7 ^a	3,2 ± 9,4 ^a	4,2 ± 3,2 ^b	3,4 ± 2,1 ^b
Peso Seco (pg.cél. ⁻¹)	85,0 ± 1,5 ^a	31,0 ± 4,5 ^a	24,6 ± 3,4 ^a	70,8 ± 4,3 ^a
Fibra Bruta (% de PS)	15,7 ± 0,9 ^a	14,3 ± 0,9 ^a	21,4 ± 4,3 ^a	12,0 ± 8,2 ^a
Proteína Bruta (% de PS)	19,3 ± 0,5 ^a	30,2 ± 0,9 ^a	33,7 ± 2,7 ^a	36,6 ± 1,7 ^b
Lipídeo (% de PS)	17,0 ± 0,7 ^a	20,5 ± 2,0 ^a	7,9 ± 1,3 ^b	8,5 ± 1,0 ^b

As letras a e b, indicadas em duas das colunas, não coincidentes na mesma linha, representam diferenças significativas de $p < 0,05$. PS = Peso Seco.

O teor de fibra constitui o resíduo orgânico insolúvel geralmente considerado como carboidrato não disponível numa dieta ou alimento, apresentando valores acima de 12% (Tabela 2) sendo maiores do que os obtidos pela Food Agriculture Organization (1994) para *Chlorella vulgaris* (8,0%).

Não foi observada a presença de coliformes fecais nos dois meios, sendo detectado coliformes totais na proporção de $6,0 \times 10^2$ e $5,1 \times 10^2$ NMP.mL⁻¹ para IN e B30, respectivamente, ao final do experimento. Houve uma diferença considerável no número de unidade formadora de colônia entre o início e o final do experimento, sendo representadas pelos mesófilos com maior número de colônias no meio IN, apresentando uma variação de $1,9 \times 10^2$ a 8×10^3 UFC.mL⁻¹ e no B30 de $6,9 \times 10^3$ a $3,1 \times 10^3$ UFC.mL⁻¹. Este aumento pode estar associado ao fato do uso de culturas não axênicas e por contaminação das condições do próprio laboratório.

Segundo Lucas-Junior (1994) o número mais provável de coliformes em dejetos de suínos é da ordem de $3,3 \times 10^6$.g⁻¹ (coliformes fecais) e $8,9 \times 10^9$ /g (coliformes totais), sendo estes números superiores aos encontrados neste trabalho ($5,1$ a $6,0 \times 10^3$. g⁻¹).

A qualidade da água do meio de cultura é de fundamental importância no desenvolvimento e crescimento de organismos tais como temperatura, luz, oxigenação, entre outros. Foram observados altos valores de amô-

nia, fósforo total e ortofosfato no meio, associados à composição do esterco suíno (Tabela 4).

Entre os diversos componentes do meio de cultura a fonte ou concentração de nitrogênio pode afetar o crescimento e composição bioquímica das microalgas em cultivo, atingindo diretamente a produtividade e composição bioquímica da biomassa obtida (Molina et al., 1991).

Estudos prévios (Becker, 1988; Fidalgo, 1995) mostraram algumas variações na composição bioquímica relacionando o aumento do teor de carboidratos e lipídios com a diminuição da proteína em meios de cultura com baixas concentrações de nitrogênio e fósforo. Neste estudo, as baixas concentrações de nitrogênio e fósforo observadas no volume de 250L propiciaram teores de proteína mais elevados e de lipídio mais baixos, quando comparados ao volume de 2L, cujas concentrações de nitrogênio e fósforo foram extremamente elevadas (Tabelas 2 e 4).

Nayar et al. (1998), avaliando a qualidade nutricional de *Chlorella vulgaris* utilizada como alimento vivo na aquicultura, verificaram níveis de proteína bruta e lipídeo ao redor de 12,2% e 5,4% respectivamente, inferiores aos obtidos neste estudo (19,3 a 36,6 % e 7,9 a 20,5%) (Tabela 2).

Comparando as concentrações de amônia na composição do meio a base de esterco suíno, os resultados obtidos foram baixos, sendo o fator luz responsável pela disponibilidade deste componente. Em geral, *A. gracilis* em meio comercial CHU₁₂ e alternativo NPK

é cultivada ao redor de $21,48 \mu\text{E} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Sipaúba-Tavares et al., 1999). Com esterco suíno a intensidade foi reduzida a $13,5 \mu\text{E} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, pois rapidamente passava para a fase senescente quando colocada em intensidades mais elevadas. Neste caso, como o rendimento algal foi satisfatório e, sendo a luz um dos custos mais elevados no cultivo (Brown et al., 1997), o uso de esterco suíno como meio de cultura possui um ponto positivo em relação ao custo benefício da produção.

