

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO PROFISSIONAL - TECNOLOGIA EM AQUICULTURA CONTINENTAL

**CULTIVO DA MICROALGA *Scenedesmus quadricauda* EM
EFLUENTES DE BIODIGESTÃO DE AVES E SUÍNOS**

JOSÉ BENEDITO GIRARDELLO VENDRÚSCOLO

GOIÂNIA - GO

2009

JOSÉ BENEDITO GIRARDELLO VENDRUSCOLO

**CULTIVO DA MICROALGA *Scenedesmus quadricauda* EM
EFLUENTES DE BIODIGESTÃO DE AVES E SUÍNOS.**

Dissertação apresentada à Coordenação do Mestrado Profissional – Tecnologia em Aqüicultura Continental, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Aqüicultura Continental.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Eloísa Cardoso da Rosa

GOIÂNIA - GO

2009

V453c Vandrúscolo, José Benedito Girardello.

Cultivo da microalga *Scenedesmus quadricauda* em efluentes de biodigestão de aves e suínos / José Benedito Girardello Vensdrúscolo. – 2009.
45f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Goiás, Mestrado Profissional – Tecnologia em Aqüicultura Continental, 2009.

“Orientadora: Profa. Dra. Maria Eloísa Cardoso da Rosa”.

1. *Scenedesmus quadricauda* – cultivo. 2. Microalga. 3. Aqüicultura. 4. Biodigestão – aves – suínos. I. Título.

CDU: 582.263:639.3(043.3)

JOSÉ BENEDITO GIRARDELLO VENDRÚSCOLO

**CULTIVO DA MICROALGA *Scenedesmus quadricauda* EM
EFLUENTES DE BIODIGESTÃO DE AVES E SUÍNOS.**

Dissertação apresentada a coordenação do Mestrado Profissional – Tecnologia em Aquicultura Continental, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Tecnologia em Aquicultura Continental.

Data da aprovação: 21/09/2009

Profa. Dra. Maria Eloísa Cardoso da Rosa/UCG
Presidente da Banca

Prof. Dr. Prof. Breno Faria de Vasconcelos (UCG)
Avaliador Interno

Prof. Dr. Paulo César Silva (UFG)
Avaliador Externo

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Dra. Maria Eloísa Cardoso da Rosa.

Ao professor Dr. Verner Eichler e sua equipe, aos colegas e mestres do Curso de Aquicultura da Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

À professora Dra. Lúcia Helena Sipaúba-Tavares e sua equipe pela disponibilização do laboratório para treinamento na UNESP de Jaboticabal.

À Dra. Odete Rocha que colocou seu laboratório na UFSCar à disposição.

Ao Dr. Joes Mucci Peluzio, da Universidade Federal do Tocantins.

À Pontifícia Universidade Católica de Goiás por entender o reflexo e a importância que o conhecimento sobre o cultivo de algas como suporte da produção aquícola tem para a sociedade e a ciência, mantendo com esforço esse importante curso que ajudará a entender o ambiente que ocupa $\frac{3}{4}$ da área do globo terrestre.

À Escola Agrotécnica Federal de Ceres por me propiciar o tempo que nunca tive para estudar e voltar a sonhar com contribuições para a Ciência.

À minha família, agradecimento especial pela compreensão, incentivo e apoio.

A todos que estiveram ao meu lado na concretização do meu objetivo, após 40 anos fora da Universidade.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. JUSTIFICATIVA	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 Cultivo de algas	13
3.2 A Microalga <i>Scenedesmus quadricauda</i>	14
3.2.1 Taxonomia	14
3.2.2 Características da microalga.....	15
3.2.3 Meios de cultura	16
3.2.3.1 Condições de cultivo	16
3.2.3.2 Nutrientes minerais e pH	17
3.2.3.3 Nutrientes orgânicos	18
3.2.3.4 Produtos da biodigestão anaeróbica	19
3.2.3.5 Métodos de avaliação e cultivo	20
3.3 Importância de Cultivo	21
3.4 Funções das Microalgas no Ecossistema Aquático	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Primeira Etapa	24
4.1.1 Preparação dos meios de cultura (efluente de biodigestor e meio Chu 12).....	24
4.2 Segunda Etapa	27
4.2.1 Condições de cultivo	27
4.2.2 Tratamentos	29
4.2.3 Avaliações	30
4.2.4 Avaliação estatística	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÕES.....	42
7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Minibiodigestor modelo indiano colocado em vasilha com água aquecida a 35 ⁰ C. para biodigerir os dejetos. _____	25
Figura 2. Experimento instalado: Aerador com filtro milipore distribuidores de ar na câmara de cultivo. Foto do autor _____	28
Figura 3. Sistema de aeração, filtragem e distribuição de ar para o cultivo _____	29
Figura 4. Célula de <i>Scenedesmus</i> em contagem na câmara de Fuchs – Rosentah _____	30
Figura 5: Filtragem de clorofila com suporte de filtro swinex e filtro GF/F _____	31
Figura 6. Filtragem de clorofila _____	31
Figura 7. Evolução do crescimento de células de <i>Scenedesmus quadricauda</i> durante quatorze dias e quatro repetições, cultivadas em diferentes meios de cultura: Chu (CHU), biodigerido de suínos (BS) e aves (BA) em condições controladas. Figura para análise conjunta do pico máximo. _____	35
Figura 8. Evolução do crescimento de células de <i>Scenedesmus quadricauda</i> e seu pico máximo, durante quatorze dias e quatro repetições, cultivadas em meio de cultura Chu (CHU) em condições controladas. _____	38
Figura 9 - Evolução do crescimento de células de <i>Scenedesmus quadricauda</i> e seu pico máximo, durante quatorze dias e quatro repetições, cultivadas em meio de cultura biodigerido de suíno (BS) em condições controladas _____	38
Figura 10 - Evolução do crescimento de células de <i>Scenedesmus quadricauda</i> e seu pico máximo, durante quatorze dias e quatro repetições, cultivadas em meio de cultura biodigerido de aves (BA) em condições controladas. _____	39
Figura 11- Evolução da biomassa de clorofila de células de <i>Scenedesmus quadricauda</i> no 3 ⁰ , 9 ⁰ e 14 ⁰ dias no período de quatorze dias, media de quatro repetições, cultivadas nos três meios de cultura Chu, BS,BA em condições controladas. _____	41

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Resultado da Análise química do esterco natural de suínos (ENS) e aves (ENA) e do biodigerido de suínos (BS) e aves (BA), respectivamente. _____ 26
- Tabela 2.** Análise de variância do número de células da microalga *Scenedesmus quadricauda* em três meios de cultura: Chu (CHU), biodigerido de suínos (BS) e biodigerido de aves (BA) durante quatorze dias de cultivo. _____ 36
- Tabela 3.** A Contagem de células de *Scenedesmus quadricauda* durante 14 dias quatro repetições, cultivadas em diferentes meios de cultura: Chu (CHU), biodigerido de suínos (BS) e aves (BA). _____ 37
- Tabela 4:** Teste Comparativo entre os picos máximos e a contagem de células de *Scenedesmus quadricauda* para os meios Chu, Biodigerido de suínos (BS) e Biodigerido de aves (BA) _____ 40
- Tabela 5:** Análise de regressão para os três meios de cultura: Chu (CHU), biodigerido de suínos (BS) e biodigerido de aves (BA). _____ 40

RESUMO

O alimento originado do plâncton que chega ao peixe é o zooplâncton e sua preferência alimentar na rede trófica são as microalgas, cuja autotrofia permite a riqueza de todos os sistemas aquáticos do mundo. Na produção aquícola os estudos de organismos como as microalgas, que possam permitir a produção sustentável na atividade, são necessários e relevantes. A microalga *Scenedesmus quadricauda* tem características especiais tais como digestibilidade, preferência de consumo, facilidade de cultivo. Objetivando a maximização da produção autotrófica e redução de custos no cultivo da microalga *Scenedesmus quadricauda*, dejetos biodigeridos de suínos e aves foram testados juntamente com meio de cultura Chu, tradicionalmente utilizado para essa finalidade. Esses produtos são disponíveis e de baixo custo na região do Sudoeste de Goiás, graças ao incremento regional da atividade de suinocultura e avicultura e ao seu potencial de crescimento nos últimos anos. Assim, o presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Aquicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Católica de Goiás, atendendo às condições ambientais necessárias para cultivo da microalga *Scenedesmus quadricauda* em meio de cultivo tradicional. Durante quatorze dias foram avaliadas as quatro repetições dos três tratamentos: meios de cultura Chu, biodigerido de aves e biodigerido de suínos. Concluiu-se que o meio de cultivo Chu tradicional pode ser substituído pelos meios de cultivo biodigerido de suínos e aves sem perda na produção de células da microalga *Scenedesmus quadricauda*, uma vez que a comparação entre eles não apresentou diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade. Os picos de crescimento que representam produtividade para os três meios de cultura diferiram entre si com superioridade para biodigerido de aves e suínos em relação ao meio Chu.

Palavras-chave: Microalgas; *Scenedesmus quadricauda*; Biodigerido de Suínos e Aves; Anaerobiose.

1. INTRODUÇÃO

A eficiência das microalgas na produção de biomassa é incontestável e, baseado no princípio de prioridade na produção para aquilo que tenha maiores perspectivas de atender às necessidades humanas tal como alimento de valor e baixo custo e, possivelmente energia barata e sustentável, enumera-se a seguir uma série de argumentos.

As águas continentais brasileiras e a costa marítima estão entre os maiores espaços disponíveis dados a um só país. Por diversos motivos, entre os quais o tecnológico e o filosófico, deixam de explorá-lo e, portanto, deixa-se de produzir para atender a necessidade da população.

O crescimento da produção aquícola nacional tem sido da ordem de 20% ao ano e, para sustentar esse crescimento, é necessário que a ciência forneça os subsídios, evitando que ocorra o que aconteceu nas outras atividades do agronegócio com acumulado déficit ambiental (FAO, 2006).

A alga como ser autótrofo representa o mais eficiente conversor de nutrientes e luz (RICHMOND et al., 1980). Para isso, basta apenas aprender a cultivá-la e disponibilizá-la na hora e no ponto certo de forrageamento do zooplâncton. Este, por sua vez desempenha sua tarefa com grande eficiência apenas na presença da abundância de algas no ponto de consumo (MACEDO, 1999).

Segundo Rocha et al. (1994), clorofíceas unicelulares ou cenobiais são selecionadas em larga escala para servirem de alimento para o zooplâncton, por apresentarem paredes celulares mais finas e quantidade elevada de carbono orgânico total em relação ao peso seco.

Com a mudança dos fatores físicos e químicos no sistema de produção pode-se alterar o tempo e a quantidade produzida. Para que isso se realize com sincronia deve-se estudar o ponto exato em que essa espécie necessita ser consumida para atender a demanda da rede trófica.

Um outro desafio é a obtenção de alta produção de biomassa através de recursos oriundos da natureza e que sejam economicamente viáveis.

