



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
CURSO DE ENGENHARIA DE PESCA**

ANA LUZIA ASSUNÇÃO CLÁUDIO DE ARAÚJO

**ISOLAMENTO, DOMESTICAÇÃO E CULTIVO DE MICROALGAS DE AMBIENTES
LACUSTRES IMPACTADOS DE FORTALEZA-CE E REGIÃO METROPOLITANA,
PARA USO EM AQUICULTURA.**

FORTALEZA

2014

ANA LUZIA ASSUNÇÃO CLÁUDIO DE ARAÚJO

ISOLAMENTO, DOMESTICAÇÃO E CULTIVO DE MICROALGAS DE AMBIENTES
LACUSTRES IMPACTADOS DE FORTALEZA-CE E REGIÃO METROPOLITANA,
PARA USO EM AQUICULTURA.

Monografia apresentada ao Curso Engenharia de Pesca, do Departamento de Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de graduado em Engenharia de Pesca.

Orientador: Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo
Farias

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A687i Araújo, Ana Luzia Assunção Cláudio de.

Isolamento, domesticação e cultivo de microalgas de ambientes lacustres impactados de Fortaleza-CE e região metropolitana, para uso em aquicultura / Ana Luzia Assunção Cláudio de Araújo. – 2014.

39 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2014.

Orientação: Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias.

1. Microalgas. 2. Isolamento. 3. Domesticação. 4. Cultivo. I. Título.

CDD 639.2

ANA LUZIA ASSUNÇÃO CLÁUDIO DE ARAÚJO

ISOLAMENTO, DOMESTICAÇÃO E CULTIVO DE MICROALGAS DE AMBIENTES
LACUSTRES IMPACTADOS DE FORTALEZA-CE E REGIÃO METROPOLITANA,
PARA USO EM AQUICULTURA.

Monografia apresentada ao
Curso Engenharia de Pesca, do
Departamento de Engenharia de Pesca, da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para obtenção do título de
graduado em Engenharia de Pesca.

Aprovada em: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Wladimir Ronald Lobo Farias (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Me. MÁRIO UBIRAJARA GONÇALVES BARROS
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Me. Rafael Lustosa Maciel
Instituto Centro de Ensino Tecnológico - CENTEC

A Deus.

Aos meus pais, Eliza e Miguel.

A Pedro meu companheiro para vida toda.

Ao senhor Bemvindo um segundo pai.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiro a Deus pela fé que me renova.

Aos meus pais pelas noites de sono que perderam com suas preocupações, pela dedicação, paciência, amor, carinho e demonstração de companheirismo. Sem vocês por perto nada seria possível.

Obrigado a minha mãe Eliza por suas demonstrações de força, amor e apoio.

Ao meu pai Miguel por sua serenidade, força e firmeza quando preciso.

Á minha avó Macila por sua presença, amor e garra.

Á minha avó dona Fransquinha (*In memorian*) que deixou muito amor, carinho e saudades.

Aos meus tios, tias e primas que sempre desejam a minha vitória.

Aos meus tios Elias e Célia, as minhas primas Cintia, Kelly e Bruna pelas alegrias e amizades.

Ao meu namorado/marido Pedro Henrique pela amizade, companheirismo e amor. Por ter apresentado a mim o mundo microscópico que existe em uma gota d'água. Por sua paciência (nem sempre), quando tinha e tenho dificuldade em aprender algo. Grande parte deste trabalho devo a você.

Ao senhor Bemvindo por contribuir com todo seu conhecimento, carinho e dedicação, obrigada.

Obrigado ao Prof. Dr. Wladimir pela a oportunidade, o incentivo a novas ideias e acolhimento no Laboratório de Planctologia.

A toda equipe da Planctologia muito obrigada.

Aos meus amigos Paloma, Mário e Rafael pelo apoio e amizade.

A todos do Dep. De Engenharia de Pesca que foram importantes em minha formação.

A todos esse trabalho tem um pouco de cada um que contribuíram em minha vida, sem vocês nada seria possível.

Obrigada.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém quer viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”. (Arthur Schopenhauer)

RESUMO

As microalgas têm sido alvo de vários estudos por possuir uma grande versatilidade de utilização, seja na indústria para produção de biodiesel, fármacos, na área ambiental como bioindicador, bem como para alimentação humana e animal. O presente estudo trata do isolamento, domesticação e cultivo de microalgas oriundas das lagoas de Maraponga, Messejana, Mondubim, Parangaba e Opaia no município de Fortaleza e lagoa do Tabapuá região Metropolitana. As amostras foram coletadas em 21 de Maio de 2013. O experimento foi realizado no Laboratório de Planctologia localizado no Centro de Biotecnologia Aplicada à Aquicultura (CEBIAQUA), Departamento de Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará (UFC). Com a realização do trabalho, foi realizado o isolamento e identificação de sete táxons pertencentes às classes Chlorophyceae, Trebouxiophyceae, Cyanophyceae e Bacillariophyceae, sendo quatro identificados até o nível de espécie e três em nível de gênero. Os cultivos estacionários ou “baths” foram realizados utilizando meio Guillard f/2 na temperatura de 24 ± 2 °C, com iluminação e aeração contínua, sendo o crescimento populacional das culturas acompanhados por meio de espectrofotometria, através da densidade ótica do meio (DO 680 e 700 nm). O rendimento de biomassa (g/L) de cada cultura foi determinado na fase de exponencial, sendo o obtido por análises de sólidos suspensos totais. Com relação ao rendimento de biomassa, variou de 0,35 a 0,327 g.L⁻¹. O isolamento em meio Guillard f/2 demonstrou eficácia para obtenção das cepas isoladas. Sendo possível a produção de biomassa das microalgas isoladas.

PALAVRAS CHAVE: Microalgas. Isolamento. Domesticação. Cultivo.

ABSTRACT

Microalgae have been the subject of several studies by having a great versatility of use, whether in industry to produce biodiesel, pharmaceuticals, environmental as bio-indicator as well as for food and feed. This study deals with the isolation, domestication and cultivation of microalgae derived from the lagoons of Maraponga, Messejana, Mondubim, Parangaba and Opaia in Fortaleza and Tabapuã one lagoon in Metropolitan region. The samples were collected on May 21, 2013. The experiment was conducted in Planctologia Laboratory located in Applied Biotechnology Center for Aquaculture (CEBIAQUA), Department of Fisheries Engineering, Federal University of Ceará (UFC). With the completion of the work, was performed isolation and identification of seven taxons belonging to classes Chlorophyceae, Trebouxiophyceae, Cyanophyceae e Bacillariophyceae, being four identified to species level and three at genus. The stationary cultures or "baths" were performed using medium Guillard f / 2 at temperature of 24 ± 2 ° C, with lighting and aeration continues, with population growth of cultures accompanied by spectrophotometry by optical density of the medium (OD 680 and 700 nm). The biomass yield (g / L) of each culture was determined in the exponential phase being obtained by total suspended solids analysis. With regard to biomass yield, ranged from 0.35 to 0.327 g L⁻¹. Isolation in Guillard f / 2 demonstrated efficacy to obtain the isolated strains. Producing microalgal biomass isolated were possible.

