

# QUALIDADE NUTRICIONAL DE TRÊS ESPÉCIES DE CLOROFÍCIAS CULTIVADAS EM LABORATÓRIO<sup>1</sup>

Elsa R. HARDY<sup>2</sup>, José Gerley D. CASTRO<sup>3</sup>

**RESUMO** - Três espécies de algas clorofíceas, *Scenedesmus quadricauda* (Brébisson, 1835), *Ankistrodesmus gracilis* (Korsikov, 1953) e *Pediastrum duplex* (Meyen, 1829), foram cultivadas no laboratório, usando como meio de cultura adubo químico N:P:K na proporção 20:5:20, respectivamente. O valor nutricional das algas foi avaliado pela concentração de clorofila-a e pelo carbono orgânico. As três espécies algais apresentaram alto valor nutricional, particularmente *Scenedesmus quadricauda*, que apresentou a maior percentagem de carbono em relação ao peso seco (21%), sendo considerada como alimento adequado para os organismos filtradores.

**Palavras-chave:** Algas, clorofíceas, Cultivo, Análise química.

## Nutritional Quality of Three Species of Chlorophyceae Cultured in the Laboratory

**ABSTRACT** - Three species of Chlorophyceae algae *Scenedesmus quadricauda* (Brébisson, 1835), *Ankistrodesmus gracilis* (Korsikov, 1953) and *Pediastrum duplex* (Meyen, 1829), were cultivated in the laboratory, using as a culture medium chemical fertilizer N:P:K in the proportions 20:5:20, respectively. Total chlorophyll-a and organic carbon content were used to evaluate the nutritional values of the three algae. All presented good nutritive values, however, the percentage of carbon versus dry weight was higher in *Scenedesmus quadricauda* (21%) compared with the other species analysed. The three species were considered to be suitable food for zooplankton.

**Key-words:** Algae, Chlorophyceae, Chemical analysis, Culture.

## INTRODUÇÃO

A posição central que os herbívoros filtradores, principalmente Cladocera, ocupam na cadeia alimentar de água doce tem estimulado os cientistas a estudarem sua alimentação e nutrição. É bem conhecido que as algas nanoplanctônicas se constituem no mais importante componente do alimento natural de organismos zooplanctônicos (Infante & Litt, 1985; Lampert, 1982, 1987), além de bactérias, detritus e outras algas, como as cianofíceas. O conhecimento da composição do alimento natural na

água doce pode fornecer informação sobre as interações competitivas entre as espécies (Kerfoot *et al.*, 1985); a abundância relativa de espécies de *Daphnia* é considerada fator primordial entre outros aspectos da ecologia de comunidades do zooplâncton (Gliwicz & Siedlar, 1980; Goulden *et al.*, 1982). Desde que o valor nutricional do item alimentar é o resultado de várias propriedades, como ingestibilidade, assimilabilidade, toxicidade, composição bioquímica, tamanho da partícula em relação ao tamanho do corpo do animal, somente experimentos de crescimento podem prover informação sobre a utilização

<sup>1</sup>Parte de dissertação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do INPA/ FUA, do Curso de Biologia de Água Doce e Pesca Interior, nível Mestrado, do segundo autor

<sup>2</sup>Pesquisador Titular do INPA/CPBA. C.P. 478 - 69011-970 - Manaus, AM, Brasil

<sup>3</sup>Bolsista da CAPES

final de certo alimento. Lefevre (1942), investigando a utilização das algas por cladóceros, qualificou-as de acordo com o teor alimentar como: bom, intermediário ou pobre. Alguns trabalhos mostram evidências que o alimento de melhor qualidade para uma espécie não é somente dependente do seu alto valor nutricional, mas que o tamanho e a forma também tem importância. Por exemplo, Infante & Litt (1985) estudaram, no Lago Washington, 10 espécies algais e mostraram que, apesar das espécies *Stephanodiscus niagarae* e *Tabellaria fenestrata* apresentarem os maiores valores de carbono e nitrogênio, não resultaram em “bom” alimento para as espécies *Daphnia pulex* e *D. thorata*, que mostraram maior produção de ovos e aumento de biomassa quando alimentadas com as algas unicelulares, *Cryptomonas erosa* e *Stephanodiscus hantzschii*. O teor de carbono é uma importante medida para caracterizar o valor nutricional das algas, e pode representar 40 a 60% do peso seco da célula (Vollenweider, 1974). Correlações entre a abundância do fitoplâncton e o desenvolvimento populacional de zooplâncton são frequentemente ressaltadas na literatura (Lewkowick, 1971; Limpadanai, 1971; Goulden, 1972). Nesses trabalhos assume-se que toda alga, independente da espécie e tamanho, é alimento potencial para Cladocera. Isto não é totalmente certo uma vez que o tamanho máximo de partículas ingeríveis é determinado pelo tamanho do animal, pela forma e

