

## 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<sup>-1</sup>) 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 ( $6.2 \times 10^7$  cells.mL<sup>-1</sup>) on the 5<sup>th</sup> 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  $\text{CHU}_{12}$  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  $3 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>, 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  $10 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup> para o meio IN e de  $7,1 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> para B30. No meio B30, foi adicionado 0,01g.L<sup>-1</sup> 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.

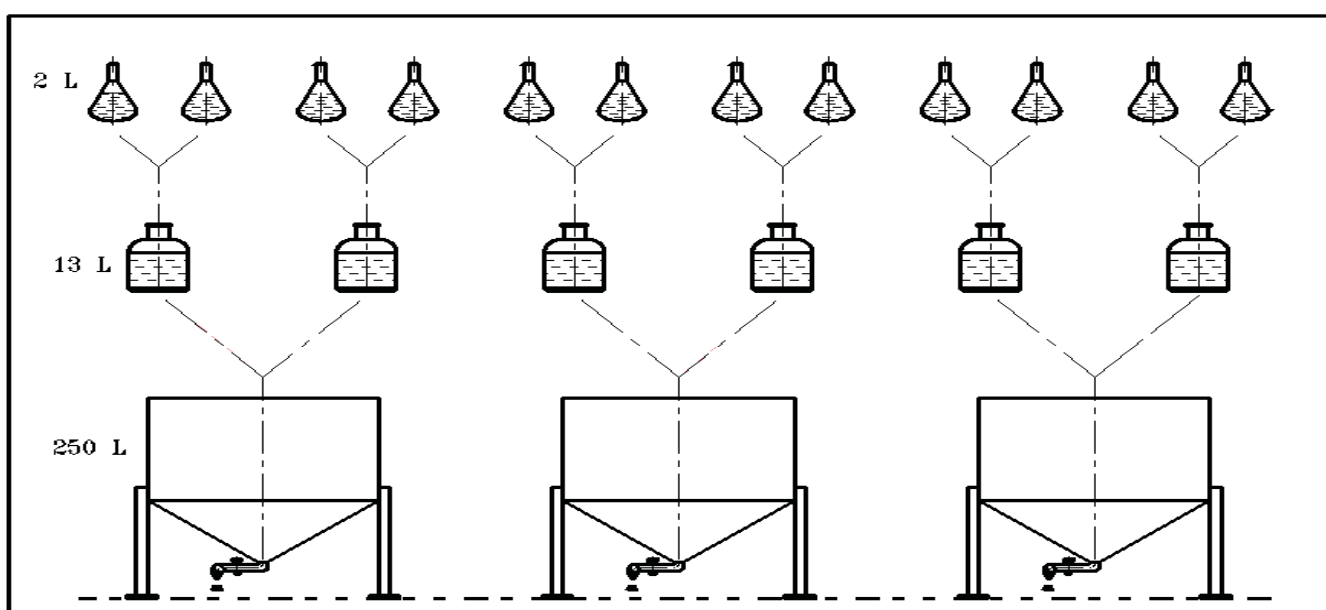


FIGURA 1: Esquema do cultivo da alga *Ankistrodesmus gracilis* em laboratório nos volumes de 2L, 13L e 250 L.

### 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<sup>-1</sup> para IN e B30 em 2L e no volume de 250L de  $6,6$  e  $6,1 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> 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 ( $\mu\text{m}$ ) 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 ( $\text{NMP.mL}^{-1}$ ) e a técnica de plaqueamento em profundidade (pour plate) para microrganismos mesófilos expressos em unidade formadora de colônia ( $\text{UFC.mL}^{-1}$ ) (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 ( $\text{DBO}_5$ ), 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 ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	B30 ( $\text{mg.L}^{-1}$ )
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. $\text{mL}^{-1}$ , 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. $\text{mL}^{-1}$ ) (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. $\text{mL}^{-1}$ , 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. $\text{mL}^{-1}$  inferior ao IN em 250L com  $7,0 \times 10^6$  células. $\text{mL}^{-1}$ . 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. $\text{mL}^{-1}$  e, no meio com esterco biodigerido (20 dias) no 2º dia com aproximadamente  $7,0 \times 10^5$  células. $\text{mL}^{-1}$ . 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. $\text{mL}^{-1}$ ), quando comparado aos resultados deste estudo.