Key words: Microalgae, Isolation, Domestication, Cultivation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - a) Cultivo de <i>Desmodesmus sp.</i> b) <i>Desmodesmus sp.</i>	26
Figura 2 - Curva de crescimento <i>Desmodesmus sp.</i>	26
Figura 3 - a) Cultivo de <i>Scenedemus acutus.</i> b) <i>S. acutus.</i>	27
Figura 4 - Curva de crescimento de <i>S. acutus.</i>	27
Figura 5 - a) Cultivo de <i>Chlorella sp.</i> b) <i>Chlorella sp.</i>	28
Figura 6 - Curva de crescimento <i>Chlorella sp.</i>	28
Figura 7 - a) Cultivo de <i>Micractinium pusillum.</i> b) <i>M. pusillum.</i>	29
Figura 8 - Curva de crescimento <i>M. pusillum.</i>	29
Figura 9 - a) Cultivo de <i>Dictyosphaerium pulchellum.</i> b) <i>D. pulchellum.</i>	30
Figura 10 - Curva de crescimento de <i>D. pulchellum.</i>	30
Figura 11 - a) Cultivo de <i>Geitlerinema amphibium.</i> b) <i>G. amphibium.</i>	31
Figura 12 - Curva de crescimento de <i>G. amphibium.</i>	31
Figura 13 - a) Cultivo de <i>Nitzschia sp.</i> b) <i>Nitzschia sp.</i>	32
Figura 14 - Curva de crescimento de <i>Nitzschia sp.</i>	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do meio de cultivo Guillard f/2. Composição do meio de cultivo Guillard f/2.....	21
Tabela 2 - Microalgas isoladas de lagoas de Fortaleza e região metropolitana.....	24
Tabela 3 - Equações de regressão linear entre a densidade ótica (DO) e a contagem de nas culturas de microalgas.....	25
Tabela 4 - Parâmetros de densidade celular, taxa de crescimento e rendimento de biomassa.....	33

Sumário

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1	Os principais grupos fitoplanctônicos.....	15
2.2.1	<i>Cyanobacteria</i>.....	15
2.2.2	<i>Chlorophyta</i>.....	16
2.2.3	<i>Bacillariophyta</i>.....	16
2.2	Isolamentos de microalgas do meio aquático.....	16
2.3	Técnicas de isolamento.....	17
2.3.1	<i>Isolamento por pipetagem e diluições sucessivas.</i>	18
2.3.2	<i>Isolamento em meio sólido</i>.....	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1	Amostragem	20
3.2	Isolamento dos táxons.....	20
3.3	Construção das curvas de crescimento das espécies isoladas	22
3.4	Determinação rendimento de biomassa por sólidos suspensos totais. ..	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1	Curva de crescimento das <i>Chlorophyceae</i>.....	25
4.2	Curva das <i>Trebouxiophyceae</i>.	28
4.3	Curva de crescimento da <i>Cyanophyceae</i>.	31
4.4	Curva de crescimento da <i>Bacillariophyceae</i>.	32
5	CONCLUSÃO	34
	REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

O nosso planeta é constituído de grandes extensões de água (marinhas e doce) conhecida em relação a sua composição químicas sendo desconhecidas principalmente em relação aos organismos microscópicos que constituem o nanoplâncton e picoplâncton. Apesar de ser um recurso essencial ao uso humano e ser renovável, necessita cada vez mais de um manejo criterioso para minimizar o avanço da degradação antropogênica, que se torna cada vez mais forte, contribuindo para a escassez (VITOUSEK et al., 1997).

Assim, a maior parte dos recursos aquáticos continentais se encontra em estado de poluição, ocasionada, especialmente pela ocupação populacional sem planejamento, que se instala ao entorno dos reservatórios, lagos e lagoas, poluindo as águas superficiais e/ou subterrâneas com esgotos sanitários clandestinos, efluentes domésticos e industriais, atividade agrícolas e escoamento superficial urbano e rural (CESTEB, 2002).

A preocupação com a preservação dos ambientes aquáticos continentais vem tomando destaque devido as frequentes secas que causam uma redução drástica dos volumes de água acumulados nos reservatórios de abastecimento, o que compromete cada vez mais a qualidade destas águas pela concentração de componentes químicos a partir das elevadas taxas de evaporação, aliada ao aporte continuado de poluentes. Tal se configura, principalmente, nas áreas urbanas, tornando estes ambientes impróprios, até mesmo, as atividades de recreação de contato primário e pesca de subsistência (JUNIOR, 2007).

O lançamento de águas residuárias domésticas, de atividades comerciais e mesmo de pequenas indústrias; bem como a disposição irregular de lixo nas áreas de influência direta têm provocado o avanço da eutrofização pelo excesso de nutrientes que chegam aos ecossistemas hídricos urbanos. Este cenário é facilmente perceptível nos ambientes lacustres de Fortaleza-CE e região metropolitana, provocando o crescimento exagerado de microalgas e macrófitas aquáticas, que aumentam em quantidade, porém em reduzida diversidade, dependentes de suas capacidades de adaptação (GOMES, 2000)

Considerando que as microalgas têm importante papel na ciclagem dos nutrientes como nitrogênio e fósforo, nos ambientes eutrofizados as elevadas

concentrações destes nutrientes propiciam o crescimento exagerado destes organismos, gerando as florações ou “bloom” que se constituem um indicativo de desequilíbrio ambiental. Assim, várias espécies de cianobactérias, clorofíceas, euglenofíceas, diatomáceas e dinoflagelados podem apresentar toxicidade, afetando assim a fauna local e, conseqüentemente, o ser humano, a macro e microbiota presentes (WEHR, 2002).

Além da importância ambiental das microalgas, elas possuem um grande potencial para a produção de biomassa, pois não necessitam de grandes áreas de cultivo, podendo ser cultivadas em áreas não produtivas para agricultura, bem como precisam de pouca quantidade de água que não precisa ser potável (SINGH; GU 2010).

Um dos principais entraves para a produção de microalgas de forma intensiva é a falta de cepas nativas isoladas, já adaptadas ao clima local e que podem se reproduzir em taxa de crescimento ideais. Porém, é necessário conhecer suas características, como seus teores de lipídios e proteínas, além de compreender seu comportamento em meios artificiais e suas adaptações (MENDES *et al.*, 2012).

Portanto, a proposta do presente trabalho foi isolar, domesticar e cultivar microalgas encontradas em algumas lagoas de Fortaleza-CE e em uma lagoa da região metropolitana do município com vistas a usos posteriores na aquicultura. Tais cepas serão mantidas em banco apropriado para estudos posteriores de seus demais potenciais como, produção de reservas lipídicas, de proteínas, carboidratos, pigmentos acessórios e comportamento de crescimento em outros meios artificiais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O fitoplâncton ou comunidade fitoplanctônica (microalgas) é uma das comunidades constituintes do plâncton, que ainda agrega em sua composição outras comunidades como zooplâncton (microcrustáceos, cladóceros, rotíferos dentre outros), ictioplâncton (ovos e larvas de peixes), micoplâncton (fungos planctônicos), protoplâncton (protistas heterotróficos), bacterioplâncton (bactérias planctônicas) e virioplâncton (vírus localizados na coluna d'água) (LOURENÇO, 2006).

Anteriormente, para um organismo ser considerado como microalga pelos ficologistas este deveria apresentar clorofila "a" e não possuir diferenciação do talo em raiz, caule ou folhas. Na atualidade, a ficologia aplicada considera como microalga todas as algas microscópicas e as bactérias fotossintéticas aeróbias, que é o caso das cianobactérias (TOMASELLI, 2004).