pelo tamanho das algas.

O tamanho da partícula, compatível com a capacidade de ingestão dos organismos zooplantônicos, vem sendo estudada desde que Brooks & Dodson (1965) propuseram a hipótese “tamanho-eficiência”, a qual afirma que: 1) todos os herbívoros plantônicos competem pelo mesmo tamanho de partícula alimentar (1 a 15  $\mu\text{m}$ ), ou seja, a hipótese assume que o tamanho mínimo da partícula é independente do tamanho do animal; 2) o zooplâncton de maior porte (primíparas > 1 mm) é mais eficiente em coletar partículas maiores.

Nos trópicos, o estudo de crescimento de zooplâncton utilizando alimento algal é recente (Tavares & Matsumura-Tundisi, 1984; Matsumura-Tundisi & Tavares, 1986; Jayatunga, 1986; Hardy, 1989; Rocha & Matsumura-Tundisi, 1990; Diaz-Castro & Hardy, 1998). Nesses trabalhos, o gênero de algas mais usado foi *Scenedesmus*, considerado como alimento de alto teor nutritivo.

No presente estudo, temos o objetivo de, usando o meio adubo químico N:P:K, determinar os valores de clorofila-a, carbono orgânico, peso seco, cinzas e o volume de três espécies de clorófitas, comuns nos ambientes aquáticos naturais e artificiais dos trópicos e com grande potencial para utilização como item alimentar para o cultivo de zooplâncton.

## MATERIAIS E MÉTODOS

*Procedência e cultivo das algas:*  
O inóculo inicial de *Scenedesmus*

*quadricauda* foi obtido no laboratório de zooplâncton do INPA, e os inóculos de *Ankistrodesmus gracilis* e *Pediastrum quadricauda* foram fornecidos pelo Laboratório de Fisiologia de Algas, da Universidade Federal de São Carlos, SP. Como meio de cultura foi utilizado adubo químico (NPK; 20:5:20 g/L), um meio alternativo mais barato e tão eficiente quanto o meio padrão CHU<sub>12</sub> (Sipaúba-Tavares & Rocha, 1983; Sipaúba-Tavares, 1995). O meio de cultura foi preparado utilizando os adubos uréia (fonte de nitrogênio), super fosfato simples (fonte de fósforo) e sulfato de potássio (fonte de potássio), segundo Tavares (1988). A manutenção do meio de cultura foi feita por dois métodos:

a) Cultura sólida: 1,0 ml de adubo químico (N:P:K) foi adicionado a um litro de água destilada, aquecido em estufa elétrica a 60°C. 20 g de ágar foi acrescentado à mistura. Este meio foi esterilizado em autoclave (120°C por 20 minutos), e colocado em placas de Petri esterilizadas; após 24 horas, com pipeta de Pasteur esterilizada e próximo ao bico de Bunsen, os clones de cada espécie de alga foram inoculadas nas placas de Petri e estocadas em geladeira à temperatura de 10°C, para posterior utilização. Após três a quatro semanas de crescimento as algas estavam adequadas para serem utilizadas.

b) Cultura líquida: Este meio de cultura foi preparado em erlenmeyers de 1000 ml, utilizando-se a mesma metodologia do item (a) sem a adição

do ágar. Com a pipeta de Pasteur as células algais foram retiradas do meio sólido e imediatamente inoculadas no meio líquido. Cada erlenmeyer, devidamente fechado com algodão, continha uma espécie de alga e tinha um sistema de aeração contínua, mantendo os nutrientes e as algas em suspensão. A câmara de crescimento era continuamente iluminada com lâmpadas fluorescentes de 2500 lux.