Vislumbra-se como alternativa a utilização da biodigestão como fornecedora de nutrientes (eliminando a aplicação direta de dejetos e copiando a natureza na sua capacidade

transformadora de resíduos), permitindo que se chegue à produção de cladóceros, o que poderá colaborar para a instalação de uma aquíicultura sustentável.

Nesse trabalho foi cultivada a microalga *Scenedesmus quadricauda* como alternativa para a produção de biomassa, servindo de base para outros estudos de alimentação de zooplâncton, ou aproveitamento de lipídeos, utilizando para isso, como meio de cultura, dejetos de suínos e aves diluídos após a biodigestão, esperando-se dessa forma colaborar para a produção sustentável da aquíicultura.

Seguindo essa linha de raciocínio o trabalho procurou num resíduo abundante na agropecuária regional um subproduto subutilizado e, portanto, de baixo valor econômico, para substituir os meios de cultivos artificiais de alto custo e ao mesmo tempo mantendo a linha da sustentabilidade. Assim, utilizaram-se como meio de cultura dejetos de suínos e aves biodigeridos de forma anaeróbica, para produzir biomassa de microalga *Scenedesmus quadricauda*.

2. JUSTIFICATIVA

O cultivo de plâncton para alimento de peixes jovens e camarões pode ser considerado como indispensável e insubstituível. O cultivo de microalgas do gênero *Scenedesmus* para alimento de espécies de zooplâncton tem se destacado pela facilidade de manejo destas espécies, e de suas características de alimentação, reprodução e até de facilidade de cultivo. Felisberto et al. (2001) e Macedo (1999), relataram que esta espécie foi a primeira a surgir no habitat originado de enchimento de barragens como na usina hidroelétrica de Corumbá.

Sipauba Tavares & Rocha (2003) constataram que o cultivo de microalgas tem como um dos empecilhos o alto custo dos nutrientes usados para isso e sugere o uso de produtos residuais regionais para aproveitar o excedente e reduzir o custo do cultivo. Os autores sugeriram o uso de vinhaça e suco de laranja em futuros trabalhos de pesquisa.

A curva de crescimento da produção de algas tem um pico de desenvolvimento, sendo que nesse momento o zooplâncton se multiplica produzindo uma grande quantidade de alimento. Se colocado à disposição das espécies aquáticas (zooplâncton), que não conseguem digerí-lo em curto prazo, compromete-se o aproveitamento, desperdiçando-o intacto nas fezes (MACEDO, 1999).

A produção de zooplâncton e seu consumo são tarefas que necessitam de profundos conhecimentos sobre todas as etapas. Pode-se partir da autotrofia da microalga *Scenedesmus quadricauda*, uma espécie povoadora dos ambientes tropicais e destacados por sua qualidade nutritiva (FELISBERTO *et al.*, 2001; MACEDO, 1999).

Utilizando-se meios de cultivo alternativos, presentes na região de produção, que atendam a exigência nutritiva e estabilidade no fornecimento, foram verificadas as curvas de crescimento da microalga *Scenedesmus quadricauda*. Com o domínio de seu cultivo e dos meios se destacando na produção, visualiza-se uma alternativa rumo ao alimento natural e sustentável na produção aquícola.

Em Goiás, pelo desenvolvimento da suinocultura e avicultura, a biodigestão poderá ser uma alternativa para a sustentabilidade do sistema de produção pelo bioprocessamento anaeróbico, uma vez que o produto excedente efluente de biodigestor, apesar do grande valor,

é subutilizado como fertilizante. Considerando que na região de Rio Verde - GO os produtores integrados da suinocultura construíram 131 biodigestores, com capacidade diária de 28 toneladas cada, todas construídas com recursos de projetos que visam o “sequestro de carbono,” visualiza-se na biodigestão um caminho possível e importante do tratamento de dejetos de animais Machado (2007)¹.

O aquicultor está no meio rural e os dejetos de animais constituem o fertilizante mais disponível sendo desperdiçados pela exposição e ocasionando contaminação. Ao natural o produto é de difícil armazenagem, havendo uma tendência do produtor de usá-lo de maneira errônea na aquicultura. Já após a biodigestão espera-se que muitas qualidades sejam melhoradas, inclusive a de facilidade no armazenamento.

A produção de plâncton é vital para a sobrevivência da aquicultura sustentável pelo caráter de ser insubstituível qualitativa e quantitativamente. Porém, esta técnica não se encontra disponível para o produtor. Faz-se necessário que este conhecimento chegue ao produtor, uma vez que todo processo produtivo de plâncton necessita conhecimento e monitoramento de forma a disponibilizar nutrientes e outros parâmetros físico-químicos adequados e na hora certa. A produção deve permitir fornecer as quantidades necessárias de fito e zooplâncton mantendo curvas de crescimento que sustentem a produção aquícola do pós-larva ao adulto.

O entendimento dos parâmetros de cultivo das microalgas e sua produção com baixo custo permitirão com a autotrofia viabilizar a aquicultura de forma sustentável, e talvez produzir lipídeos para as necessidades energéticas ou humanas, ou nutrientes de alto valor alimentício ou farmacêutico.

¹Informação pessoal Méd, Veterinário Iuri Pinheiro Machado, em Rio Verde - GO, agosto de 2007.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Cultivo de algas

A alga como ser autótrofo representa o mais eficiente conversor de nutrientes e luz (RICHMOND et al., 1980), bastando apenas aprender a cultivá-las e colocá-las na hora e no ponto certo de forrageamento do zooplâncton. Este por sua vez desempenha sua tarefa com grande eficiência apenas na presença da abundância de algas no ponto de consumo (MACEDO, 1999).

Lourenço (2006) descreve a alga *Scenedesmus quadricauda* como espécie de microalga utilizável em larga escala para a produção de encapsulados para consumo humano, apresentando rendimento de mais de 30 toneladas por hectare nos cultivos na República Tcheca e Bulgária já em 1995.

Macedo (1999) acrescenta que um dos aspectos mais importantes das interações alga-zooplâncton refere-se à indagação se as algas presentes em um dado ambiente podem sustentar isoladamente a reprodução continuada da comunidade zooplânctônica.

Rocha (2007)² informa que existem picos de produção de microalgas e juntamente um pico de produção do zooplâncton, uma herbivoria do zooplâncton, e depois dos peixes, com consumo (sem digestão e absorção) de forma intermitente tendo como conseqüência o quase desaparecimento das espécies. Para esse pesquisador o controle dos respectivos consumos de uma forma ou de outra resultará numa produtividade maior.

Uma característica muito importante das algas é a notável flexibilidade tanto na variedade de substrato que pode ser assimilado quanto na variação da percentagem dos vários produtos do metabolismo acumulados no interior das mesmas.

Lourenço (2006) salienta que para ser viável para aquicultura uma microalga deve apresentar altas taxas de crescimento, ser de fácil cultivo, ser robusta, apresentar tamanho e forma adequada para ser ingerida, ter parede celular digerível ou ausente, e ter alta qualidade nutritiva. A alta qualidade nutritiva refere-se ao teor de proteína elevado, que nas algas fica em torno de 30% e disponibilidade de carboidratos assimiláveis.

No presente caso à clorofícea *Scenedesmus quadricauda* apresenta alto nível do produto de forma assimilável. Apresenta também alto nível de glicose, o que desperta o consumo do zooplâncton. O mesmo autor comenta que o peixe tem dificuldade de consumo de amidos em função do tamanho da molécula. É o mesmo motivo pelo qual se faz a extrusão da ração. O autor comenta que a substituição da produção primária para o peixe pela ração é algo quase resolvido para peixes adultos, mas no período jovem se está longe de achar uma solução para substituir zoo e fitoplâncton. Os ácidos graxos essenciais poliinsaturados presentes nos lipídeos, comprometem o cultivo quando presentes em baixos níveis, inclusive não é recomendado o uso de uma microalga e sim um conjunto delas para evitar deficiências deste componente importante. O ômega 3 e ômega 6 saem dos lipídeos que têm funções diversas nas microalgas, como isolante térmico, reserva de energia e equilíbrio aquático.

3.2 A Microalga *Scenedesmus quadricauda*

3.2.1 Taxonomia

Bicudo & Menezes (2006) relatam que o termo alga foi usado por Lineu em 1753. No plural Algae nomeia uma das quatro ordens de criptógamas, incluindo 14 gêneros e 214 espécies dos quais apenas cinco gêneros e 14 espécies constituem o que se entende por algas. Os mesmos autores definem algas como os talófitos e protistas clorofilados, alguns inclusive seus parentes não pigmentados, cujos órgãos de reprodução jamais são envoltos por um tecido constituído de células estéreis.

Bicudo & Menezes (2006) relatam que as algas constituem 11 divisões e trinta classes, destacam que entre as divisões encontra-se a Chlorophyta. Pertence a esta divisão a Classe Chlorophyceae família Cnedesmaceae Gênero *Scenedesmus* espécie *quadricauda* sendo que o Gênero *Scenedesmus*, são indivíduos coloniais que vivem flutuando na água com 2, 4, 8, 16 ou raramente 32 células dentro do cenóbio. Este gênero é o mais comum e o mais cosmopolita dos gêneros de algas verdes. O domínio Eukarya em que alguns apresentam clorofila **a** e **b** são chamadas Eukariontes, grupo polifilético (inclui ancestral diverso e antepassado comum mais recente de todos seus membros, constituído pela união artificial de ramos dispersos da árvore evolutiva). No caso das clorófitas o marcador taxonômico é 16: 4n-3.

Segundo Esteves (1998), o grupo *Chlorophyta* ou algas verdes apresentam clorofila **a** e **b** e a classe *Chlorophyceae* possui 8.000 espécies conhecidas sendo que 90% são de

ambientes lacustres. A Ordem *Chlorococcales* onde se encontra o Gênero *Scenedesmus* é um dos mais importantes grupos sob o ponto de vista de presença no ambiente. Pode-se dizer que não existe água onde não ocorra um tipo de alga.

Richmond et al., 1980, o Gênero *Scenedesmus* diferencia-se dos demais porque tem clorofila **b** e a clorofila **a** é comum também às outras famílias.

3.2.2 Características da microalga

A microalga *Scenedesmus quadricauda* tem características especiais para nutrição de zooplâncton e por consequência poderá ser útil a uma aquicultura ambientalmente correta.

Bicudo & Menezes (2006) elucidam que a microalga *Scenedesmus* encontra-se em todos os locais principalmente nos eutróficos. Tem como característica a presença de apenas um cloroplastídeo. Grande parte deste gênero passou para o gênero *Desmodesmus* principalmente aquelas que têm espinho no cenóbio extremo.

No presente caso a controvérsia seria a alteração para *Desmodesmus communis* pelo fator presença de espinhos. Há sempre um pirenóide mais ou menos no centro em cada célula. A microalga utilizada no experimento veio da origem identificada como *Scenedesmus quadricauda* e não apresentou os espinhos característicos da *Desmodesmus communis* aspecto pelo qual foi reclassificada.