Segundo Lourenço (2006), 90% da produção primária global ocorre no mar e é realizada por microalgas constituintes do fitoplâncton. Alterações físicas, químicas ou biológicas no ambiente aquático influenciam diretamente na composição destes organismos, podendo ser utilizados como bioindicadores da qualidade d'água, no tratamento de águas residuais, em processos industriais, remoção de metais pesados, assimilando nutrientes e substâncias tóxicas (DENER *et al.*, 2006)

O fitoplâncton é composto por diversos grupos de organismos, como as euglenas (Euglenozoa), diatomáceas (Bacillariophyta), clorofíceas (Chlorophyta) e as cianobactérias (Cyanobacteria) (BALDAUF, 2003). O excesso de cianobactérias no meio aquático pode causar sérios danos ecológicos e à saúde pública como o que aconteceu em Caruaru-PE, onde ocorreu a morte de várias pessoas em uma clínica de hemodiálise, causada pela toxina da cianobactéria *Microcystis aeruginosa*, presente na água utilizada pela clínica (JOCHIMSEN; CARMICHAEL *et al.*, 1998).

Além de sua importância ecológica como bioindicador no ecossistema aquático, o fitoplâncton é uma rica fonte de biomoléculas (proteínas, carboidratos e lipídeos) e sua utilização pode variar de acordo com a finalidade, podendo ser usado para a alimentação de organismos aquáticos cultivados, como suplemento alimentar na dieta de humanos, bem como no tratamento de esgoto doméstico e outros efluentes orgânicos (SIPAÚBA-TAVARES *et al.*, 2003).

A grande diversidade na composição bioquímica das microalgas tem chamado a atenção dos pesquisadores. As espécies ricas em lipídeos podem ser utilizadas para a produção de biocombustíveis com a vantagem de utilizar espaços menores do que as plantações de oleaginosas, sendo possível seu cultivo em áreas improdutivas para a agricultura (SINGH; GU, 2010). As espécies escolhidas para a alimentação apresentam como característica a fácil absorção, o alto valor nutricional, sua pequena dimensão e a ausência de parede celular rígida (WATANABE; KIRON, 1994).

A cianobactéria *Spirulina sp* é amplamente utilizada como complemento alimentar, sendo seu uso regulamentado na Europa, Japão e Estados Unidos pela FDA (Food and Drug Administration). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) é responsável pela legalização da comercialização de *Spirulina sp*. como fonte alimentar, quando o produto se encontra devidamente registrado (Brasil, 2008). Por apresentar altas taxas de proteína, ser rica em beta-caroteno e possuir elevados níveis de vitaminas e ácidos graxos, este microrganismo é largamente utilizada na alimentação humana e animal (BELAY et al., 1993).

As microalgas possuem um grande potencial para a produção de biocombustíveis, principalmente o biodiesel, devido à sua capacidade para substituir os combustíveis de origem fóssil. Além do biodiesel, podem ser produzidos, a partir das microalgas, etanol, hidrogênio, metano e outros hidrocarbonetos combustíveis (ANTUNES e SILVA, 2010).

As microalgas também são utilizadas como biossensores para o monitoramento da qualidade da água de reservatórios, sendo necessária sua correta identificação e quantificação (SÁNCHEZ-VÉLEZ; GARCÍA-NÚÑEZ, 1999).

2.1 Os principais grupos fitoplanctônicos

2.2.1 Cyanobacteria

Conhecidas antigamente como cianofíceas ou algas verde-azuladas, estes microrganismos pertencem ao grupo das eubactérias, sendo as únicas bactérias capazes de produzir oxigênio como produto da fotossíntese. Sua cor geralmente azulada é proveniente das ficobilinas, pigmentos acessórios azuis que mascaram a cor verde proveniente da clorofila “a” (FRANCESCHINI, 2010).

As cianobactérias possuem uma organização celular procariótica, ausência total de flagelos e da maioria das organelas como mitocôndrias, plastos, núcleo e retículo endoplasmático. Porém possuem ribossomos do tipo 70S, que são típicos de bactérias, sendo encontrados em tamanho reduzido (LOURENÇO, 2006). Conforme este mesmo autor, a maioria das cianobactérias produz uma variedade de toxinas nocivas classificadas em hepatotoxinas, neurotoxinas, dentre outras.

2.2.2 Chlorophyta

Conhecidas como algas verdes, têm como característica a presença de clorofilas “a” e “b”, xantofilas, carotenóides, astaxantina, pirenóides e o amido como produto de reserva que é o mesmo encontrado nas plantas superiores. São amplamente utilizadas na alimentação humana e animal (FRANCESCHINI, 2010). (Seria importante citar aqui algumas espécies utilizadas para este fim!!!)

2.2.3 Bacillariophyta

A principal característica destas algas, denominadas diatomáceas é a presença de uma frústula silicosa rica em detalhes de forma e ornamentação, sendo importante para os estudos de classificação e identificação das espécies. As diatomáceas estão divididas em cêntricas que apresentam a frústula com simetria radial e em penadas, nas quais a frústula apresenta simetria bilateral (LOURENÇO, 2006). Este autor afirma que as diatomáceas apresentam como pigmentos fotossintéticos as clorofilas “a” e “c”, além de carotenóides como β -caroteno, fucoxantina, diatoxantina e diadinoxantina.

2.2 Isolamentos de microalgas do meio aquático

O isolamento consiste na separação de uma espécie de microalga do meio natural, observando-se as condições físicas e químicas do meio no ambiente de coleta, para que estas sejam simuladas durante o cultivo artificial no ambiente de laboratório (LOURENÇO, 2006).

Segundo Cohen (1986) e Richamond (2000), o isolamento é uma importante etapa na produção de biomassa algal de uma única espécie. Dentre os

diversos fatores considerados para o sucesso deste propósito, destacam-se: conhecer a taxa e curva de crescimento da microalga, para que a biomassa apresente uniformidade na composição bioquímica, certificar-se da possibilidade de manipular as condições de luz, temperatura, nutrientes e outros, induzindo a produção de compostos, com maior valor agregado, tais como lipídios, proteínas, carboidratos, dentre outros, os quais apresentam elevado valor comercial para a indústria.

Ogunseitan (2005) destaca que uma microalga é considerada isolada quando em sua cultura não existe a presença de microrganismos contaminantes, mas unicamente a espécie de interesse, embora não tenha sido obtido de uma única célula, razão porque são consideradas culturas axênicas. Com isso é possível conhecer as características fisiológicas e genéticas de uma determinada espécie sem a interferência de outros microrganismos. Ao passar por esse processo de isolamento algumas microalgas podem apresentar alterações morfológicas (coloração, textura e formato) e fisiológicas, as quais podem ser causadas pela mudança do ambiente natural para o artificial ou pela falta de interação com outros microrganismos, tais como outras algas, bactérias ou fungos (LOURENÇO, 2006).

Observa-se, entretanto, que culturas sem organismos contaminantes como as bactérias e fungos são de difícil obtenção, sendo estas culturas conhecidas como xênicas ou não-axênicas. A presença de outros microrganismos em baixas densidades não se caracteriza como um problema, enquanto esses contaminantes não comprometam o crescimento da cultura de microalgas. Lourenço (2006) destaca que algumas espécies são incapazes de crescer sem a interação com bactérias do meio, pois muitas produzem vitaminas que, auxiliam crescimento das microalgas.

2.3 Técnicas de isolamento

Para o isolamento e manutenção das cepas, deve ser levado em consideração qual o tipo de organismo que se deseja isolar e qual o meio mais adequado para o seu desenvolvimento. O meio natural estéril (meio indefinido) também pode ser utilizado para o cultivo de uma espécie, pois este já possui os nutrientes necessários para sua adaptação e desenvolvimento. Porém a vantagem dos meios de cultura artificiais (meio definido e semidefinido) é o conhecimento e o controle dos nutrientes presentes (LOURENÇO, 2006).