As culturas não foram axênicas, mas para o isolamento das algas e o manuseio do meio de cultura, e da vidraria, técnicas padrões de esterilização foram usadas para minimizar a contaminação com bactérias de laboratório. Sempre que foi necessário, novos meios de cultura foram feitos, seguindo o mesmo procedimento. Com o objetivo de verificar a eficiência do meio de cultivo N:P:K, a espécie *S. quadricauda* foi cultivada também no meio CHU<sub>12</sub>.

**Volume das algas:** Foram usadas 50 células de cada espécie algal para determinar o volume, seguindo a metodologia proposta por Vollenweider (1974): as dimensões das células sempre correspondem a uma figura geométrica. As algas foram medidas utilizando-se um microscópio marca WILD M PS51, com ocular micrométrica.

Para *S. quadricauda* e *P. duplex*, empregou-se a fórmula para o cálculo do volume de um cilindro ( $V = \pi \cdot r^2 \cdot h$ ). Para *A. gracilis*, célula alongada, utilizou-se a fórmula para o cálculo do volume de um cone ( $V = (\pi/3 \cdot r^2 \cdot h) \cdot 2$ ).

Todas as medidas foram calculadas em  $\mu\text{m}^3$ .

#### **Análise físico-química das algas:**

As análises químicas e físicas foram feitas em triplicata utilizando-se as algas em fase exponencial de crescimento (5-7 dias), em que apresentam maior capacidade fotossintética.

**Clorofila-a:** A concentração da clorofila-a foi determinada segundo Parsons *et al.* (1989). Cerca de 20 ml de suspensão algal foi filtrada em filtro de fibra de vidro GFC (0.7  $\mu\text{m}$  de poro). As leituras foram feitas em um espectrofotômetro de marca MicroNal, Modelo b380, em três diferentes comprimentos de onda: 630 nm, 645 nm e 665 nm. Posteriormente, procedeu-se a uma leitura adicional a 750 nm para correção de turbidez.

A densidade das algas foi avaliada tomando amostras diárias de 1 ml de cultura com pipeta esterilizada e fazendo a análise quantitativa utilizando um microscópio marca Wild M PS51 e uma câmara de área reticulada dupla de Neubauer, como proposto por Margalef (1974). A densidade das algas foi então calculada como proposto por Oliveira *et al.* (1985).

**Peso seco:** O peso seco é uma medida comum para expressar a biomassa de organismos planctônicos (Bottrell *et al.*, 1976). Foi determinado retirando-se 50 ml de cada cultura, com uma densidade de algas conhecida e centrifugando-as a 1500 rpm por 20 minutos. Posteriormente, foram lavadas com água destilada,

como proposto por Nalewajko (1966). Em seguida as amostras foram filtradas em filtro de fibra de vidro previamente pesado; o filtro foi secado a 60°C até peso constante; utilizou-se uma balança analítica marca Gehaka, Modelo A 680. O peso seco foi calculado por diferença entre o peso do filtro depois de seco e o peso do filtro inicial.

**Cinzas:** Para determinação do conteúdo de cinzas das algas, a matéria seca foi incinerada em mufla a 550°C por 4 horas (Nalewajko, 1966). O conteúdo de cinzas foi calculado pela diferença entre o peso do material depois de frio e o peso seco total, anteriormente determinado. Conhecido o número de algas filtradas, foi determinado o peso seco e o conteúdo de cinza por célula, e o resultado expresso em picograma.

**Carbono orgânico:** O conteúdo do carbono orgânico das diferentes espécies de algas foi calculado utilizando-se a metodologia proposta por Parsons *et al.* (1989). O princípio básico envolve a oxidação do carbono por dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) e ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Conhecendo-se a densidade por ml da suspensão algal, a quantidade de carbono orgânico por célula foi então calculada.