Felisberto et. al. (2001), em seu trabalho realizado na fase de enchimento da barragem da usina hidroelétrica de Corumbá – Goiás descreveram que a espécie que predominou inicialmente e após o enchimento completo foi a espécie *Scenedesmus quadricauda*. Para esses autores a representante *Scenedesmus quadricauda* se apresenta com duas variedades: uma descrita por Turpin Brebinson sensu Chodat 1913 com diferenciais de 2-4-8 células externas com espinhos e a variedade westii G.M Smith com espinhos acentuadamente curvos.

Hardy & Castro (2000) testando três espécies de clorófitas entre as quais *Scenedesmus quadricauda* a consideraram alimento adequado para zooplâncton depois de avaliar a qualidade nutricional. A clorófitas foi descrita como sendo *Scenedesmus quadricauda* Brébisson (1835) e foi obtida no laboratório do INPA – Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, em Manaus.

Sipauba-Tavares (1988) esclarece que os organismos zooplanctônicos apresentam preferência alimentar por determinadas espécies de algas e, dentre os diferentes grupos, um dos mais adequados seria o das clorofíceas. Outras algas, como as criptofíceas oferecem um rendimento nutricional maior em virtude de possuírem uma grande quantidade de substâncias nutritivas, como os lipídios. Essa alga é de difícil cultivo o que dificulta o seu uso em grande escala. No entanto, o mesmo autor diz que a *Scenedesmus quadricauda* foi escolhida para cultivo alimentar de zooplâncton em virtude de suas paredes celulares serem mais finas.

3.2.3 Meios de cultura

3.2.3.1 Condições de cultivo

O método de cultivo pelo sistema estático, segundo Sipaúba-Tavares & Rocha (2003) requer que no ambiente de cultivo seja colocado o nutriente específico e a condição de luminosidade para atender a um crescimento a ser avaliado no final do ciclo. Para Beltrão (1992), a condição de luminosidade é um dos fatores que podem interferir muito na produtividade.

De acordo com Esteves (1998), a temperatura do meio pode atuar sobre a produtividade do fitoplâncton de duas maneiras: diretamente sobre a fisiologia dos organismos fitoplanctônicos e indiretamente alterando a distribuição dos nutrientes na zona eufótica, principalmente através de formação de camadas com diferentes densidades. Com a elevação dos valores da temperatura observa-se o aumento da taxa de fotossíntese até o valor ótimo de temperatura que no caso da *Scenedesmus* é em torno de 24 °C a partir da qual as taxas são reduzidas. O mesmo autor diz que na região onde o fator limitante é a escassez de radiação, os processos fotoquímicos são os mais importantes (oxidação e ativação da molécula de clorofila). A temperatura da água é importante também em função do diferencial desta, que altera a densidade da água e ocasiona movimentações causadoras de alterações da produtividade.

Rodrigues & Belli Filho (2004) estudando resíduos da suinocultura tratados com biodigestão concluíram que o pH de 6,5 a 8 do efluente da biodigestão estimula a produtividade das clorofíceas. A biodigestão sem controle do pH libera amônio que absorvida pelas bactérias a desdobra em amônio e CO₂. As alterações da biodigestão resultam numa liberação contínua abastecendo o ambiente e facilitando o desenvolvimento das algas.

3.2.3.2 Nutrientes minerais e pH

Lourenço (2006) descreve que pela ordem de importância relativa dos elementos químicos que as algas mais consomem estão: Fe, C, N, H, O₂, P, Mg, Cu, Zn, S, Mo, K e Ca e outros elementos químicos que são consumidos em menor quantidade como o Na, Cl, Co, Cl, B e I. O índice pH é primordial como fator condicionante da absorção e são também importantes as vitaminas. O nitrogênio introduzido sob forma química na presença de adubação orgânica não apresenta resposta tendo em vista a liberação continuada e mais correta dessa segunda fonte, de modo que os dejetos animais processados anaerobicamente poderão proporcionar uma condição nutricional mais correta às microalgas. Esse autor esclarece também que a concentração de nutrientes tem papel fundamental sobre a produtividade primária do fitoplâncton. Dentre os nutrientes as formas mais importantes são: fosfato, nitrato, amônio e silicato considerados geralmente como limitantes.

Esteves (1998) constata que muitas espécies de algas os absorvem ativamente mesmo quando a concentração interna é maior que a externa, o que lhes permite continuar a crescer e reproduzir-se mesmo após o esgotamento de nutrientes do meio. O meio de cultivo Chu 12 é o mais utilizado para cultivos de clorofíceas, mas Dias-Castro & Hardy (1998) sugerem que se possa usar apenas N P K no cultivo de algas.

Segundo Esteves (1998), os principais cátions presentes nos corpos d'água e, portanto à disposição das microalgas são: cálcio, magnésio, sódio, potássio, ferro e manganês, enquanto que os principais ânions são: o cloreto, sulfato, carbonato e bicarbonato. A condutividade elétrica é que vai dar o parâmetro da presença de sais e pode ser influenciado por variáveis como a temperatura, pH e na maior ou menor presença de macronutrientes, sendo menos influenciável pela presença de nitrito, nitrato e ortofosfato.

Lourenço (2006) faz correlação entre os elementos traço e sua disponibilidade esclarecendo que estes só desempenham sua função na presença de um quelato. No caso do meio de cultivo Chu, o quelato é o EDTA que colocado e dissolvido anteriormente impede a precipitação dos elementos citados.

Hunstsman & Sunda (1980) apud Esteves (1998) fazem a relação entre o elemento traço e o fitoplâncton e a matéria orgânica dissolvida. Estes elementos através do processo de quelação formam os complexos ou compostos de coordenação que se precipitam no

sedimento. É um fenômeno de grande importância para a produtividade do sistema aquático, pois os fosfatos também adsorvem as moléculas orgânicas. Porém são menos eficazes que o elemento traço. Deste modo, quando muitos complexos de coordenação se formam, grande parte do fosfato permanece livre (não precipitado) podendo ser absorvido pelo fitoplâncton e pelas macrofitas aquáticas, aumentando muitas vezes a produtividade. A incorporação do elemento traço no fitoplâncton ocorre principalmente pelos mecanismos passivos de adsorção.

Esteves (1998) revela que os elementos traços tem presença de micronutrientes e ocorrem em baixas concentrações com Mg, Fe, Zn, Mn, Co, Mo e B tem importante papel no metabolismo dos organismos aquáticos, participando dos processos fisiológicos como a fotossíntese (Mg na formação da clorofila), cadeia respiratória (Cu faz parte do citocromo e Fe ferredoxina) e fixação do nitrogênio (Mo faz parte da nitrogenase). Outros elementos como Hg, Pb, Cd, Ag, Cr, Ni e Sn não têm função biológica, são metais pesados e geralmente tóxicos.

3.2.3.3 Nutrientes orgânicos

Faria et al., (2000) descrevem que os chineses há mais de 3000 anos usavam resíduos orgânicos nos tanques de criação de peixes. Nesse trabalho, os autores compararam a adubação de tanques de piscicultura com esterco de aves, suínos, bovinos e coelhos. Constataram maiores densidades de organismos quando se adicionava o esterco de aves seguido de suínos, bovinos e coelhos. Entretanto, o de aves apresentou menor diversidade de espécies. Os mesmos autores relatam que o estrume de aves é o dejetos de maior conteúdo de nutrientes de todos os dejetos das espécies animais criados.

Quando se trata de resíduos orgânicos de animais se fala no uso direto dos dejetos de aves ou suínos para o cultivo de microalgas. O vínculo entre dejetos animais e a aquicultura vem sendo usado desde longa data, e, atualmente rejeitado pelos consumidores em virtude de possíveis problemas sanitários o que não aconteceria com o biofertilizante, que passa por uma fermentação anaeróbica, resultando em melhoria de qualidade nutricional e sanitária (AMORIM et al., 2004).

Outros produtos como a vinhaça e resíduos da industrialização de sucos de laranja têm sido usados no cultivo de microalgas (SIPAUBA-TAVARES & ROCHA 2003). O uso de

suco de laranja já é testado na pesquisa como produto alternativo como destaca Beltrão (1992).

3.2.3.4 Produtos da biodigestão anaeróbica

O uso do efluente de biodigestor resultado do processamento anaeróbio de estrume de aves e suínos poderá constituir um bom caminho para o estudo de cultivo de algas. Estes dejetos processados de forma anaeróbia o tornam um produto equilibrado sob todos os pontos de vista desde o cheiro reduzido, facilidade de armazenagem e redução dos riscos sanitários tendo em vista o próprio processo onde se produz o metano (OLIVEIRA, 1988).

Para Esteves (1998), no processo de biodigestão anaeróbica estará sendo copiado àquilo que a natureza faz na camada limnética inferior. Ali começa a anaerobiose no corpo d'água, uma ação de transformação dos detritos orgânicos com alterações profundas sob o ponto de vista químico, liberando nutrientes desses resíduos e indo constituir compostos químicos indispensáveis por apresentar intensa atividade, especialmente no que diz respeito à solubilização de íons. Diz o autor que anaerobiose é o caminho natural da transformação de resíduos em nutrientes.

Os biofertilizantes entram no sistema como forma de utilizar um meio de cultura mais disponível e aproveitável na propriedade rural de forma menos contaminante do que o produto natural da bovinocultura e avicultura.

Amorim et al. (2004) comprovaram no seu trabalho a eliminação de 99,9% dos coliformes fecais em função da biodigestão.

A sustentabilidade do ecossistema aquático, passa por um conhecimento aprofundado da rede alimentar, de transferência de energia nos diferentes planos, sua capacidade de produção de biomassa em quantidade e qualidade. Os produtos finais da cadeia aquícola só poderão ser econômicos, sustentáveis e equilibrados se forem produzidos pelo modo natural. O alevino e a pós-larva só podem se desenvolver perfeitamente sem doenças se ao menos parte do seu alimento vier por vias naturais (EMERENCIANO, 2005). Para esse autor, os dejetos finais da aquíicultura também exigirão da ciência um melhor conhecimento do aproveitamento dos resíduos de fundo do tanque como forma de aperfeiçoar a produção e minimizar os efeitos maléficos dos resíduos, transformando-os em flocos microbianos reaproveitados na alimentação do sistema aquático.

Para Bicudo & Menezes (2006) destacam ainda que a principal via de produção de alimento pelas algas é a fotossíntese, síntese dos metabólicos essenciais a partir de substâncias químicas relativamente simples (CO₂) e de energia luminosa. É quase exclusivo o uso, por ela, da fotossíntese. Umam conseguem alimentar-se através de osmose.

Para Beltrão (1992) ocorre uma variação da capacidade heterotrófica maior ou menor em função das variáveis que cercam o cultivo e a espécie em questão que pode ser mais ou menos hábil para o mixotrofismo (simultaneidade do auto e heterotrofismo).

Parece claro que deverá ser utilizado o processamento biológico anaeróbio porque representa um dos passos que ocorre na natureza.

Oliveira (1988) demonstrou alteração do pH após a biodigestão, de um valor altamente ácido para um outro próximo da neutralidade.