Cada espécie de microalga possui um nutriente limitante e conhecer suas necessidades nutricionais é essencial para seu isolamento, como no caso das diatomáceas que requerem sílica e das as euglenófitas que geralmente exigem amônia (ANDERSEN; KAWACHI, 2005)

A utilização de técnicas e meios de cultura de baixo custo é preferencial para o isolamento de microalgas, para que seja economicamente viável sua produção em grande escala. A escolha de microalgas nativas é considerada uma grande vantagem, não sendo necessário resfriar ou aquecer o ambiente de cultivo, pois os microrganismos estão adaptados as condições locais (STANBURY, WHITAKER; HALL, 1995).

Na tentativa de se obter um cultivo unialgal são utilizadas diversas técnicas, tais como o isolamento em meio sólido (ágar), por diluições em série, por fototaxia e gravimetria, além de outras técnicas pouco empregadas devido ao alto custo dos equipamentos utilizados exemplo o citômetro de fluxo (LOURENÇO, 2006).

2.3.1 Isolamento por pipetagem e diluições sucessivas.

Segundo Lourenço (2006), o isolamento por pipetagem e diluições sucessivas é amplamente utilizado para células que apresentam tamanhos superiores a 10 μm , sendo as colônias e filamentos considerados como células unitárias. Para isso, um pequeno volume da amostra que possui a espécie alvo e outras espécies é transferido para um poço de uma placa de Kline ou lâmina escavada contendo meio de cultura estéril. Em seguida, uma alíquota é recolhida, cuidadosamente, e transferida para um novo poço com meio de cultura, sendo esse procedimento repetido, sucessivamente, até obter a espécie alvo isolada. Finalmente, as células devem ser transferidas para uma pequena fração de meio de cultura e incubada em condições ótimas de crescimento que pode durar desde alguns dias até várias semanas. Após este período deve-se confirmar se o isolamento foi bem sucedido examinando, cuidadosamente, a cultura ao microscópio.

2.3.2 Isolamento em meio sólido

A técnica de isolamento de microalgas em meio sólido é amplamente utilizada em laboratórios para o cultivo do nanoplâncton e picoplâncton, pois as

microalgas pertencentes a estes grupos possuem pequenas dimensões, tornando mais difícil seu isolamento em meio líquido. Os meios sólidos também são utilizados para a purificação de culturas contaminadas com flagelados, onde seus movimentos são dificultados no meio inerte. Considerando que o ágar (extrato de algas marinhas) funciona apenas como solidificante dos meios, a preparação destes meios exige, além do ágar, os componentes desejáveis e necessários para completar sua composição, conforme os propósitos da aplicação (LOURENÇO, 2006).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Centro de Biotecnologia Aplicada a Aquicultura (CEBIAQUA), no laboratório de Plânctologia, localizado no Campus do Pici na Universidade Federal do Ceará, sendo as coletas realizadas no dia 21 de Maio de 2013.

Divididas em três etapas: coleta de amostras, isolamento dos táxons e cultivo dos táxons isolados.

3.1 Amostragem

Constou da preparação do material utilizado em campo, incluindo lavagem, secagem montagem e esterilização por autoclavagem de frascos de Erlenmeyer de 500 mL e daqueles direcionados ao processamento das amostras: frascos diversos, copos com malha de 20 μm , pipetas graduadas, tubos de ensaio para cultivo, meio de cultura, placas de Petri. Todo material a ser utilizado e os meios de cultivo foram esterilizados durante 15 minutos a 120 °C, tempo suficiente para que os microrganismos contaminantes que se encontram na água, nas vidrarias e outros materiais fossem inativados.

Em cada lagoa, foram coletados aproximadamente 250 mL de amostra, a quais foram preservadas em caixas isotérmicas com gelo até a chegada ao laboratório.

3.2 Isolamento dos táxons

As soluções estoques de cada componente do meio de cultura GUILLARD f/2 (GUILLARD, 1975) (TABELA 1). Para a elaboração de 1L do meio final utilizou-se 1 mL da solução estoque de cada componente dos macronutrientes (fosfato de sódio, silicato de sódio, nitrato de sódio), 1mL da solução estoque de metais-traço (micronutrientes), além de 0,5 mL da solução de vitaminas, composta por 100 mg de vitamina B1 (cloridrato de tiamina), 100 mg de vitamina B6 (cloridrato de piridoxina), 5000 mcg de vitamina B12 (cianocobalamina) e excipiente (dietanolamina), completando-se o volume para 1000 mL.

Tabela 1 – Composição do meio de cultivo Guillard f/2.

Soluções	Reagente	Proporção de cada componente na solução-estoque (mg.mL ⁻¹)	Proporção de solução-estoque no Meio de cultura
1	Nitrato de Sódio	75,0	1 mL
2	Fosfato de Sódio	5,0	1 mL
3	Silicato de Sódio	12,0	1 mL
4 (Metais traços)	Sulfato Cúprico	9,8	1 mL
	Sulfato de Zinco	22,0	
	Cloreto de Magnésio	10,0	
	Molibdato de Sódio	6,3	
	Cloreto de Ferro	3,0	
	Na ₂ EDTA 2H ₂ O	4,6	
5	Vitaminas	-	0,5 mL

Fonte: Guillard, (1975).

Inicialmente as amostras foram filtradas em malha de 60µm para a remoção de partículas de sujeiras e separação do zooplâncton, evitando assim a herbívora. A seguir, foram separadas duas alíquotas: uma para diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-5}) em tubos de ensaios contendo meio líquido (Guillard f/2) e outra para inoculação por estrias em placa de Petri contendo o mesmo meio acrescido de agente solidificante. Após a inoculação as amostras foram incubadas no ambiente do cepário e mantidas sob condições ambientais controladas; temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ com intensidade luminosa de 4000 lux sem fotoperíodo. A partir deste ponto, novos repiques eram realizados a cada 15 a 20 dias ou quando era perceptível o crescimento algal na diluição de 10^{-5} . Antes dos repiques eram realizadas observações em microscópio óptico com contraste de fase da marca OLYMPUS modelo BX41 equipado com câmera fotográfica HDCE-50B, para acompanhamento do isolamento. No caso de detecção de contaminação por protozoários a amostra era novamente repicada para meio sólido. Quando não era obtido o isolamento após sucessivas repicagens (permanência de duas espécies), utilizava-se a técnica de pescaria priorizando-se o isolamento da que apresentava a maior densidade algal.

Uma vez isolados, os espécimes eram identificados com o auxílio de chaves dicotômicas de identificação e bibliografia especializada (ROUND, 1990, ANAGNOSTIDIS e KOMÁREK, 1988, BOURRELLY, 1981 BICUDO; MENEZES, 2005).

3.3 Construção das curvas de crescimento das espécies isoladas

Os cultivos foram realizados em quadruplicatas, utilizando frascos erlenmeyers de 1000 mL, inoculando-se 100 mL da pré-cultura (regra dos 10%) em 900 mL em 1000 mL de meio Guillard f/2 mantendo o cultivo estacionário (batch) com aeração contínua, não sendo mais adicionado meio de cultura aos frascos (LOURENÇO, 2006).

No decorrer do cultivo foram realizadas diariamente medidas das densidades ópticas (DO 680/700nm) de cada cultivo.

Valores de densidade ótica (DO_{680nm} e DO_{700nm}) e número de células foram obtidos, através de diluições de uma amostra concentrada, para traçar as curvas de crescimento. Procedeu-se posteriormente a regressão linear, obtendo-se a equação da reta. Foram computados também os dados de progresso dos cultivos como: concentrações celulares máxima (X_{max}) e taxas de crescimento (K), calculadas conforme Lourenço (2006) (EQUAÇÃO 1). Os cultivos foram interrompidos na fase de redução de crescimento onde foram coletadas amostras para determinação dos sólidos suspensos totais por gravimetria. Com base no teor de sólidos suspensos totais foram calculados os rendimentos de biomassa algal para cada cultivo.

$$K = \frac{\log_2 (N_t/N_0)}{\Delta t} \quad (1)$$

Onde:

K é a taxa de crescimento;

N₀ densidade óptica no início do cultivo

N_t densidades ópticas que o cultivo obteve a máxima concentração celular

Δt a duração do cultivo em dias.