O procedimento envolve os seguintes passos: a. filtrar um volume conhecido de suspensão algal através de um filtro de fibra de vidro previamente queimado em mufla à 450-500°C por 24 horas com o objetivo de retirar o material possivelmente oxidável; b. colocar o filtro dentro de um erlenmeyer de 30

ml (com tampa de vidro) e adicionar 1,0 ml de ácido fosfórico e 1,0 ml de água destilada, misturar e colocar a 100°C por 30 minutos; c. prevendo a quantidade de carbono na amostra, calculado como uma porcentagem da matéria seca (Vollenweider, 1974), adicionar quantidades adequadas de oxidante e água destilada na amostra, nas seguintes proporções:

Carbono previsto (até 300 µg); oxidante (2.0 ml); água (0.8 ml); volume final (50 ml); comprimento (5.0 cm). d. misturar e colocar a 100°C (banho de areia) por uma hora; e. medir em espectrofotômetro o coeficiente de extinção da solução branco contra a amostra a 440 nm. O carbono será determinado pela seguinte equação:

$$\mu\text{g C/Litro} = E \times F \times v / V$$
onde, V = Volume de água filtrada em litros, v = volume de oxidante usado, F = Factor (275), E = 1.1 Ef, sendo Ef a diferença da extinção medida previamente. Conhecendo-se o número de células algais filtradas, a quantidade de carbono por célula pode ser determinada e expressa em picograma.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espécie *S. quadricauda* cresceu bem em ambos os meios, apresentando curvas de crescimento similares, com crescimento exponencial entre 5-7 dias e tendência de melhor crescimento no meio N:P:K (Fig.1).

As espécies *P. duplex* e *A. gracilis* apresentaram volumes quase iguais, medindo 491 e 419 µm<sup>3</sup>,

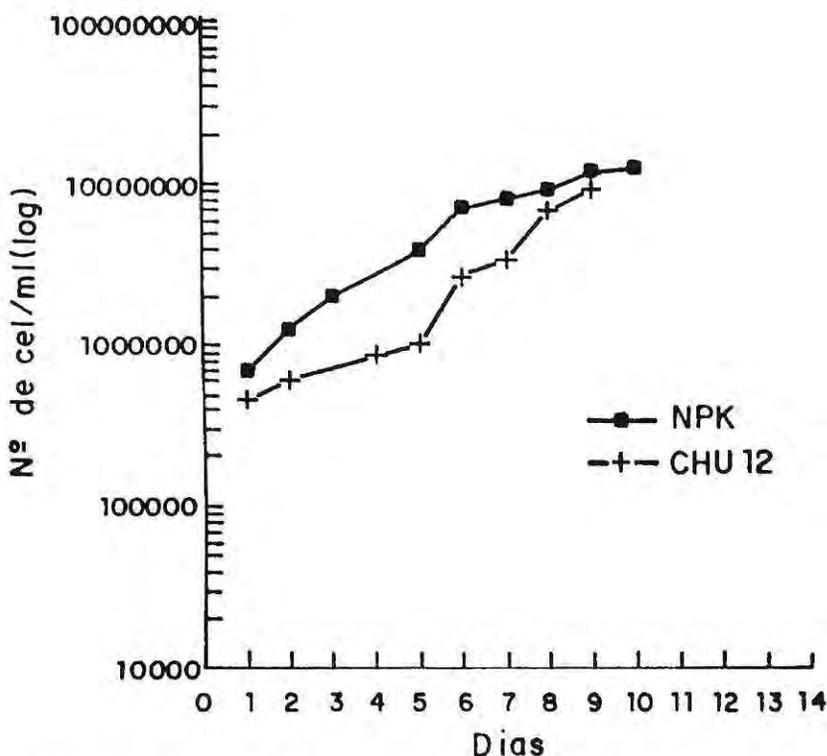
respectivamente, sendo três vezes maiores do que o volume medido para *S. quadricauda*, com 137 µm<sup>3</sup> (Tab. 1).

Os valores encontrados para clorofila-a (Tab. 1) indicaram também que existem diferenças entre as algas estudadas. As maiores concentrações foram encontradas em *A. gracilis* e *P. Duplex*, com 0,10 e 0,15 µg/10<sup>6</sup>, respectivamente, cerca de duas vezes mais do que a concentração encontrada em *S. quadricauda*. Também o conteúdo de carbono por célula foi maior e semelhante em *P. duplex* e *A. gracilis*, 14 e 12 µg/10<sup>6</sup>, respectivamente, do que em *S. quadricauda*, 8 µg/10<sup>6</sup>.