Souza et al. (2005) em trabalho com biodigestão, estabeleceram que a temperatura em que ocorreu a melhor biodigestão foi a de 35⁰ C.

Sabe-se que os dejetos animais como resíduos da agropecuária podem ser passados pelo processo de anaerobiose, com biodigestão transformando-o em gás e um produto fertilizante estabilizado e de alto valor biológico além de ser de melhor qualidade sob o ponto de vista sanitário Souza et al. (2005).

No entanto, considerando-os como meios de cultura alternativos, estes deverão ser avaliados para observar sua eficiência no cultivo com conhecimento anterior laboratorial para saber os níveis destes nutrientes disponíveis no meio escolhido.

3.2.3.5 Métodos de avaliação e cultivo

A medida de produtividade no cultivo de algas foi feita através de contagem pelo hemocitômetro de Fuchs-Rosenthal com metodologia de Knie (2004). Esta metodologia permite fornecer o número de células de *Scenedesmus quadricauda* por mililitro de líquido, o que se chama de densidade algal.

De acordo com Lourenço (2006) existem outros métodos de avaliação de crescimento das microalgas, como a avaliação da biomassa produzida num determinado meio que poderão ser usados em outras situações ou nesta com objetivo de testar o presente método.

Outro método de avaliação de biomassa muito importante é a determinação de clorofila **a**, cujo protocolo usado se baseia em Marker et al. (1980) e deve ser usado como coadjuvante do método de contagem de células.

3.3 Importância de Cultivo

Os grandes produtores aquícolas do mundo, no mar ou nos sistemas aquáticos continentais, estão ligados à riqueza do plâncton seja por fertilização dos sistemas aquáticos através dos solos que os sustentam ou de erosões que resultaram num corpo d'água fértil e uma produção equivalente (MUELBERT, 2007).

O meio de cultura Chu 12 é utilizado largamente no cultivo de microalgas com varias modificações, sendo considerado meio padrão para o cultivo. Um bom exemplo na cadeia produtiva é o cultivo de *Clorella* desenvolvido por Graeff (2004) na EPAGRI-SC - Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. Neste local efetuou-se a reprodução para fornecimento de cepas a aquicultores tendo utilizado o meio Chu 12 modificado. Obtiveram-se bons resultados, seja para o propósito de servir de forragem para as cadeias produtivas de camarões e peixes ou para o próprio zooplâncton na rede alimentar.

Macedo (1999) estudou a estrutura de nutrientes da microalga e constatou os valores e a qualidade dos lipídeos e seu efeito sobre o zooplâncton estudado demonstrando que na seqüência trófica o crescimento celular depende do valor e qualidade dos lipídeos presentes na microalga. Nesse caminho há citações de Lourenço (2006) que admite certas estratégias de estresse para as microalgas para produzir mais lipídeos. Acrescente-se que este exemplo é apenas um dos que leva a pesquisa a investir nesse caminho visando a produção de biomassa, sobretudo os lipídeos que fazem parte da estrutura da alga, seja como agente de flutuação ou como carregador de nutrientes que não poderiam ser armazenados de outra forma para transmitir energia na rede trófica e também para produção de lipídeos.

Segundo Sipauba-Tavares & Rocha (2003), um metro cúbico de água na zona eufótica, através da fotossíntese produz até 16 gramas de biomassa o que resultaria ao final de um ano nessa condição avaliada o equivalente a cinco quilos da mesma com altíssima qualidade.

Só na usina de Serra da Mesa existem mais de 1.780 Km² de espelho d'água. Supondo-se que se aproveitasse o potencial do país de norte a sul com seus espelhos d'água

existentes nos rios, córregos, lagos naturais, artificiais, açudes, barragens e milhões de hectares de áreas inundáveis a produção naturalmente seria significativa. A Portaria Ministerial nº 1 Secretaria da Aquicultura e Pesca de 10 de outubro de 2007, estabelece que todo espelho d'água público antes desocupado poderá ser disponibilizado e regulamentado e atualmente entregue aos produtores.

Como o alimento principal dos cultivos de Cladóceros é o gênero *Scenedesmus*, faz-se necessário o estudo dos meios de cultivo alternativos disponíveis na região do Cerrado, comparando-os entre si com a finalidade de estabelecer um processo de cultivo que de maneira fácil chegue aos cladóceros.

Segundo Rocha & Sipaúba-Tavares (1994), clorofíceas unicelulares ou cenobiais são selecionadas para o cultivo em larga escala para servir de alimento para o zooplâncton, por apresentarem parede celular mais fina. Assim sendo, como alimento a alga *Scenedesmus quadricauda* apresenta características de qualidade e produtividade indiscutíveis.

3.4 Funções das Microalgas no Ecossistema Aquático

As microalgas habitam o ambiente aquático na região eufótica, necessitando de diversos parâmetros favoráveis para o seu desenvolvimento, entre os quais, se destacam os nutrientes. A presença deles em maior ou menor quantidade alteram os parâmetros físicos ou os próprios parâmetros físicos do corpo d'água alteram os químicos no seu maior ou menor gradiente. Como descreve Beltrão (1992) citando Richmond *et al.*, (1980), a produção intensiva de biomassa algal é limitada por vários fatores principalmente os minerais, CO₂, temperatura e luz. As algas têm eficiência semelhante às plantas superiores no que concerne a capacidade de utilizar a luz. Conseguem aproveitar até 20% da energia dependendo da intensidade que ela chega num determinado ponto do corpo d'água diminuindo sua eficiência a pleno sol.

Infant & Litt 1985 apud Hardy & Castro (2000) esclarecem que a posição central que os herbívoros filtradores, principalmente cladóceros ocupam na cadeia alimentar de água doce tem estimulado os cientistas a estudarem alimentação e nutrição. É bem conhecido que as algas nanoplanctônicas se constituem no mais importante componente do alimento natural de organismos zooplanctônicos. A alga em estudo está nesta categoria (nanoplanctônica).

Hardy & Castro (2000) elucidam que a correlação entre a abundância de fitoplâncton e o desenvolvimento populacional de zooplâncton são frequentemente ressaltados. Neste trabalho os autores citam que Brooks & Dodson (1965) propuseram a hipótese do tamanho-eficiência, onde afirmam que todos os herbívoros planctônicos que competem pelo mesmo tamanho de partícula alimentar (1 a 15 micras) são chamadas nanoplanctônicas e medem 2 a 20 micras.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Campus II da Universidade Católica de Goiás - Laboratório de aquíicultura - Departamento de Zootecnia.

4.1 Primeira Etapa

A primeira fase do trabalho contemplou a recepção e conservação da microalga *Scenedesmus quadricauda* e sua multiplicação; a preparação dos equipamentos e do laboratório; a desinfecção inicial e a preparação dos meios de cultura.

A cultura teve como origem o centro de cultivo da Universidade Federal de São Carlos - Departamento de Biologia, onde estava sob cultivo axênico, sendo identificada a espécie como *Scenedesmus quadricauda*, sendo mantida inicialmente em tubos de ensaio, e posteriormente conduzida para repicagem em um meio de cultivo tradicional (Chu -12).

Foram utilizados equipamentos para a biodigestão do esterco de suínos e aves, para o cultivo e propagação da microalga, para a transferência desse material e para a contagem de células e determinação da clorofila após a montagem do ensaio.

A desinfecção inicial dos frascos de cultivo consistiu em lavagem com água, aplicação de ácido clorídrico (1 mol), enxágue com água destilada e secagem a 50 graus centígrados. Nas superfícies de trabalho (bancadas) usou-se álcool hidratado 70%, conforme sugerido por Lourenço (2006).

4.1.1 Preparação dos meios de cultura (efluente de biodigestor e meio Chu 12)

Os dejetos de suínos e de aves foram processados no laboratório externo de aquíicultura da UCG, Campus II, seguindo metodologia usada por Souza (2005). Primeiramente se processou o estrume bovino para servir de inóculo na iniciação da biodigestão dos dejetos de suínos e aves. Após processar os dejetos de suínos e aves foram introduzidos na mistura numa proporção de 15% (quinze) de efluente processado de bovino e 85% de dejetos suínos ou aves executando a biodigestão à temperatura de 35°C.

Os dejetos de suínos e aves foram utilizados como meio de cultivo após serem processados anaerobicamente no sistema de batelada tendo como origem o setor de produção

do Departamento de Zootecnia da UCG. Os dejetos utilizados foram das aves de postura criadas em gaiola e de suínos, utilizados sem presença de cama. Ambos foram processados no minibiodigestor modelo indiano com capacidade para 12 litros, construído para esta finalidade. A biodigestão durou 52 dias, sendo efetuada a retirada diária do gás (Figura 1). Este material foi usado para cultivo da microalga.

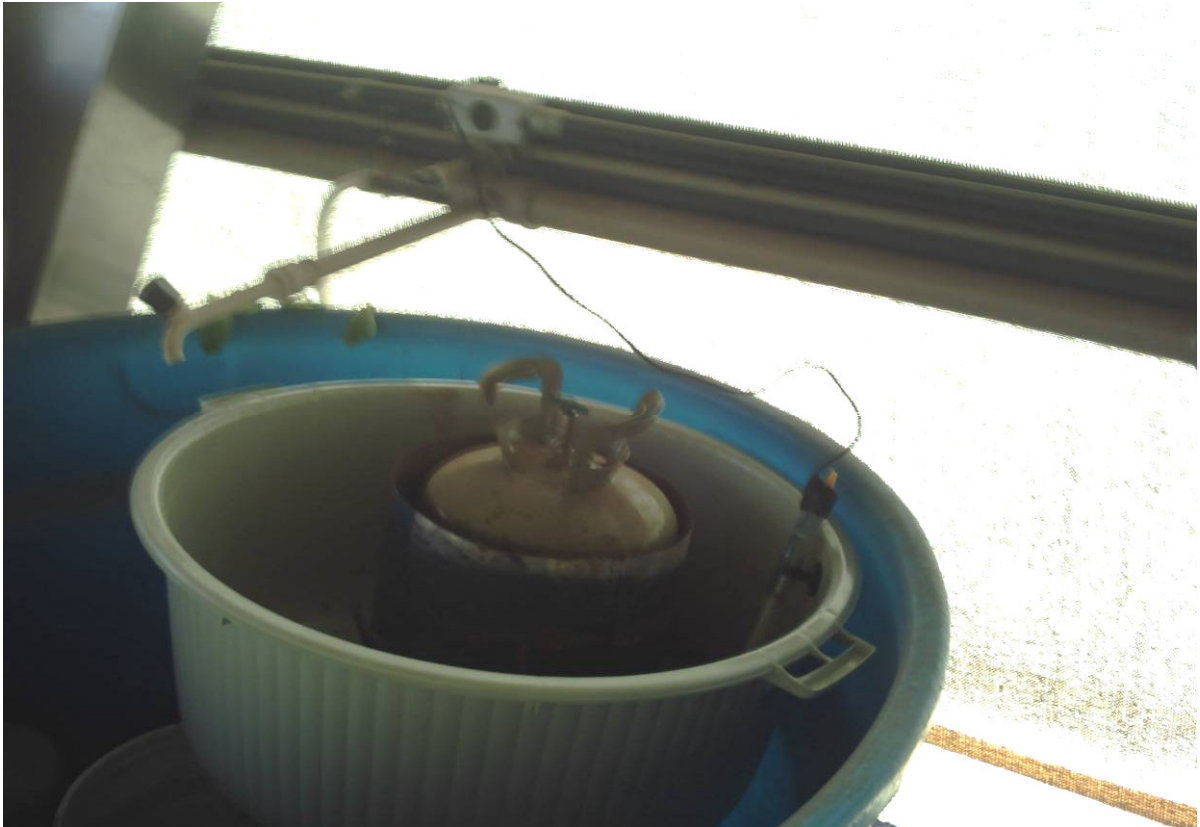


Figura 1. Minibiodigestor modelo indiano colocado em vasilha com água aquecida a 35^o C. para biodigerir os dejetos.