3.4 Determinação rendimento de biomassa por sólidos suspensos totais.

A análise de sólidos suspensos totais foi realizada após a finalização dos cultivos, sendo utilizada para obter o rendimento de biomassa da cada cultura. O procedimento consistiu em filtrar um volume de amostra conhecido em membrana de vidro de 0,45 μm com auxílio de uma bomba a vácuo. Em seguida, as membranas com as amostras filtradas foram levadas a estufa na temperatura de 100° ± 5°C para completa secagem. De hora em hora, as membranas foram pesadas até o

estabelecimento de um peso constante. Os sólidos suspensos totais foram obtidos pela diferença do peso final das membranas com as amostras menos o peso inicial sem as amostras, sendo o resultado expresso em g.L⁻¹ de acordo com a (EQUAÇÃO 2).

$$SST = \frac{(P_1 - P_2) \times 1000}{\text{Vol. Filtrado}} = \text{g.L}^{-1} \quad (2)$$

Onde:

P1 peso inicial da membrana

P2 peso final membrana com amostra filtrada.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o isolamento das microalgas, as técnicas foram utilizadas concomitantemente, não sendo possível evidenciar a técnica mais eficiente.

Após a realização de várias repicagens foram isolados e identificados sete táxons, quatro em nível de espécie e três em nível de gênero, sendo as espécies *Scenedesmus acutus* e *Desmodesmus sp.* da classe Chlorophyceae, *Chlorella sp.*, *Dictyosphaerium pulchellum* e *Micractinium pusillum.* da classe Trebouxiophyceae, *Geitlerinema amphibium* da classe Cyanophyceae e *Nitzschia sp* da classe Bacillariophyceae. Cada microalga foi isolada de uma lagoa diferente (TABELA. 2).

Tabela 2 - Microalgas isoladas de lagoas de Fortaleza e região metropolitana.

Lagoas	Táxons	Classes
Mondubim	<i>Desmodesmus sp.</i>	Chlorophyceae
Parangaba	<i>Scenedesmus acutus.</i>	
Tabapuá	<i>Chlorella sp.</i>	
Messejana	<i>Micractinium pusillum.</i>	Trebouxiophyceae
Parangaba	<i>Dictyosphaerium pulchellum.</i>	
Maraponga	<i>Geitlerinema amphibium.</i>	Cyanophyceae
Opaia	<i>Nitzschia sp.</i>	Bacillariophyceae

Fonte: Autora (2014).

As microalgas isoladas estão mantidas no banco de cepas do laboratório de Plânctologia, no CEBIAQUA, localizado no Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará, para futuras pesquisas.

Foi obtida uma excelente correlação linear entre densidade óptica e a contagem de células (cel ml^{-1}) para cada espécie, sendo possível a determinação das equações de regressão linear, permitindo que o número de células pudesse ser estimado em função da DO da cultura (TABELA. 3).

Tabela 3 - Equações de regressão linear entre a densidade ótica (DO) e a contagem de nas culturas de microalgas.

Táxons	Comprimento de onda (nm)	Equação de regressão linear	R ²
<i>Desmodesmus sp.</i>	680	$y = 5E+06x - 593398$	R ² = 0,9422
<i>Scenedesmus acutus.</i>		$y = 3E+06x - 8119,3$	R ² = 0,9119
<i>Chlorella sp.</i>		$y = 6E+06x - 569420$	R ² = 0,9778
<i>Micractinium pusillum.</i>		$y = 3E+06x - 27865$	R ² = 0,9895
<i>Dictyosphaerium pulchellum.</i>		$y = 2E+06x + 142212$	R ² = 0,9711
<i>Geitlerinema amphibium.</i>		$y = 7E+07x - 5E+06$	R ² = 0,9582
<i>Nitzschia sp.</i>	700	$y = 301001x - 31917$	R ² = 0,9157

Fonte: Autora (2014).

As culturas não apresentaram a fase de indução de crescimento, mostrando que as algas isoladas já se encontravam bem adaptadas ao meio de cultivo, passando direto para a fase exponencial. A chegada da fase de redução do crescimento relativo variou de quatro a cinco dias entre as espécies.

4.1 Curva de crescimento das Chlorophyceae.

As curvas de crescimento das duas microalgas iniciaram-se na fase exponencial. Para *Desmodesmus sp.*, o cultivo foi encerado no quarto dia quando foi observada uma diminuição do crescimento antes de chegar na fase estacionária relativo do terceiro para o quarto dia, enquanto que o cultivo de *Scenedesmus acutus.* teve uma duração de cinco dias, sendo a redução do crescimento relativo observada do quarto para o quinto dia.

Após quatro dias de cultivo, *Desmodesmus sp.* (FIGURA 1.) apresentou densidade celular máxima de $2.39 \times 10^6 \pm 6.28 \times 10^4 \text{ cél.mL}^{-1}$ (Figura 2), correspondendo a um rendimento de biomassa de $0,35 \text{ g.L}^{-1}$. Gressler (2011) testou a eficiência do crescimento *Desmodesmus sp.* com efluente de estação de tratamento esgoto (ETE) em fotobiorreator sem aporte de dióxido de carbono. Ao fim do cultivo, o autor obteve uma densidade celular máxima média de $8.49 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$ no terceiro dia de cultivo e um rendimento de $0,185 \text{ g.L}^{-1}$, inferior ao obtido no presente trabalho apesar da menor densidade celular.

Figura 1 - a) Cultivo de *Desmodesmus sp.* b) *Desmodesmus sp.*

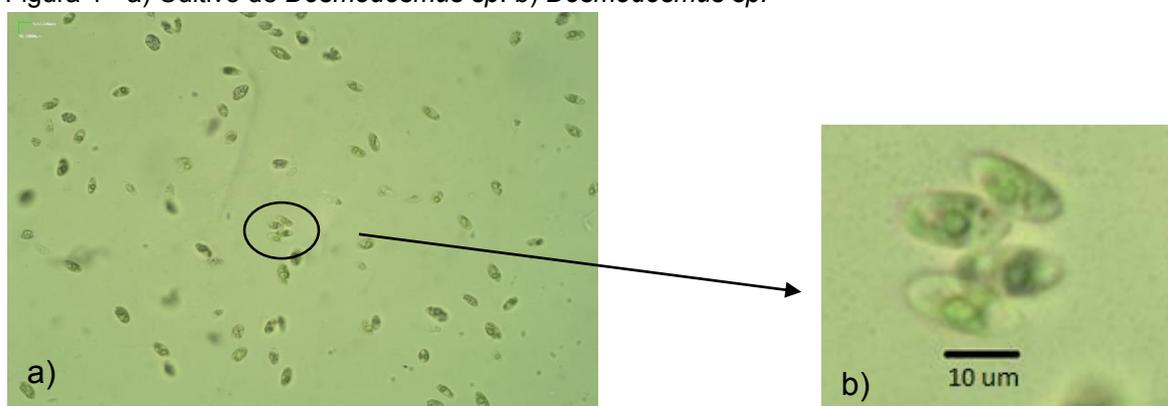
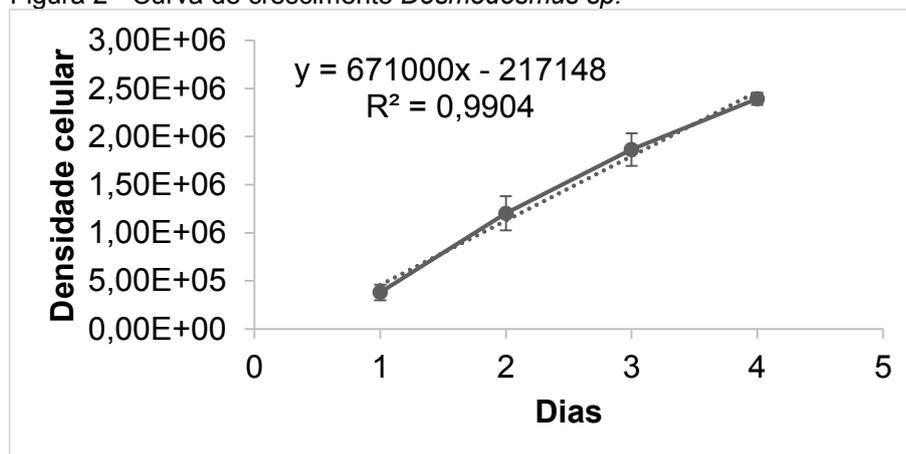