O mesmo padrão foi observado no peso seco e teor de cinzas das espécies algais. A espécie *S. quadricauda* apresentou sempre os menores valores, diferentes das outras duas espécies que apresentaram valores similares (Tab. 1).

A porcentagem de carbono em relação ao peso seco mostrou valores entre 10 a 21%, sendo que a espécie com a maior proporção foi *S. quadricauda*, diferente de *A. gracilis* (10%) e *P. duplex* (11%). Sipaúba-Tavares & Rocha (1993), usando as mesmas características químicas, encontraram para *A. gracilis* em meio CHU<sub>12</sub> um valor de 9,73%, similar ao valor do presente estudo.

Em suma, as espécies *A. gracilis* e *P. duplex* apresentaram valores similares entre si, e maiores do que *S. quadricauda*, exceto nos valores proporcionais de carbono versus



**Figura 1.** Curvas de crescimento populacional de *Scenedesmus quadricauda* em dois diferentes meios de cultura.

**Tabela 1.** Peso seco, características químicas e o volume de três espécies de algas cultivadas em laboratório em meio N:P:K (20:5:20 g/L)

Caracteres	<i>Pediastrum duplex</i>	<i>Ankistrodesmus gracilis</i>	<i>Scenedesmus quadricauda</i>
Volume ( $\mu\text{m}^3$ )	491,0 $\pm$ 35,1	419,3 $\pm$ 28,1	137,9 $\pm$ 27,1
Clorofila-a ( $\mu\text{g}/10^6$ )	0,15 $\pm$ 0,06	0,10 $\pm$ 0,03	0,07 $\pm$ 0,01
Peso seco ( $\mu\text{g}/10^6$ )	138,0 $\pm$ 28,7	125,0 $\pm$ 13,1	41,0 $\pm$ 4,1
Cinzas ( $\mu\text{g}/10^6$ )	14,0 $\pm$ 1,2	10,0 $\pm$ 2,1	2,4 $\pm$ 0,04
Carbono Orgânico ( $\mu\text{g}/10^6$ )	14,0 $\pm$ 1,8	12,0 $\pm$ 2,5	8,0 $\pm$ 3,03
% Carbono em relação Peso seco ( $\mu\text{g}/10^6$ ) (valor médio)	11	10	21

materia seca, em que *S. quadricauda* teve o maior valor, com duas vezes mais do que as outras espécies. Baseado nestes parâmetros as espécies de algas estudadas têm alto valor nutricional.

A qualidade de uma alga não depende somente de sua composição química mas também do seu tamanho e forma. Para Vollenweider (1974), organismos fitoplanctônicos diferem grandemente em tamanho e forma; deste modo, para fazer comparações, deve-se recorrer a um parâmetro adequado e este é o volume. No presente estudo, *A. gracilis* e *P. duplex* apresentam volumes semelhantes enquanto que *S. quadricauda* é uma célula três vezes menor. As três algas também apresentam formas diferentes, *A. gracilis* é uma célula alongada e encurvada enquanto que *S. quadricauda* e *P. duplex* são células arredondadas. Assim, as três espécies utilizadas no presente trabalho foram de tamanho e forma adequados para a alimentação de *Moina reticulata*.

Rocha (1983) encontrou um volume de 269,69 mm<sup>3</sup> por colônia de *S. quadricauda*, volume maior do que o encontrado no presente estudo (137,92 mm<sup>3</sup> por célula). A explicação mais adequada para estes diferentes volumes é dada por Vollenweider (1974): "as dimensões de uma espécie de alga podem ser diferentes de um local para outro e dentro de um mesmo local em diferentes épocas", ou seja, algas crescendo em diferentes condições de cultivo (meios de cultura, intensidade e período de luz) podem apresentar

diferentes tamanhos, como é o caso. As três algas testadas neste estudo não apresentaram formação de colônias, o que é uma qualidade desejável porque favorece a filtração e ingestão por parte de microcrustáceos.