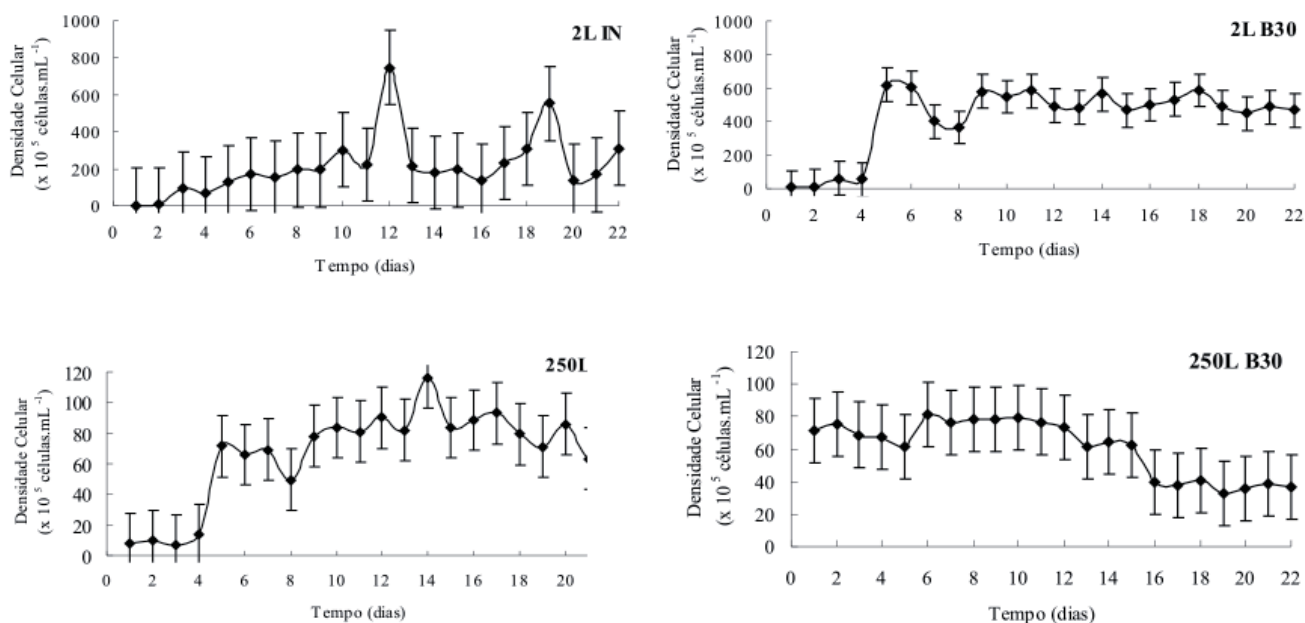


FIGURA 2: Crescimento da alga *Ankistrodesmus gracilis* cultivada em 2L e 250L em meios “*in natura*” (IN) e biodigerido em 30 dias (B30).



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  $\mu\text{m}^3$  para o meio IN e 73,03 a 427,86  $\mu\text{m}^3$  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  $\text{CHU}_{12}$  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  $\text{pg.cél.}^{-1}$  para o meio IN e de 3,2 a 3,36  $\text{pg.cél.}^{-1}$  para B30, sendo superior a obtida por

Sipaúba-Tavares e Rocha (1993) para a mesma alga cultivada em meio NPK (0,01 $\text{pg.cél.}^{-1}$ ) 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  $\text{pg.cél.}^{-1}$ ) quando comparado com o B30 no mesmo volume (31  $\text{pg.cél.}^{-1}$ ), porém em larga escala (250L) o B30 (70,8  $\text{pg.cél.}^{-1}$ ) foi maior (Tabela 2).

Esses resultados foram superiores aos encontrados por Sipaúba-Tavares e Rocha (1993) trabalhando com *A. gracilis* utilizando o meio  $\text{CHU}_{12}$  (1,40  $\text{pg.célula}^{-1}$ ). 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  $\text{pg.célula}^{-1}$ ) aos encontrados neste estudo.