Figura 2 - Curva de crescimento *Desmodesmus sp.*



Fonte: Autora (2014).

O cultivo de *Scenedesmus acutus* (FIGURA 3.) foi finalizado no quinto dia após a observação da redução do crescimento relativo, com densidade celular de $1.18 \times 10^6 \pm 6.67 \times 10^4$ cél.mL⁻¹ (FIGURA 4.) e rendimento de 0,127 g.L⁻¹. Méndez (2010) avaliando o crescimento da *Scenedesmus sp.* em efluentes de esgoto na Argentina, obteve após de dez dias de cultivo, a densidade celular máxima de 5.9×10^5 cél.mL⁻¹ mostrando ser uma alternativa de baixo custo para o tratamento de águas residuais doméstica. A microalga *Scenedesmus sp.* vem se destacando em estudos que buscam alternativas para a biorremediação de efluentes (GURBUZ et al., 2009)

Figura 3 - a) Cultivo de *Scenedesmus acutus*. b) *S. acutus*.

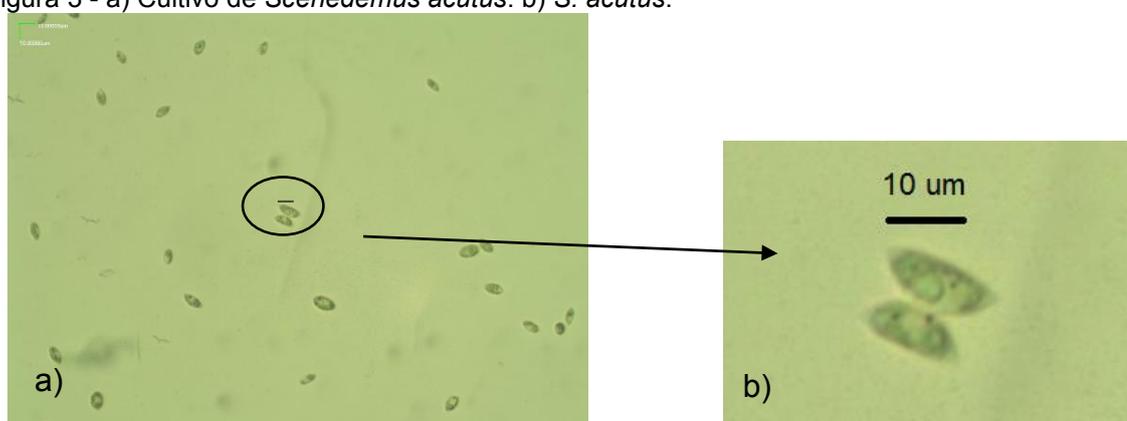
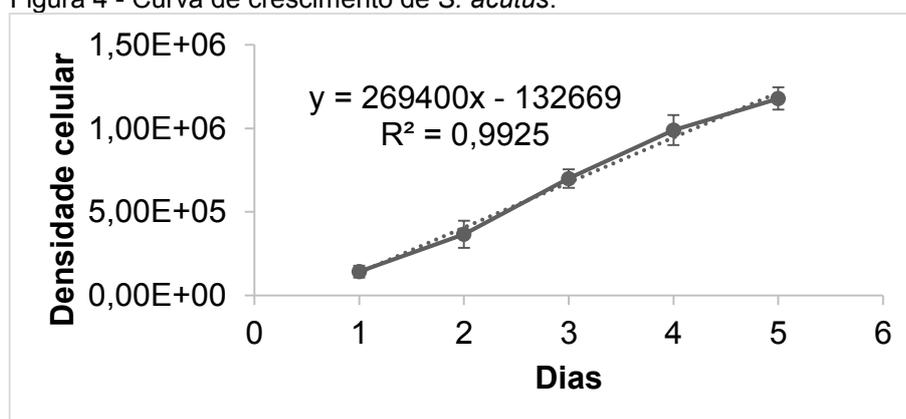


Figura 4 - Curva de crescimento de *S. acutus*.



Fonte: Autora (2014).

4.2 Curva das Trebouxiophyceae.

As culturas das microalgas isoladas pertencentes à classe Trebouxiophyceae apresentaram uma duração de cinco dias, sendo encerados quando foi percebida a redução do crescimento relativo do quarto para o quinto dia de cultivo. Dentre as espécies isoladas, a microalga *Chlorella sp.* (FIGURA 5.) se destaca pelo seu alto valor nutricional, sendo utilizada para suplementação alimentar humana e animal (RICHMOND, 2000).

A cultura de *Chlorella sp.* atingiu uma densidade celular máxima de $2.08 \times 10^6 \pm 5.91 \times 10^4 \text{ cél.mL}^{-1}$, após cinco dias de cultivo (FIGURA 6.) e um rendimento de $0,212 \text{ g.L}^{-1}$. Redaelli (2011) observando a influência da intensidade da luz sobre a biofixação de carbono em culturas de *C. minutissima* obteve um rendimento de $0,38 \text{ g/L}$. Portella (1997) produziu a microalga *Chlorella sp* para a alimentação de larvas de peixe e obteve uma densidade máxima de $5 \times 10^6 \text{ cél.mL}^{-1}$ entre o quarto e sexto dia de cultivo, utilizando o meio WC (GUILLARD; LORENZEN, 1972). Marinho (2009) avaliou o crescimento de *C. vulgaris* em diferentes valores de pH, utilizando o meio Conway e obteve uma densidade celular máxima de $1.0005 \times 10^4 \text{ cél.mL}^{-1}$. A densidade celular máxima observada para *Chlorella sp.* no presente trabalho foi menor em relação a obtida por Portella (1997) e superior à relatada por Marinho (2009).