A aeração constante do meio promoveu altas concentrações de oxigênio dissolvido acima de $7 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, favorecendo o processo de nitrificação, com ausência total de nitrito no volume de 2L. O contrário foi observado no volume de 250L apresentando valores de $1,58$ e $2,53 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ no meio IN e B30, respectivamente. A condutividade elétrica não apresentou diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os meios utilizados com valores acima de $59 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$, devido à presença de matéria orgânica no meio de esterco (Tabela 3).

Os valores das diferentes formas de carbono inorgânico apresentaram oscilações entre os tratamentos, sendo o bicarbonato a forma predominante. Foi observada uma relação entre CO_2 livre e pH, com menor concentração ($6,7 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) em pH alcalino no meio IN em 2L (Tabela 3). Os valores de bicarbonato e CO_2

livre foram inferiores aos encontrados por Carvalho (1998) no cultivo de *A. gracilis* com esterco de aves “in natura” e biodigerido em diferentes tempos de degradação.

A variação da concentração da clorofila-*a* acompanhou a curva de crescimento de *A. gracilis* com a maior em 2L ($7,1 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) e menor em 250L ($0,6 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) concentração no meio B30 (Tabela 3). A DBO_5 do meio foi relativamente baixa em função da aeração do meio e, baixas ($8,7$ a $11,4 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) concentrações de bactérias (Tabela 3).

O meio à base de esterco suíno, propiciou resultados satisfatórios em relação ao valor nutricional e crescimento de *A. gracilis* quando comparado a outros meios alternativos para cultivo dessa alga como: NPK (Sipaúba-Tavares e Rocha, 1993; Sipaúba-Tavares et al., 1999), urina humana (Adamsson, 2000), esterco de poedeiras (Carvalho, 1998), entre outros. A eficiência do esterco suíno como adubo no cultivo de plâncton em tanques externos já foi constatado por Santeiro e Pinto-Coelho (2000), Santeiro et al. (2006), porém o uso de meio de cultura à base deste produto para cultivo em larga escala de alga clorofícea em laboratório é uma possibilidade real de ser fornecido como alimento vivo de alta qualidade para larvas e alevinos de peixes.

TABELA 3: Características físicas e químicas dos meios de cultivo “in natura” (IN) e biodigerido em 30 dias (B30) para o crescimento de *Ankistrodesmus gracilis*.

Características Hidrológicas	2L		250L	
	IN	B30	IN	B30
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	$23,0 \pm 2,3^a$	$21,1 \pm 1,1^a$	$19,2 \pm 2,3^b$	$20,0 \pm 1,4^b$
pH	$7,2 \pm 0,2^a$	$6,8 \pm 0,5^a$	$6,3 \pm 0,3^b$	$6,9 \pm 0,3^b$
Condutividade elétrica ($\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$)	$73,5 \pm 6,4^a$	$63,9 \pm 9,9^a$	$59,5 \pm 33,2^a$	$96,0 \pm 58,8^a$
Alcalinidade ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	$43,8 \pm 4,4^a$	$34,5 \pm 8,2^a$	$34,4 \pm 4,2^b$	$32,4 \pm 13,2^b$
OD ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	$7,2 \pm 0,7^a$	$7,0 \pm 1,7^a$	$10,2 \pm 2,9^b$	$8,9 \pm 3,6^b$
Carbonato ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	$0,043 \pm 0,2^a$	$0,018 \pm 0,01^b$	$0,004 \pm 0,02^b$	$0,02 \pm 0,01^b$
Bicarbonato ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	$54,5 \pm 7,5^a$	$42,0 \pm 9,9^b$	$41,9 \pm 5,2^b$	$39,5 \pm 16,1^b$
CO_2 livre ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	$6,7 \pm 3,4^a$	$14,9 \pm 21,5^a$	$42,6 \pm 26,9^b$	$10,8 \pm 11,9^a$
Nitrato ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	$6,0 \pm 5,2^a$	$4,8 \pm 2,1^a$	$19,6 \pm 1,6^a$	$45,3 \pm 76,6^b$
Nitrito ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	**	**	$1,58 \pm 1,66^a$	$2,53 \pm 2,32^a$
Amônia ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	$410,0 \pm 298,4^a$	$231,7 \pm 102^b$	$5,5 \pm 4,8^a$	$39,0 \pm 22,6^a$
Ortofosfato ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	$494,6 \pm 249,5^a$	$238,2 \pm 144,8^a$	$4,3 \pm 2,11^b$	$3,8 \pm 1,3^b$
Fósforo Total ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	$507,5 \pm 213,1^a$	$146,9 \pm 148,8^b$	$22,7 \pm 19,1^a$	$65,4 \pm 12,6^a$
DBO_5 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	$11,4 \pm 0,6^a$	$8,7 \pm 1,5^b$	$10,6 \pm 2,4^a$	$9,3 \pm 3,2^b$
Clorofila- <i>a</i> ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	$3,9 \pm 5,7^a$	$7,1 \pm 6,2^b$	$1,0 \pm 0,1^a$	$0,6 \pm 0,1^a$