Fonte: O autor

Parte da pré-mistura já líquida e homogeneizada antes da entrada no biodigestor foi retirada para secagem e análise de macro e micronutrientes. Para a avaliação de macro e micro nutrientes do produto natural biodigerido foi adotada metodologia proposta por Veras (2007)

O produto biodigerido foi analisado e os resultados estão na (tabela 1), e este material foi usado para cultivo da microalga

Tabela 1. Resultado da Análise química do esterco natural de suínos (ENS) e aves (ENA) e do biodigerido de suínos (BS) e aves (BA), respectivamente.

Fonte	N	P2O5	K2O	CaO	MgO	S	MO	MM	pH	Cu	Fe	Mn	Zn	Mo	Co	B	U	C/N
ENS	11,7	19,2	3,9	14,48	2,8	2,4	229	71	7,6	300	600	90	240	2,8	6	30	70,0	37,8
ENA	18,2	34,2	13,6	71	4,7	3,4	330	240	8,6	30	2600	510	400	4,7	20	50	43,0	18,5
BS	2,4	3,9	0,2	2,9	0,5	0,3	36	18	7,43	60	700	30	80	20	60	50	94,6	161,1
BA	3,3	4,8	0,7	7,7	0,8	0,5	10	10	7,71	30	920	100	90	20	30	60	98,0	87,9

Para o preparo do meio de cultura Chu 12 foram utilizados seguindo a recomendação de Knie (2004), utilizando os seguintes componentes: 30 mg/l de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$; 75 mg/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 20 mg/l Na_2CO_3 ; 5mg/l K_2HPO_4 ; 5 mg/l KCl; 0,5 mg/l $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 1,0 ml/l EDTA (Extrato dissódico dihidratado - $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Os meios de cultura referentes aos tratamentos testados foram constituídos de água destilada e deionizada acrescidos de 40 gramas por litro de efluente de biodigestor estabilizado, de aves e de suínos, resultantes de processo de biodigestão anaeróbica, diluído em 13 litros de água e agitado para posterior passagem pelo procedimento de autoclave a 120°C durante 20 minutos e uma atmosfera. Após, realizou-se a filtração e diluição para cultivo. Esta metodologia, seguiu a recomendada por Fioresi (2007).

Ainda na primeira fase a microalga recebida do laboratório da Universidade Federal de São Carlos foi multiplicada no meio de cultivo Chu, passando nas condições da câmara de cultivo em tubos de ensaio sem aeração. Na seqüência, o produto foi transferido para o balão volumétrico com aeração, obtendo-se daí o material necessário para a instalação do experimento. Foram necessários 80 ml do meio de cultura concentrado da microalga para cada repetição.

4.2 Segunda Etapa

Nessa fase realizou-se o cultivo da microalga *Scenedesmus quadricauda* em cada tratamento e as devidas avaliações.

4.2.1 Condições de cultivo

A cultura de inóculo de *Scenedesmus quadricauda* foi feita em erlenmeyer de 500 ml contendo 120 ml de meio Chu-12, ou biodigerido de suínos ou aves. Após a neutralização do pH com HCl 10% foi autoclavado por 20 minutos a 120°C . Todos os equipamentos de cultivo, inclusive as mangueiras e os meios de cultura, foram desinfetados na mesma oportunidade na autoclave. Cada erlenmeyer já com os meios de cultura de cada tratamento foi fechado com algodão hidrófobo, pipeta e mangueira fechada na extremidade e colocado na autoclave (Figura 2).



Figura 2. Experimento instalado: Aerador com filtro milipore distribuidores de ar na câmara de cultivo.

Fonte: O autor

Após a retirada da autoclave os frascos de erlenmeyer foram ligados na aeração por 24 horas. Passado esse período estabilizou-se o pH e colocou-se 80 ml. de inóculo concentrado da microalga para o início do cultivo cuja primeira leitura foi feita após 24 horas (Figura 3).

Todo o cultivo nesta fase não axênica foi desenvolvido da mesma forma na câmara de cultivo regulada a 24 graus centígrados e 4000 lux de intensidade.

A irradiância proporcionada a todos os frascos de cultivo foi equivalente, mas mesmo assim foram trocadas de lugar diariamente mantendo-se distâncias e intensidade de luz a cada frasco.

Após a introdução do inóculo ligou-se o cultivo a um filtro milipore especial de 0,22 micras para filtragem de ar, especial para cultivo de microalgas (Figura 3).



Figura 3. Sistema de aeração, filtragem e distribuição de ar para o cultivo.

Fonte: O autor

A pipeta serviu de passagem para condução do ar de agitação e aeração ligando a mangueira na sua extremidade. A aeração foi permanente durante todo o período de cultivo e serviu ao mesmo tempo de agitação para o cultivo.

4.2.2 Tratamentos

Foram utilizados como tratamentos em quatro repetições: Tratamento 1 (T₁) - testemunha (Chu-12); Tratamento 2 (T₂)BS – biodigestão anaeróbia de dejetos de suínos; Tratamento 3 (T₃) BA – biodigestão anaeróbia de dejetos de aves. O biodigerido após homogeneização foi colocado nos frascos de erlenmeyer para receberem o fechamento e a desinfecção.

Cada um dos tratamentos e das quatro repetições recebeu o mesmo manejo no que se refere ao volume do inóculo, desinfecção dos recipientes, iluminação, temperatura e umidade do ambiente com agitação idêntica, para garantir melhor uniformidade inicial de células.

O cultivo foi não axênico, mas durante o processo foram utilizados todos os meios já citados para minimizar os riscos de contaminação. A menor contaminação resultará numa maior precisão do cultivo e seus dados.

4.2.3 Avaliações

Após o período de aeração de 24 horas foram introduzidos 80 ml. da microalga completando 200 ml. de líquido. Após 24 horas foi realizada a primeira contagem de células nas quatro repetições dos três tratamentos, repetindo no mesmo horário por 14 dias seguidos.

A produtividade de biomassa algal de *Scenedesmus quadricauda* no período foi mensurada por meio de contagem de células/ml. em microscópio eletrônico, usando como hemocitômetro a câmara de Fuchs-Rosenthal com fixação de lugol (Figura 4).

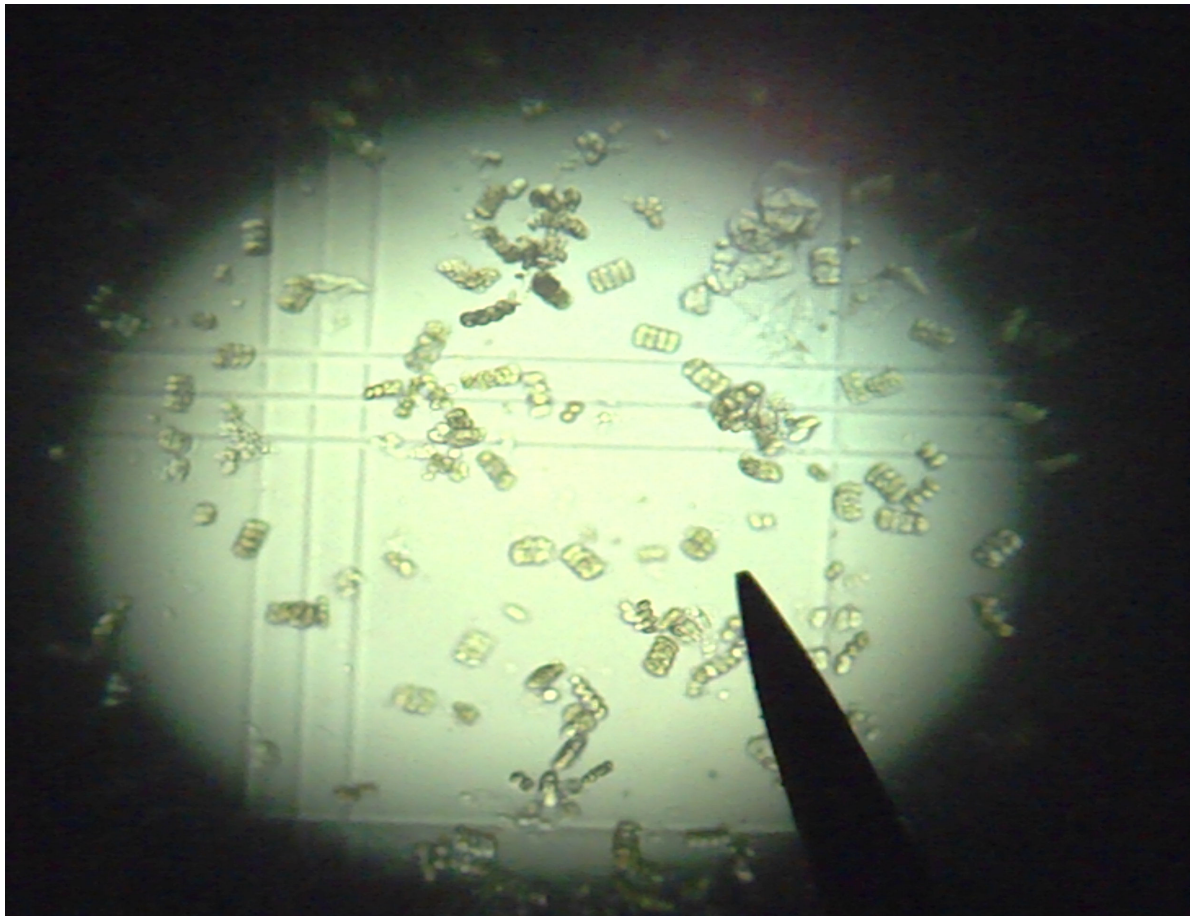


Figura 4. Célula de *Scenedesmus* em contagem na câmara de Fuchs – Rosentah

Fonte: O autor e Guthemberg

No terceiro, nono e décimo quarto dia foi feita a coleta de 20 ml. do cultivo em todos os tratamentos e repetições, para determinação de clorofila a, que foi feita através do método de Marker et al. (1980), utilizando filtragem com suporte de filtro Swinex da Milipore filtro GF/F (Figuras 5 e 6).