Segundo Round (1973), das cinco clorofilas até agora conhecidas e isoladas, somente a clorofila-a é comum a todos os grupos de algas. Para este autor o conteúdo de clorofila das algas varia de acordo com a intensidade luminosa, podendo chegar até 6% do peso seco em algas cultivadas com pouca luz.

Neste estudo, o conteúdo de clorofila-a em relação ao peso seco variou de 0,08 a 0,18% nas três algas. Assim mesmo, a mudança de cor das culturas algais, variando de verde claro (algas em crescimento exponencial) a verde escuro (grande crescimento populacional, algas senescentes), sugere uma boa condição fisiológica das algas.

Rocha (1983) calculou uma concentração de carbono para *S. quadricauda* de 37,50 µg/10<sup>6</sup>, utilizando também um método que envolvia dicromato de potássio como oxidante. Esta diferença pode estar ligada aos diferentes meios de cultura utilizados e também a que a autora utilizou colônias em vez de células em suas determinações.

Nalewajko (1966), cultivando *S. quadricauda*, *P. duplex*, *A. gracilis* var. *spiriliformis* e fazendo uso de um meio de cultura bifásico (CHU<sub>12</sub> e 10% de extrato de solo de jardim), determinou o peso seco e os valores

médios foram 101,55, 199,45 e 5,45  $\mu\text{g}/10^6$ , respectivamente. No presente estudo o peso seco foi maior para *A. gracilis*, com 138,0  $\mu\text{g}/10^6$ , seguido de *P. duplex*, com 125  $\mu\text{g}/10^6$  e 41  $\mu\text{g}/10^6$  para *S. quadricauda*. Por tratar-se de pequenos organismos onde as medidas de peso seco envolvem alguns erros, as diferenças de peso entre as algas deste estudo e as de Nalewajko (1966) podem ser esperadas.

Díaz-Castro & Hardy (1998), investigando nove parâmetros da história de vida de *Moina micrura*, alimentada com cada uma das três espécies de algas, verificaram que não houve diferenças significantes em oito parâmetros investigados, confirmando que as algas estudadas são igualmente adequadas como alimento para os herbívoros filtradores. Ainda nesse estudo, os autores demonstraram que as curvas de crescimento dos organismos alimentados com cada uma das espécies de algas foram similares. O adubo químico N:P:K mostrou-se ser um meio alternativo adequado para o cultivo de cianofíceas, podendo eficientemente substituir outros meios mais onerosos.

### Bibliografia citada

- Brooks, J.L.; Dodson, S.I. 1965. Predation, body size, and composition of plankton. *Science*, 150:28-35.
- Bottrel, H.H.; Duncan, A.; Gliwicz, Z.M.; Grygierek, E.; Herzig A.; Hillbricht, I.; Kurasawa, H.; Larsson, P.; Weglenska, T. 1976. A review of some problems in zooplankton production studies. *Norw. J. Zool.*, 24:419-456.
- Díaz-Castro, J.G.; Hardy, E.R. 1998. Life history of *Moina micrura* (Kurz) fed with three algae species, in the laboratory. *Amazoniana*, 15(1/2):25-34.
- Gliwicz, Z.M.; Siadler, E. 1980. Food size limitation and algae interfering with food collection in *Daphnia*. *Arch. Hydrobiol.*, 88:155-177
- Goulden, C.E.; Henry, L.L.; Tessier, E.J. 1982. Body size, energy reserves, and competitive ability in three species of Cladocera. *Ecology*, 63:1780-1789.
- Goulden, R. 1972. Grazing by the ciliated protozoon *Loxodes magnus* on the alga *Scenedesmus* in a eutrophic pond. *Oikos*, 23:109-115.
- Hardy, E.R. 1989. *Effect of temperature, food concentration and turbidity on the life cycle characteristics of planktonic cladocerans in a tropical lake, Central Amazon: Field and experimental work*. Ph.D. Thesis, University of London, London. 337p.
- Infante, A., Litt, A.H. 1985. Differences between two species of *Daphnia* in the use of 10 species of algae in Lake Washington. *Limn. Oceanogr.*, 30(5):1053-1059.
- Jayatunga, Y.N. 1986. *The influence of food and temperature on the life cycle characteristics of planktonic cladoceran species from Kalawewa Reservoir, Sri Lanka*. Ph.D. Thesis, University of London, London. 410p.
- Kerfoot, W.C.; DeMott, W.R.; DeAngelis, D.L. 1985. Interactions among cladocerans: food limitation and exploitative competition. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.*, 21:431-451.
- Lampert, W. 1982. Further studies on the inhibitory effect of the toxic blue-green *Microcystis aeruginosa* on the filtering rate of zooplankton. *Arch. Hydrobiol.*, 95(1/4):207-220.
- Lampert, W. 1987. Feeding and nutrition in *Daphnia*. In: Peters, R.H.; Bernardi, R. (Eds.) "Daphnia". *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.*, 45:143-192.
- Lefevre, M. 1942. L'utilisation des algues