** Não detectado pelo método. As letras minúsculas na mesma coluna apresentam diferenças significativas de $p < 0,05$. OD: Oxigênio Dissolvido e DBO_5 : Demanda Bioquímica de Oxigênio.

Os resultados mostraram que o esterco suíno pode ser utilizado como fonte alternativa de meio de cultura para *A. gracilis*, sendo que o esterco com 30 dias de fermentação proporcionou melhor crescimento da alga, em volume de 2L, demonstrando que o processo de biodigestão anaeróbia propiciou maior disponibilidade de nutrientes do resíduo para as algas. Volumes maiores ($\geq 250L$) são utilizados na produção de alimento vivo para larvas e alevinos de peixes. Como o nosso objetivo era produzir alimento de alta qualidade em larga escala como aporte nutricional para larvas de peixes ou organismos zooplanctônicos, o meio utilizado obteve bons resultados no volume de 250L principalmente o meio IN, em função de possuir maior quantidade de nutrientes do que o B30, porém os coliformes fecais e microrganismos mesófilos foram maiores no meio IN. As condições da água de cultivo no meio B30 em 250L apresentaram concentrações de amônia, nitrato e fósforo maiores que o meio IN com elevada condutividade elétrica, no entanto, o teor de clorofila-*a* foi mais baixo devido ao decréscimo no crescimento e com isto disponibilizando os nutrientes para o meio.

O consumo de energia para o cultivo é um fator de alto empreendimento, no caso do meio a base de esterco suíno o requerimento de luz foi bem inferior ao meio usualmente utilizado neste procedimento (NPK). Assim, estudos devem ser averiguados para o desenvolvimento de uma tecnologia de produção em massa dessa alga, utilizando esterco suíno como subproduto e avaliando o custo-benefício deste empreendimento.