Figura 5: Filtragem de clorofila com suporte de filtro swinex e filtro GF/F

Fonte: O autor



Figura 6. Filtragem de clorofila

Fonte: O autor

As amostras de clorofila foram guardadas em papel alumínio sob congelamento em vidro fechado com sílica gel para detectar e retirar a umidade.

A retirada do líquido de cultivo de amostragem foi realizada após a agitação uniforme de cada um dos frascos e o uso de seringa descartável na mangueira de alimentação de ar. O retorno do frasco ao local foi feito mediante troca de local e a ordem de retirada do material para contagem obedeceu ao acaso, procurando a ordem inversa do dia anterior.

Para aeração foi utilizado aerador de aquário com filtro na entrada geral de ar e mangueiras tipo garrote autoclavadas conforme (Figura 2).

Os frascos de erlenmeyer de 500 ml. com 120 ml. de material de cultivo já adaptados à tampa de algodão hidrófobo e mangueira de garrote vedada foram colocados na autoclave e posteriormente resfriados e postos para aerar por 24 horas. Na saída do aerador o ar filtrado foi conduzido para dentro dos frascos ininterruptamente no período de cultivo.

Foram realizadas as seguintes análises e coletados os seguintes dados:

- Análise de macro e micronutrientes dos dejetos de suínos e aves.
- Análise de macro e micronutrientes do efluente processado de suínos e aves.
- Contagem células/ml. - Contagem de amostras do 1º ao 14º dia.
- Avaliação de clorofila - nos 3^o, 9^o e 14^o dias.

Assegurou-se para que nas doze amostras estivessem presentes microalgas de *Scenedesmus quadricauda* com três meios de cultura e quatro repetições.

Diariamente, foram coletadas todas as amostras para contagem.

A retirada da amostra foi feita desligando a mangueira de aeração, pressionando últimos 2 (dois) centímetros, desinfetando com álcool, succionando com seringa descartável e com nova desinfecção retornando ao frasco de erlenmeyer. Neste momento aproveitou-se a ocasião para deslocar a amostra para outro local na câmara num rodízio evitando erros de variação de iluminação.

No valor inicial da amostra uniformizou-se o procedimento de agitação para evitar variações na contagem.

Os meios de cultura foram aerados por 24 horas para estabilizar o meio, sendo consequência da observação inicial que indicava a necessidade do procedimento.

A microalga introduzida foi avaliada a partir de 24 horas como primeira contagem. Em todos os casos foi mantida na câmara de cultivo regulada a temperatura de 24 graus centígrados e luminosidade de 4000 lux durante todo o período. A introdução da alga para cultivo no meio de cultura foi realizada nos meios de cultura filtrados, autoclavados e posteriormente aerados por 24 horas.

O produto foi filtrado GF/F armazenado em papel alumínio e congelado (Figuras 5 e 6).

A leitura foi realizada no espectrofotômetro de colorimetria modelo E 225 D marca CELM precedida de diluição em álcool 90 graus GL. e os demais procedimentos do protocolo de Marker *et al.* (1980).

4.2.4 Avaliação estatística

O experimento foi instalado em um delineamento inteiramente casualizado com 3 tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram dispostos em um esquema fatorial 3 x 14, constituído por 03 meios de cultura (testemunha, suíno e aves) e 14 dias de coleta sendo as médias comparadas pelo teste Tukey a 5% de significância

Os meios de cultura foram submetidos à análise de regressão em função do tempo. Os picos máximos de cada curva foram comparados pelo teste t a 5% de significância.

Foi realizada correlação entre contagem de células e biomassa de clorofila, usando os dados de cada um dos meios no terceiro nono e décimo quarto dia. Para análise estatística utilizou-se o Programa Genes Versão 2006.4.1, Viçosa-MG.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O experimento teve início com o preparo dos meios de cultura oriundos dos esterco de suínos e aves, cujos resultados da análise química constam da Tabela 1 no capítulo materiais e métodos.

Estes resultados diferem dos obtidos por Fioresi (2007) que encontrou teores de N = 9,38 g.kg⁻¹; P₂O₅ = 0,0042 g.kg⁻¹; K₂O = 0,0004 g.kg⁻¹; Ca = 0,5 g.kg⁻¹; Mg = 0,0005 g.kg⁻¹; S = 0,00073 g.kg⁻¹; Mn = 0,15 mg.kg⁻¹; Cu = 0,275 mg.kg⁻¹; Fe = 0,6 mg.kg⁻¹; Zn = 0,225 mg.kg⁻¹.

Fioresi (2007) utilizou também vitaminas do complexo B no processo de cultivo. Quando se comparou o produto final biodigerido obtido neste trabalho com o produto obtido, verificou-se que houve um diferencial no que se refere aos teores dos biodigeridos encontrados. Isso é explicável uma vez que as fontes orgânicas de esterco apresentam uma variação em seus teores de elementos, devido à alimentação ministrada para os animais. É relevante ressaltar, que mesmo apresentando conteúdos diferentes em termos de nutrientes, a proporção usada como referência para ambos os trabalhos foi igual (40 gramas de biodigerido diluído em 1 litro de água e posteriormente diluição em 13 litros de água). Isto demonstra que essa diluição atende às necessidades de cultivo da microalga em estudo, o que corrobora para o estabelecimento de um protocolo viável para cultivo da *Scenedesmus quadricauda*.

Observou-se nesse trabalho que mesmo em meio de cultivo com teores diferenciais em relação aos de Fioresi (2007) houve uma curva de crescimento de células do primeiro ao décimo quarto dia (Figura 1) que seguiu comportamento natural dessa espécie quando cultivada em meio já protocolado para ela. Resultados semelhantes em relação à curva de crescimento por dia foram encontrados para a microalga *Scenedesmus quadricauda* cultivada em diferentes meios de cultura por Hardy & Castro (2000) com pico máximo entre o 8º e o 9º dias e por Macedo (1999) que obteve curva ascendente com pico entre o 12º e o 14º dia, resultados estes semelhantes ao do biodigerido de suíno (BS).

Analisando a evolução do crescimento do número de células da microalga *Scenedesmus quadricauda* produzidas e o seu pico máximo de crescimento nos três meios de cultura (Figura 7), verificou-se que o tratamento de biodigerido de aves (BA) apresentam valores superiores aos demais. Destacou-se também o meio de cultura biodigerido de suínos

(BS) que apresentou valores superiores em termos do número de células após o oitavo dia quando comparado ao meio Chu (CHU).

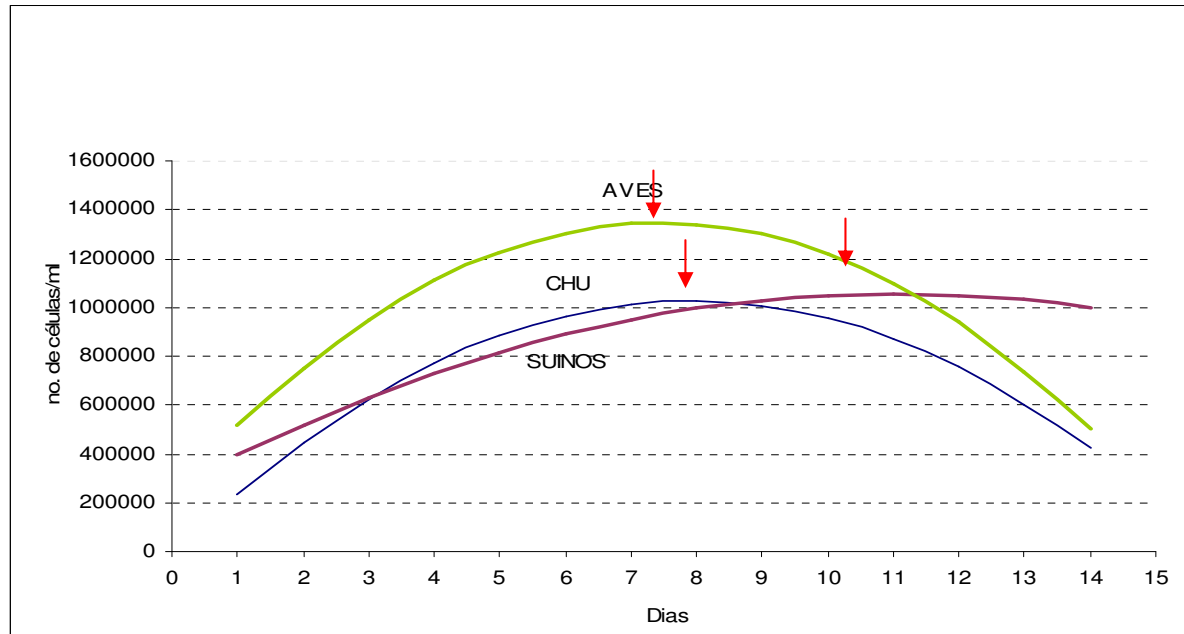


Figura 7. Evolução do crescimento de células de *Scenedesmus quadricauda* durante quatorze dias e quatro repetições, cultivadas em diferentes meios de cultura: Chu (CHU), biodigerido de suínos (BS) e aves (BA) em condições controladas. Figura para análise conjunta do pico máximo.

Fonte: O autor

Embora essa tendência a valores superiores seja percebida quando se comparam os meios de cultura BA e BS com o meio CHU, não ficou comprovada a diferença estatística entre eles como se verifica na Tabela 2. No entanto o mesmo não acontece quando se comparam os picos máximos quando ocorre diferença significativa à melhor para os biodigeridos. Ressalte-se, no entanto, a importância desses resultados uma vez que ambos (BA e BS) poderão ser usados como substitutos do meio Chu (CHU) tradicional com ganhos de produtividade.

Os meios BA e BS poderão ser utilizados também de forma seqüencial, uma vez que o pico de produção de um difere do pico de produção do outro, portanto, constituem fontes de alimentos em épocas diferentes para o zooplantcton.

Tabela 2. Análise de variância do número de células da microalga *Scenedesmus quadricauda* em três meios de cultura: Chu (CHU), biodigerido de suínos (BS) e biodigerido de aves (BA) durante quatorze dias de cultivo.

FV	GL	QM	
MEIOS	2	770.75975	**
ÉPOCAS	13	822.11651	**
MEIOS X EPOCAS	26	105.28112	**
Resíduo	126	21.03052	**

Significativo pelo teste F a 5% de significância; CV % = 8,85%

Na Tabela 2 verificou-se que não houve diferença significativa quando se comparou entre si os meios de cultivo Chu (CHU), biodigerido de suínos (BS) e biodigerido de aves (BA), embora, tenha sido evidenciada a diferença significativa pelo teste F ao nível de 5% ao serem comparadas as épocas de crescimento de células (do 1º. ao 14º. dia) e a interação entre os meios de cultura e épocas foi também significativa..