Figura 5 - a) Cultivo de *Chlorella sp.* b) *Chlorella sp.*

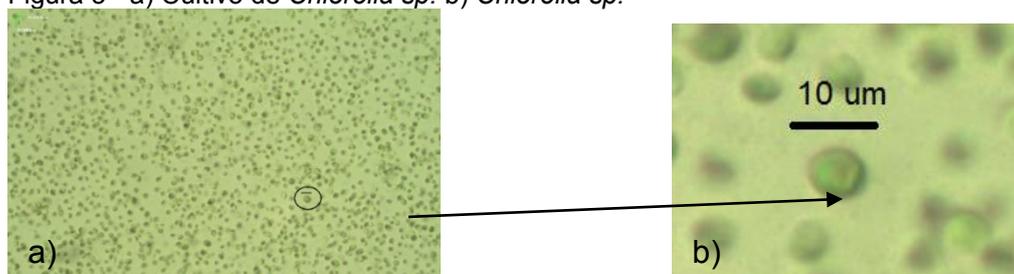
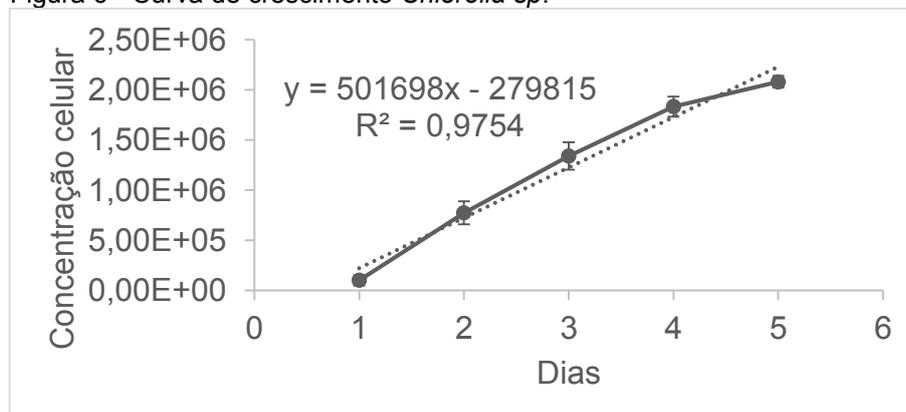


Figura 6 - Curva de crescimento *Chlorella sp.*



Fonte: Autora 2014.

O cultivo da *Micractinium pusillum* (FIGURA 7.) apresentou densidade máxima de $7.18 \times 10^5 \pm 2.98 \times 10^4 \text{ cél.mL}^{-1}$ (FIGURA 8.) e rendimento de $0,192 \text{ g.L}^{-1}$. Abou-Shanab (2012) utilizou diferentes meios de cultivo para avaliar a produção de biomassa e lipídios da *Micractinium pusillum*. Após 17 dias de cultivo em meio Bold's Basal Medium (BBM) o autor obteve um rendimento de $0,34 \pm 0,1 \text{ g.L}^{-1}$, superior ao obtido neste estudo. Shanthala (2009) observou a ocorrência e tolerância desta espécie em águas com elevados níveis de matéria orgânica, podendo ser utilizada como bioindicador do estado trófico do ambiente.

Figura 7 - a) Cultivo de *Micractinium pusillum*. b) *M. pusillum*.

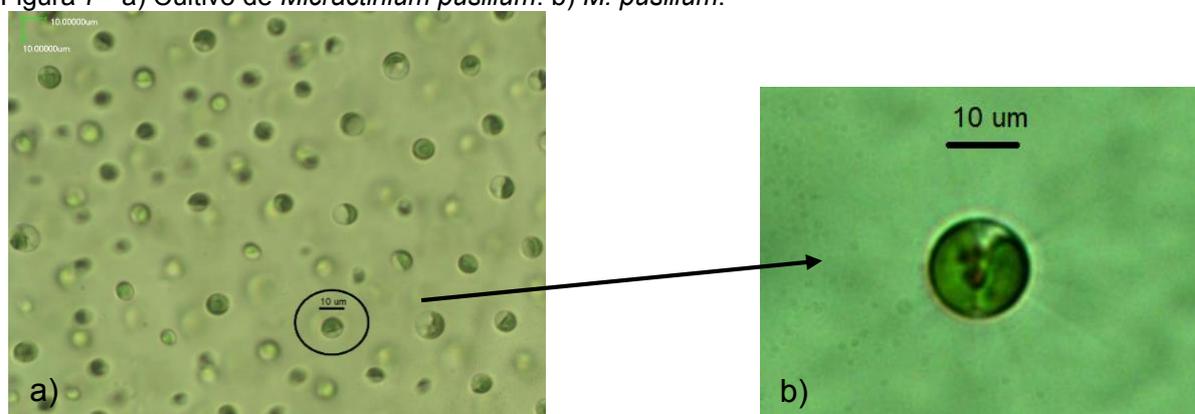
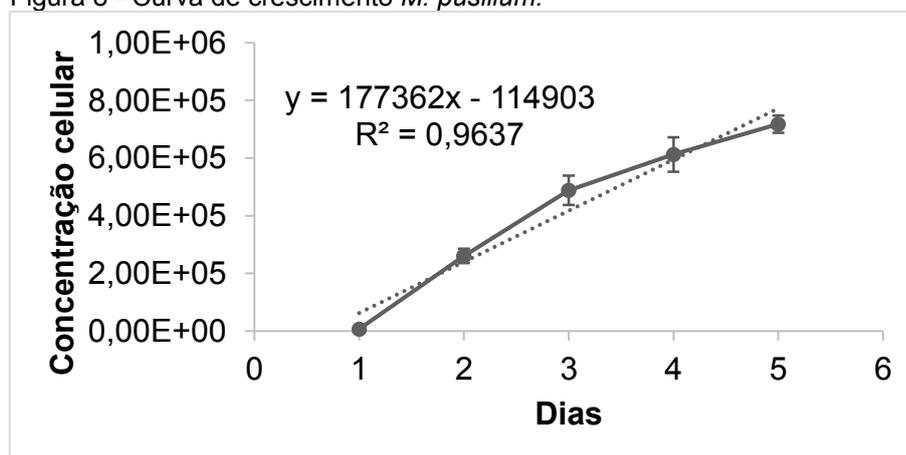


Figura 8 - Curva de crescimento *M. pusillum*.



Fonte: Autora (2014).

A cultura de *Dictyosphaerium pulchellum* (FIGURA 9.) apresentou uma densidade máxima de $1.95 \times 10^6 \pm 2.96 \times 10^5$ cél.mL⁻¹ (FIGURA 10.) e rendimento de 0,298 g.L⁻¹. Dauta (1982) avaliou o desenvolvimento de *D. pulchellum* em meio Chu, obteve densidade máxima de $1.200 \pm 0,24 \times 10^9$ cél.mL⁻¹, superior à encontrada neste estudo. Poucos estudos de isolamento e cultivo de *D. pulchellum* foram realizados, no entanto esta microalga é utilizada como bioindicador de ambientes poluídos BEAUMORD (2010).

Figura 9 - a) Cultivo de *Dictyosphaerium pulchellum*. b) *D. pulchellum*.