Referências

- Adamsson, M. 2000. Potential use of human urine by greenhouse culturing of microalgae (*Scenedesmus acuminatus*), zooplankton (*Daphnia magna*) and tomatoes (*Lycopersicon*). **Ecological Engineering**, **16**: 243-254.
- Association of Official Analytical Chemistry - A.O.A.C. 1990. **Official methods of analysis**. 15th ed. Arlington, Virginia, USA, 683pp.
- American Public Health Association - APHA 1998. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20th ed. American Public Health Association, AWWA, WPCF, Washington, USA, 1569pp.
- Becker, E. W. 1988. : Micro-algal biotechnology. In: Borowitzka, M. A. & Borowitzka, L. J. (eds). **Micro-algae for human and animal consumption**. University Press, Cambridge, England, p.222-256.
- Bottrel, H. H.; Duncan, A.; Gliwicz, Z. M.; Grygierek, E.; Herzig, A.; Hillbrich-Ilkowska, A.; Kurasawa, H.; Larsson, P.; Weglenska, T. 1976. A review of problems in zooplankton production studies. **Norway Journal**, **24**: 419-456.
- Brown, M. R.; Jeffrey, S. W.; Volkman, J. K.; Dustan, G. A. 1997. Nutritional properties of microalgae for marine culture. **Aquaculture**, **151**: 315-331.
- Carvalho, D. D. G. 1998. **Avaliação da qualidade de água fertilizada com esterco de aves de postura in natura e tratado em biodigestores em diferentes fases de fermentação**. Monografia, Universidade Estadual Paulista, Brasil, 112pp.
- Food Agriculture Organization – F.A.O 1994. **Fishery information, data and statistics service: aquaculture production**. FAO Fisheries Circular, Rome, Italia, 216pp.
- Fidalgo, P. 1995. **Variabilidade bioquímica de microalgas marinhas em cultivo em função de la fuente de nitrógeno**. Tese de Doutorado, Universidade de La Coruña, Espanha, 217pp.
- Golterman, H. L.; Clymo, R. S.; Ohnstad, M. A. 1978. **Methods for physical and chemical analysis of freshwater**. Blackwell Scientific Publication, London, 213pp.
- Habib, M. A. B.; Yusoff, F. M.; Phang, S. M.; Ang, K. J.; Mohamed, S. 1997. Nutritional values of chironomid larvae grown in palm oil mill effluent and algal culture. **Aquaculture**, **158**: 95-105.
- Hardy, E. R.; Castro, J. G. D. 2000. Qualidade nutricional de três espécies de clorofíceas cultivadas em laboratório. **Acta Amazônica**, **30** (1): 39-47.
- Koroleff, F. 1976. Determination of nutrients. In: Grassno, F. K. (ed.). **Methods of seawater analysis**. Verlag Cemie, Weinheim, New York, USA, p.117-181.
- Lucas-Junior, J. 1994. **Algumas considerações sobre o uso do esturmo de suínos como substrato para três sistemas de biodigestores anaeróbios**. Tese de Livre Docência, Universidade Estadual Paulista, Brasil, 137pp.
- Mackereth, F. J. H.; Heron, J.; Talling, J. F. 1978. **Water analysis: Some revised methods for limnologists**. Titus Wilson & Sons Ltda, Ambleside, England, 121pp.
- Molina, E.; Sanchez, J. A.; Garcia, F.; Fernandez, J. M.; Acién, F. E. 1994. Effect of growth rate of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid content of *Isochrysis galbana* in chemostat culture. **Applied Microbiology Biotechnology**, **41**: 23-27.
- Nayar, S.; Hegde, S.; Rao, P. S.; Sudha, P. 1998. Live organisms as feed in aquaculture. **INFOFISH International**, **4**: 36-40.
- Nush, E. A. 1980. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. **Archiv für Hydrobiology**, **14**: 14-36.
- Ortolani, A. F.; Benincasa, M.; Lucas-Junior, J. 1991. **Biodigestores rurais modelos indiano, chinês e batelada**. FUNEP, Jaboticabal, Brasil, 35pp.
- Perdomo, C. C.; Lima, G. J. M. M.; Nones, K. 2001. Produção de suínos e meio ambiente. **IXº Anais do Seminário Nacional de Desenvolvimento da Suinocultura**, Gramado, Brasil, p.8-24.
- Rodrigues, J. B. R.; Belli Filho, P. 2004. Eficiência da microalga *Chlorella minutissima* no tratamento de resíduos de suinocultura enriquecido com uréia. **Biotemas**, **17** (2): 7-26.
- Santeiro, R. M.; Pinto-Coelho, R. M. 2000. Efeitos de fertilização na biomassa e qualidade nutricional do zooplâncton utilizado para

- alimentação de alevinos na estação de hidrobiologia e piscicultura de Furnas, MG. **Acta Scientiarum Biological Science**, **22** (3): 707-716.
- Santeiro, R. M.; Pinto-Coelho, R. M.; Sipaúba-Tavares, L. H. 2006. Diurnal variation of zooplankton biochemical composition and biomass in plankton production tanks. **Acta Scientiarum Biological Science**, **28** (2): 103-108.
- Sipaúba-Tavares, L. H. 1995. **Limnologia aplicada à aqüicultura**. FUNEP/UNESP, Jaboticabal, Brasil, 70pp.
- Sipaúba-Tavares, L. H.; Bachion, M. A. 2002. Population growth and development of two species of Cladocera, *Moina micrura* and *Diaphanosoma birgei*. **Brazilian Journal Biology**, **62** (4A): 701-711.
- Sipaúba-Tavares, L. H.; Pelicioli, 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.; Rocha, O. 1993. Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes: I – algas clorofíceas. **Biotemas**, **6** (1): 93-106.
- Sipaúba-Tavares, L. H.; Rocha, O. 2001. **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos**. Rima Editora, São Carlos, Brasil, 106pp.
- Vollenweider, R. A. 1974. **A manual on the methods for measuring primary production in aquatic environments**. Blackwell Scientific Publication, Oxford, USA, 225pp.