Comparando a evolução do crescimento do número de células da microalga em estudo (Tabela 3) em meios de cultura oriundos da biodigestão, observou-se a presença de valores superiores porém não significativos do meio de cultura BA. Também o foram em relação aos demais na maioria dos dias que compõem o ciclo de crescimento das células dessa espécie, bem como a diferença em diferentes dias dos meios avaliados. No entanto a superioridade só é demonstrada de forma significativa quando se comparam os picos máximos. Isso demonstra que os meios BA e BS poderão ser utilizados com eficiência em cultivos de grande escala para as regiões produtoras de suínos e aves. Nesses locais há uma tendência de crescimento do processo de biodigestão em grande escala como alternativa para amenizar o problema ambiental que os efluentes têm causado quando utilizados diretamente, sem tratamento prévio. Exemplos da crescente demanda por biodigestores são vistos nos Estado de Goiás Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e de Santa Catarina. Estimativas indicam a existência de 700 biodigestores de grande porte e processamento de 28 toneladas diárias nos integrados de suínos dessas regiões (MACHADO 2007).

Para realização da análise de variância primeiramente os dados de contagem de células de *Scenedesmus quadricauda* por mililitro foram transformados, multiplicando-se por $\sqrt[3]{x}$ uma vez que foi observada instabilidade de resposta, isto é, aumento da proporcionalidade

entre as médias dos grupos experimentais e seus respectivos desvios padrões, configurando a não conformidade dos pré-requisitos exigidos para análise de variância.

Tabela 3. A Contagem de células de *Scenedesmus quadricauda* durante 14 dias quatro repetições, cultivadas em diferentes meios de cultura: Chu (CHU), biodigerido de suínos (BS) e aves (BA).

Meios	DIAS														Média
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Chu	33	35	52	61	103	96	137	114	89	69	81	70	62	54	75,4
	hB	ghB	fghB	efgB	abcB	abcdB	aA	abA	bcdeB	cdefB	bcdefA	cdefB	defgB	Fgh	B
BS	38	48	60	83	73	97	99	116	110	83	91	97	110	110	86,3
	eAB	deAB	cdeAB	bcdC	bcdC	abB	abB	aA	abcAB	abcAB	abcA	abA	abA	abA	B
BA	51	65	76	115	135	156	130	138	125	109	90	70	74	72	106,5
	fA	efA	defA	abcA	abA	aA	abA	abA	abcA	bcdA	cdeA	efB	defB	efB	A
M-	40,6	98,6	62,6	86,3	103,6	116,3	122	112,6	108	87	87,3	79	82	78,6	--
	G	FG	EF	BCD	ABC	A	A	A	AB	BCD	BCD	DE	CDE	DE	

Além disso, sugere-se uma análise econômica, pois os biodigeridos de suínos e aves poderão ter custos menores quando comparados ao meio Chu.

A avaliação econômica e a anaerobiose poderão se juntar no caminho da sustentabilidade na produção de biomassa da microalga *Scenedesmus quadricauda* e na produção aquícola.

As Figuras 8, 9 e 10 obtidas das médias de contagem de células da microalga *Scenedesmus quadricauda* demonstram com mais precisão a evolução do crescimento celular nos três diferentes meios de cultivo.

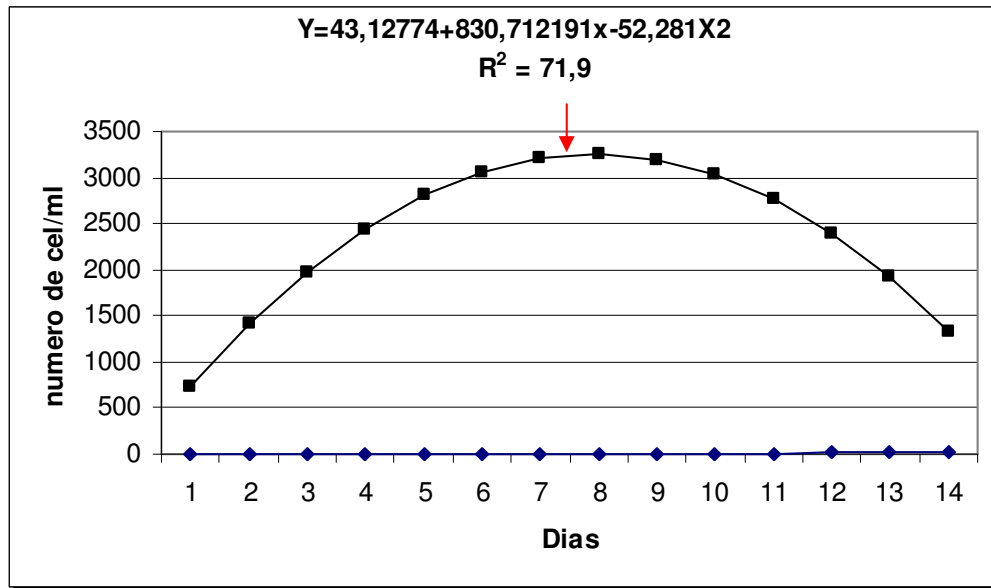


Figura 8. Evolução do crescimento de células de *Scenedesmus quadricauda* e seu pico máximo, durante quatorze dias e quatro repetições, cultivadas em meio de cultura Chu (CHU) em condições controladas.

Fonte: O autor

Observa-se que o pico máximo de crescimento dessa espécie de microalga no meio de cultura CHU ocorreu no oitavo dia com 1.027.492 células por ml.

Na Figura 9, verifica-se que o pico máximo de crescimento da microalga *Scenedesmus quadricauda* no meio de cultura biodigerido de suíno (BS) se deu no décimo primeiro dia com 1.058.085 células por ml.

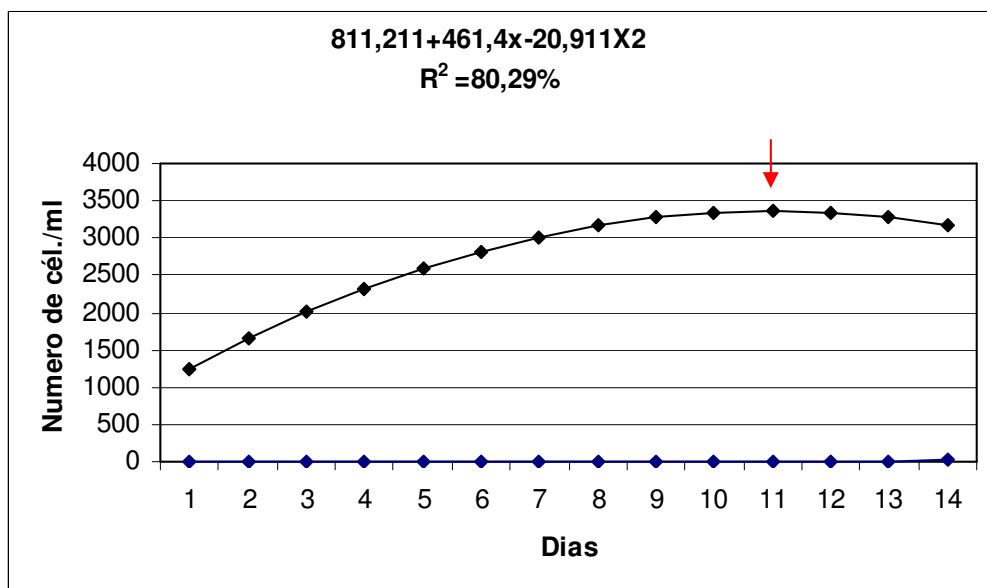


Figura 9. Evolução do crescimento de células de *Scenedesmus quadricauda* e seu pico máximo, durante quatorze dias e quatro repetições, cultivadas em meio de cultura biodigerido de suíno (BS) em condições controladas

Fonte: O autor

Quando se utilizou biodigerido de aves (BA), o pico máximo de crescimento dessa espécie ocorreu aos 7,5 dias apresentando uma contagem de 1.327.756 células/ml. (Figura 10).

Assim sendo, o pico máximo foi calculado e assinalado para cada curva das figuras que representa cada um dos meios de cultura em função do seu número de células o que foi utilizado para estabelecer o critério de produtividade do meio de cultura.

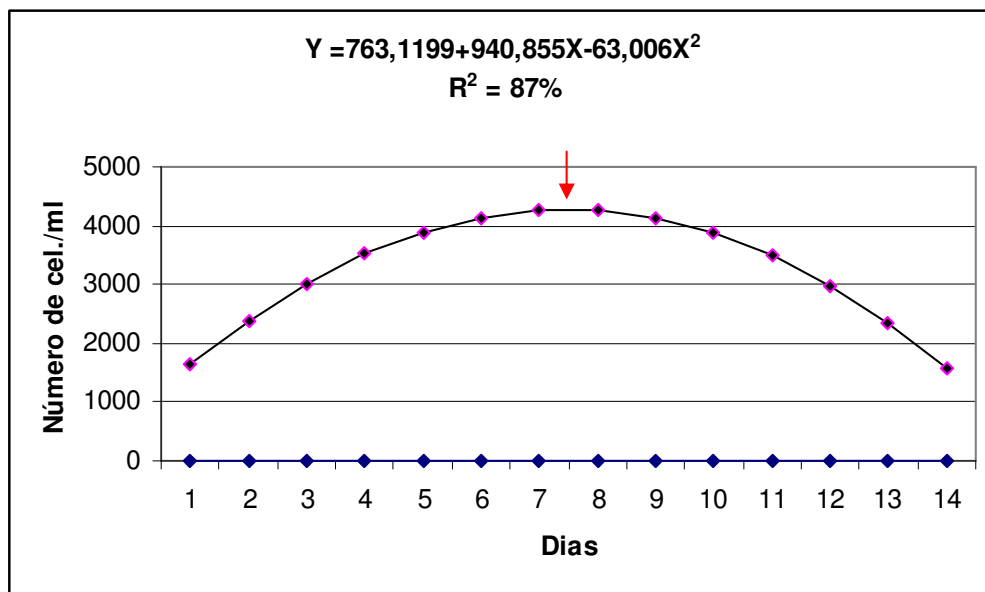


Figura 10. Evolução do crescimento de células de *Scenedesmus quadricauda* e seu pico máximo, durante quatorze dias e quatro repetições, cultivadas em meio de cultura biodigerido de aves (BA) em condições controladas.

Fonte: O autor

Usando o pico máximo como referência pode-se oportunizar ao meio de cultura expressar sua característica de disponibilização de nutrientes para as células em cultivo, que foi diferente para cada meio testado como se observa nas figuras 8, 9, 10e 11.

Os valores constantes da curva embora mantendo uma superioridade para o biodigerido de aves não permitiram dizer da significância dessa diferença quando comparado dia a dia. Mas ao ser realizado o confronto dos tratamentos pelo pico máximo verificou-se uma superioridade do meio de cultura biodigerido de suínos (BS) sobre o meio Chu (CHU) e o meio de cultura de biodigerido de aves (BA) foi superior aos demais de forma significativa ao nível de 5% pelo teste T.