- d'eau douce les Cladoceres. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 76:250.
- Lewekowicz, M. 1971. Biomass of zooplankton and production of some species of rotatoria and *Daphnia longispina* in carp ponds. *Pol. Arch. Hydrobiol.*, 18(2):215-223.
- Limpadanai, D. 1971. *Feeding and foods of zooplankton*. Inland Fisheries Division, Department of Fisheries, Bangkok. 12p.
- Margalef, R. 1974. Phytoplankton counting. In: Vollenweider, R (Ed.). *A manual on Methods for measuring primary production in aquatic environments*. IBP Handbook Nº 12, Blackwell Scientific Publications, London. 225p.
- Matsumura-Tundisi, T; Sipaúba-Tavares, L.H. 1986. Phytoplankton composition of Broa reservoir and its utilization by *Argyrodiaptomus furcatus* (Copepoda-Calanoida). In: Bicudo, C.E; Teixeira, C; Tundisi, J.G. (Eds.) *Algas: a Energia do Amanhã*. Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, São Paulo. pp.183-188.
- Nalewajko, C. 1966. Dry weight, ash, and volume data for some freshwater planktonic algae. *J. Fish Res. BD. Canada*, 23(8):1285-1288.
- Oliveira, L.A.; Soares, B.J.; Greco, J.B.; Galizzi, J.; Caçado, J.R. 1985. *Métodos de laboratório aplicados à clínica*. Técnica e interpretação. 6ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 699p.
- Parsons, T.R.; Maita, Y.; Lalli, C.M. 1989. *A manual of chemical and biological methods for sea water analysis*. 3ª ed. Pergamon Press, London, 173p.
- Rocha, O. 1983. *The influence of food-temperature combinations on the duration of development, body size, growth and fecundity of Daphnia species*. Ph.D. Thesis, Univ. of London, London. 337p.
- Rocha, O.; Matsumura-Tundisi, T. 1990. Growth rate, longevity and reproductive performance of *Daphnia laevis* Birge, *Daphnia gessneri* Herbst and *Daphnia ambigua* Scourfield in Laboratory cultures. *Rev. Brasil. Biol.*, 50(4):613-632.
- Round, F.E. 1973. *Biologia das algas*. 2ª ed. Guanabara Dois, Rio de Janeiro. 263p.
- Tavares, L.H.S; Rocha, O. 1983. Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes:-Algas clorofíceas. *Biotemas*, 6(1):93-106
- Tavares, L.H.S; Matsumura-Tundisi, T. 1984. Feeding in adult females of *Argyrodiaptomus furcatus* (Sars, 1901) Copepoda, Calanoida of Lobo Reservoir (Broa), São Carlos, São Paulo, Brazil. In: Dumont, H.J; Tundisi, J.G. (Eds.). *Developments in Hydrobiology*. *Hydrobiology*, 113:15-24.
- Tavares, L.H.S. 1988. *Utilização do plâncton na alimentação de larvas e alevinos de peixes*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo. 191p.
- Tavares, L.H.S. 1995. *Limnologia aplicada à aquicultura*. Boletim Técnico nº1, UNESP, Jaboticabal. 70p.
- Vollenweider, R.A. 1974. Photosynthetic pigments. In: Vollenweider, R. (Ed.). *A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments*. IBP Handbook, No 12, Blackwell Scientific Publications, London. 225p.