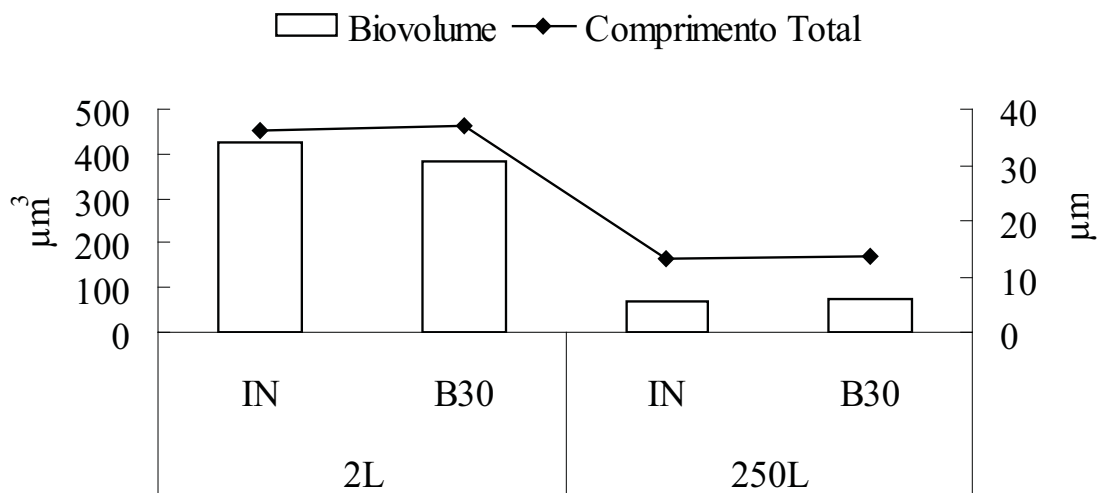


FIGURA 3: Biovolume e comprimento total da alga *Ankistrodesmus gracilis* cultivada em 2L e 250L nos meios “in natura” (IN) e biodigerido em 30 dias (B30).

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. <sup>-1</sup> )	7,5 ± 1,7 <sup>a</sup>	3,2 ± 9,4 <sup>a</sup>	4,2 ± 3,2 <sup>b</sup>	3,4 ± 2,1 <sup>b</sup>
Peso Seco (pg.cél. <sup>-1</sup> )	85,0 ± 1,5 <sup>a</sup>	31,0 ± 4,5 <sup>a</sup>	24,6 ± 3,4 <sup>a</sup>	70,8 ± 4,3 <sup>a</sup>
Fibra Bruta (% de PS)	15,7 ± 0,9 <sup>a</sup>	14,3 ± 0,9 <sup>a</sup>	21,4 ± 4,3 <sup>a</sup>	12,0 ± 8,2 <sup>a</sup>
Proteína Bruta (% de PS)	19,3 ± 0,5 <sup>a</sup>	30,2 ± 0,9 <sup>a</sup>	33,7 ± 2,7 <sup>a</sup>	36,6 ± 1,7 <sup>b</sup>
Lípídeo (% de PS)	17,0 ± 0,7 <sup>a</sup>	20,5 ± 2,0 <sup>a</sup>	7,9 ± 1,3 <sup>b</sup>	8,5 ± 1,0 <sup>b</sup>

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<sup>-1</sup> 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  $8 \times 10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> e no B30 de  $6,9 \times 10^3$  a  $3,1 \times 10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>. 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<sup>-1</sup> (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<sup>-1</sup>).

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 CHU<sub>12</sub> 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  $\text{CO}_2$  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  $\text{CO}_2$

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  $\text{DBO}_5$  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 ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$54,5 \pm 7,5^a$	$42,0 \pm 9,9^b$	$41,9 \pm 5,2^b$	$39,5 \pm 16,1^b$
$\text{CO}_2$ 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 ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$507,5 \pm 213,1^a$	$146,9 \pm 148,8^b$	$22,7 \pm 19,1^a$	$65,4 \pm 12,6^a$
$\text{DBO}_5$ ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$11,4 \pm 0,6^a$	$8,7 \pm 1,5^b$	$10,6 \pm 2,4^a$	$9,3 \pm 3,2^b$
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  $\text{DBO}_5$ : 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**. 15<sup>th</sup> ed. Arlington, Virginia, USA, 683pp.
- American Public Health Association - APHA 1998. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20<sup>th</sup> 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.; Pelicoli, L. C.; Olivera, A. 1999. Use of inorganic (NPK) and the CHU<sub>12</sub> 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.