Tabela 4. Teste Comparativo entre os picos máximos e a contagem de células de *Scenedesmus quadricauda* para os meios Chu, Biodigerido de suínos (BS) e Biodigerido de aves (BA)

MEIOS	T CALCULADO	T TABELADO	SIGNIFICÂNCIA
Chu e BS	86.77	2.015	*
Chu e BA	851.67	2.015	*
BS e BA	764,69	2.015	*

*Significativo ao nível de 5%

Observa-se nas Figuras 8, 9 e 10 que o $R^2 = 71,9\%$ para ao meio CHU, $R^2 = 80,29\%$ para o BS e $R^2 = 87\%$ para BA, demonstram o quanto as curvas representam os dados que as originaram estando, portanto, dentro dos níveis de aceitabilidade.

Pode-se inferir que os meios de cultura testados (BA e BS) podem viabilizar um cultivo de baixo custo para a microalga testada. Para as grandes concentrações de criação de suínos e aves onde o biodigerido é subutilizado abre-se uma nova alternativa de produção de uma biomassa de alto valor nutricional e baixo custo.

Na Tabela 5 encontra-se o resumo da análise de variância dos modelos de regressão para os meios de cultura Chu (CHU), biodigerido de suínos (BS) e biodigerido de aves (BA). Para todos os meios de cultura, o modelo de regressão de segundo grau foi o adotado, pelo fato de explicar biologicamente o crescimento celular em função do tempo, apresentar um alto valor do R^2 e de ter sido significativo, a 5% pelo teste F.

Tabela 5. Análise de regressão para os três meios de cultura: Chu (CHU), biodigerido de suínos (BS) e biodigerido de aves (BA).

FV	GL	QM 1 – CHU	QM 2 – BS	QM 3-BA
TOTAL	13			
REGRESSÃO	3	11529998,08*	8758603,87 *	16886132,705
GRAU 1	1	966547,557 *	19859024,524 *	16493 ^{NS}
GRAU 2	1	31838335,881 *	5093514,608 *	46239557,422*
GRAU 3	1	785110 NS	1323272,484 *	4402347,606*
DESVIO	10	266359	480077,775	718517,268
RESIDUO	55			

NS; * Significativo a 5% teste F

Determinando os valores de clorofila no 3º, 9º e 14º dias após o início da instalação do cultivo, verificou-se que houve um acompanhamento proporcional da clorofila a na medida do crescimento celular da microalga. Isso pode ser constatado verificando-se a correlação da clorofila a pelo número de células. ml⁻¹ que para o meio chu (CHU) foi de + 0,62, para o biodigerido de suínos (BS) foi de + 0,92 e para o biodigerido de aves (BA) de + 0,62, o que demonstra confiabilidade nos dados.

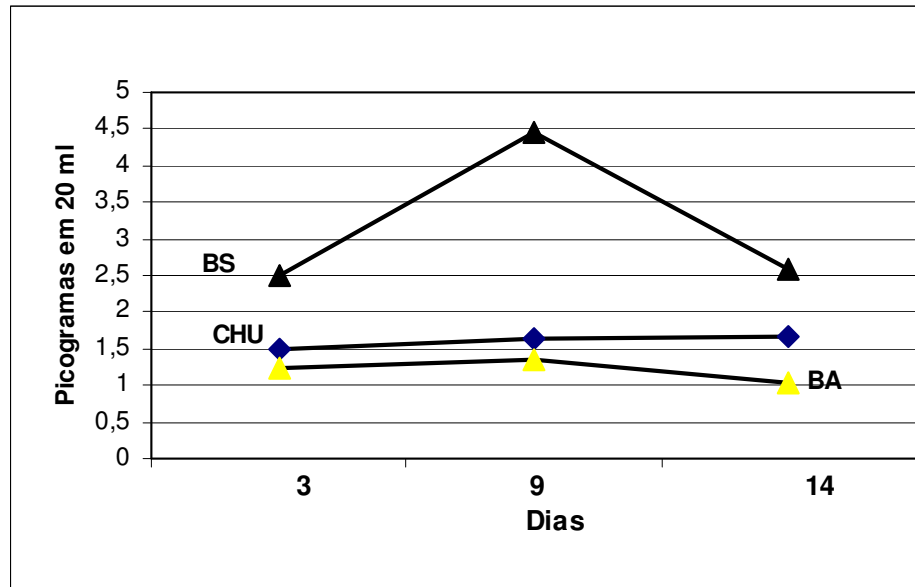


Figura 11. Evolução da biomassa de clorofila de células de *Scenedesmus quadricauda* no 3º, 9º e 14º dias no período de quatorze dias, média de quatro repetições, cultivadas nos três meios de cultura Chu, BS, BA em condições controladas. Picograma = 10⁻¹²

Fonte: O autor

Borges (2005) estudou as espécies de maior capacidade de absorção de carbono medindo os valores de clorofila a e usou como mecanismo de avaliação de produção, a contagem de células até a fase exponencial, antes de chegar ao pico máximo, que ficou entre o quinto e o sexto dia.

No caso de Borges (2005) a clorofila representou o trabalho principal que avaliava melhor o carbono e como coadjuvante usou a contagem de células para confirmar a evolução de crescimento e uma melhor avaliação da biomassa.

6. CONCLUSÕES

Nas condições de realização desse experimento, conclui-se que:

- Os meios de cultura biodigerido de suínos e aves podem substituir o meio tradicional de cultivo Chu;
- O biodigerido de aves foi o meio de cultura que permitiu o maior crescimento numérico de células de *Scenedesmus quadricauda* no período de 14 dias embora tenha sido estatisticamente igual aos demais avaliados;
- O cultivo da microalga *Scenedesmus quadricauda* atinge o máximo desenvolvimento no meio de cultura de biodigerido de aves e suínos respectivamente num intervalo de 8 a 11 dias, sugerindo que este seja o período indicado para a colheita das células;

7. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

AMORIM, A. C.; JÚNIOR, J. L. & RESENDE, K. T. **Biodigestão anaeróbia de dejetos de caprinos obtidos nas diferentes estações do ano**. Unesp Jaboticabal, Depto. Engenharia Agrícola, Jaboticabal v. 24 n.1, p. 16-24, 2004.

BELTRÃO, M. I. **Cultivo de algas clorofíceas (*Ankistrodesmus densus*, *Clorella vulgaris* e *Scenedesmus bijugatus*) em resíduos líquidos de indústria de suco de laranja concentrado**. 1992, 120 p. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, SP, 1992.

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

BORGES, L.; FARIAS, B. M.; ODEBRECHT, C. **Potencial de absorção de carbono por espécies de microalgas**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Oceanografia. Fundação Universidade Federal do Rio Grande, 2005.

EMERENCIANO, M. G. C.; WASIELESKY, W.; SOARES, R. B.; BALLESTER, E. C.; CAVALLI, R. O. & IZEPI, E. M. 2006. **Agregados microbianos: cultivo do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* na fase de pré-berçário**. Aquacultura, 2006. Anais do Congresso Aquacultura, Bento Gonçalves Fundação Universidade Federal do Rio Grande , 2006.

ESTEVEZ, F A. **Fundamentos de limnologia**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 1998, 602p.

FAO. **State of world aquiculture**. Fisheries Technical Paper, Roma, 2006, 500 p.

FARIA A. C. E. A; HAYASHI, C.; SOARES, C. M; GONÇALVES, G. S. **Avaliação de grupos zooplancônicos em tanques experimentais submetidos a adubação com diferentes substratos orgânicos**. Acta Scientiarum, v. 22/2, p. 375-381, 2000.

FELISBERTO A. S.; RODRIGUES, L.; LEANDRINI, J. A. **Clorococales registradas na comunidade perifítica no reservatório de Corumbá, Estado de Goiás, Brasil, antes do represamento das águas**. Acta Scieniarum, Maringá, v. 23, n. 2, p. 275-282, 2001.

FIORESI, T. **Uso de meio à base de esterco de suínos para o cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (CHLOROPHYTA) em laboratório**. Dissertação de Mestrado, UNESP, Jaboticabal, 2007.

GRAEF, A. **Método de multiplicação da alga (*Chlorella minutíssima*) para alimentação inicial de um sistema de produção de peixes fitoplanctofagos**. II Congresso Iberoamericano Virtual de Aquicultura, p 127-131, 2004.

HARDY, E. R; CASTRO, J. G. D. S. O. **Qualidade nutricional de três espécies de clorofíceas cultivadas em laboratório**. Acta Amazônica [Acta Amazon.]. Vol. 30, n. 1, p. 39-47, mar. 2000.

KNIE, J. L.W.; LOPES, E.W. B. **Testes toxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004, 289p.

LOPES, J. **Algas microscópicas podem ser o combustível número 1 do planeta. Etanol? Que nada, já existe um combustível bem mais verde.** Revista Superinteressante, n. 243, set. 2007.

MACEDO, C. F. **Estudo da qualidade nutricional das espécies de cladoceros em relação às clorofíceas *Ankistrodesmus gracilis* e *Scenedesmus quadricauda*.** Dissertação de Mestrado, UFMG, 1999.

MARKER, A. F. H.; NUSCH, H.; RAI, H. & RIEMANN, B. 1980. **The measurement of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods: conclusion and recommendations.** Arch. Hydrobiol. Beih., 14: 91-106.

MUELBERT, J. H. **Aula de ressurgência oceânica.** Rio Grande, 2007. Disponível em: <<http://www.lei.furg.br/aula/posofqg.html>>. Acesso em: 20 nov. 2007.

OLIVEIRA, H. T. **Utilização da vinhaça como meio de cultura para *Clorella vulgaris*.** 1988. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de São Carlos, SP, 1988.

OLIVEIRA, S. L. **Cultivo de algas marinhas: princípios e aplicações.** São Carlos: Editora Rima, 2006.

RICHMOND, A. R.; S. Pirt, J.; K. Lee.; Y. M. W. Pirt. **The photosynthetic efficiency of *Clorella* biomass growth with reference to solar energy utilization.** Journal of Chemical Technology and Biotechnology. Vol. 30, Issue 1, 1980, p. 2 –34.

ROCHA, O.; SIPAÚBA-TAVARES, L. H. **Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes: II - organismos zooplânctônicos.** Biotemas, v.7, n. 1/2, p. 94-109, 1994.

RODRIGUES, J. B. R.; BELLI FILHO, P. **Eficiência da microalga *Clorella minutíssima* no tratamento de resíduos de suinocultura enriquecido com uréia.** Biotemas, 17 (2): 7- 26. Florianópolis: UFSC, 2004.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. **Utilização de plâncton na alimentação de larvas e alevinos de peixes.** Tese Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, SP, 1988.

SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; ROCHA, O. **Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos.** São Carlos: Editora Rima, 2003. 106 p.

SOUZA, C. F.; LUCAS JÚNIOR, J.; FERREIRA, W. P. M. **Biodigestão anaeróbia de dejetos de suínos sob efeito de três temperaturas e dois níveis de agitação do substrato - considerações sobre a partida.** Engenharia Agrícola, Jaboticabal, SP, v. 25, n. 2, p. 530-539, 2005.

VERAS, M. C. M. (Org.) **Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes minerais, orgânicos, organominerais e corretivos.** Brasília: MAPA/SDA/CGAL, 2007. 146 p.