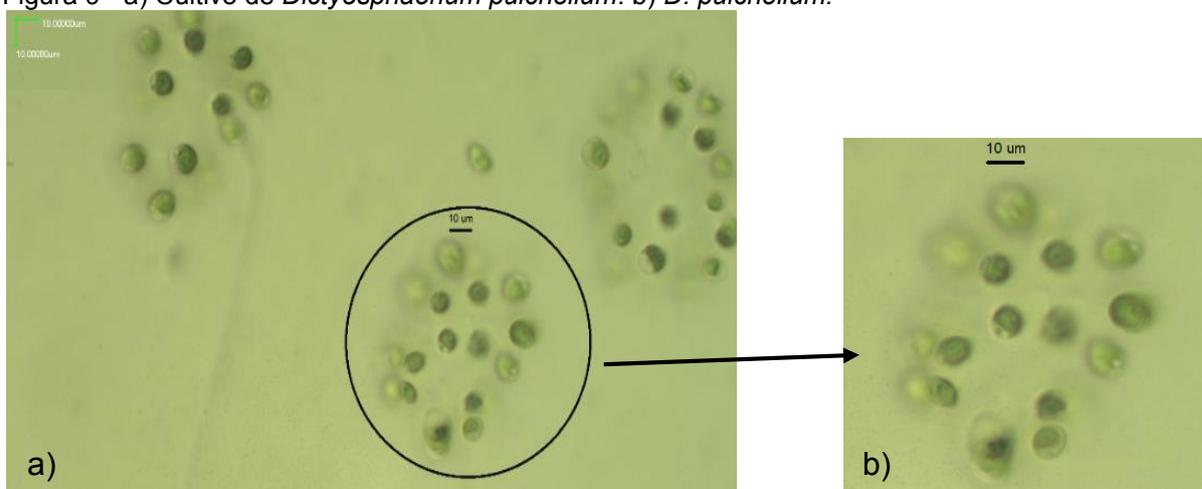
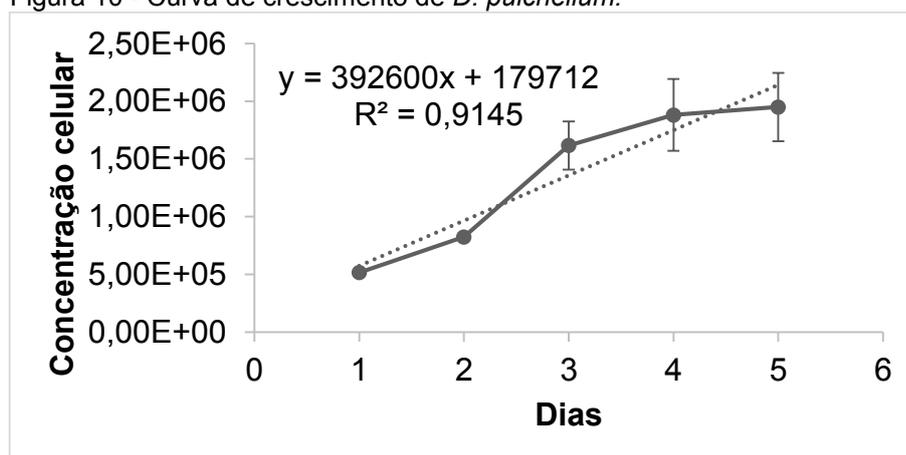


Figura 10 - Curva de crescimento de *D. pulchellum*.



Fonte: Autora (2014).

4.3 Curva de crescimento da Cyanophyceae.

A cianobactéria *Geitlerinema amphibium* (FIGURA 11.) foi cultivada por quatro dias, sendo observada a redução de crescimento relativo do terceiro para o quarto dia, quando o cultivo foi encerrado, apresentando uma densidade máxima de $4.55 \times 10^7 \pm 2.74 \times 10^6$ cél.mL⁻¹ (FIGURA 12.) e rendimento de 0,327 g.L⁻¹.

Souza (2007) avaliou o potencial da cianobactéria *Geitlerinema* sp. para a biorremediação de águas e solos contaminados por arsênio, obtendo uma densidade máxima de $102,40 \times 10^6$ cél.mL⁻¹ em meio BG-1 conforme. Araújo (2013) cultivou a espécie *G. amphibium* em efluente oriundo da aquicultura, observando uma densidade máxima de $29,64 \times 10^6$ cél.mL⁻¹ e rendimento de 0,22 g.L⁻¹ após sete dias de cultivo. No presente trabalho, tanto a densidade celular quanto o rendimento foram maiores do que os encontrados por Souza (2007) e Araújo (2013).

Figura 11 - a) Cultivo de *Geitlerinema amphibium*. b) *G. amphibium*.

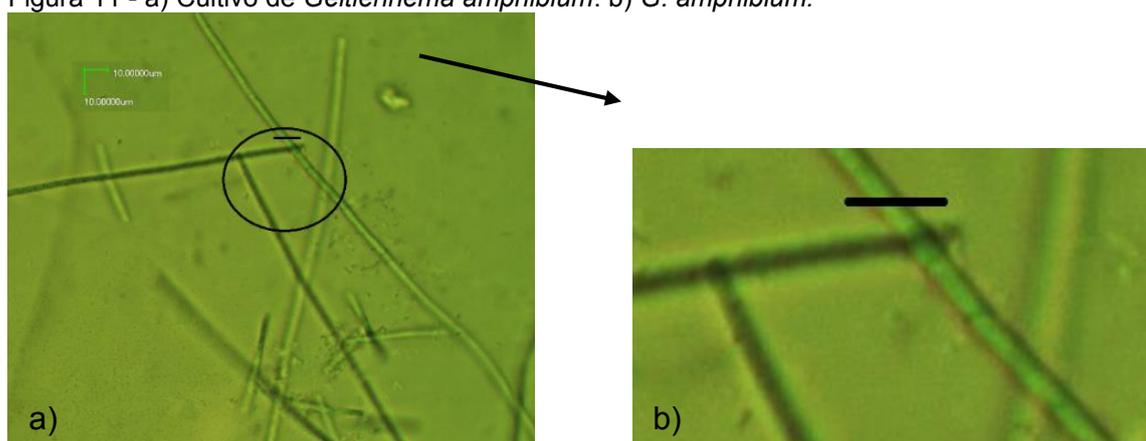
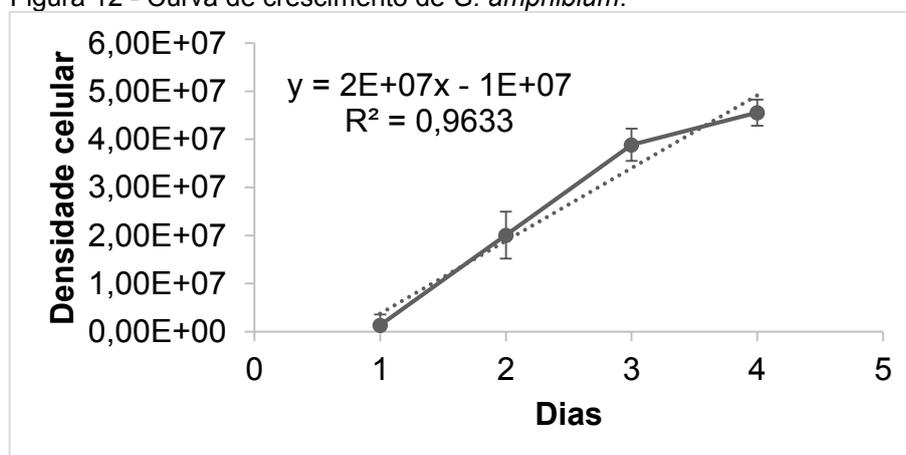


Figura 12 - Curva de crescimento de *G. amphibium*.



Fonte: Autora (2014).

4.4 Curva de crescimento da Bacillariophyceae.

O tempo de cultivo de *Nitzschia sp.* (FIGURA 13.) foi de quatro dias, sendo também finalizado quando foi observada a redução no crescimento relativo do terceiro para o quarto dia, chegando a uma densidade máxima de $1,08 \times 10^5 \pm 3,97 \times 10^3$ cél.mL⁻¹ (FIGURA 14.) e rendimento de 0,63 g.L⁻¹. Guiomar (2007) estudou o crescimento e propriedades nutricionais de *Chaetoceros muelleri* Lemmerman para aquicultura e obteve densidade máxima de $11,05 \pm 1,32 \times 10^6$ cél.mL⁻¹ em meio Guillard f/2 após seis dias de cultivo. KOBAYASI; MAYAMA (1982) consideraram *Nitzschia sp.* como indicadora de ambientes eutrofizados por ser resistente a altas taxas de poluição. Lobo et al. (2002) utilizou a microalga *Nitzschia sp.* na bacia hidrográfica do rio Guaíba, RS como bioindicador de ambientes fortemente poluídos. Além disso, sua biomassa vem sendo utilizada como inseticida e fertilizante natural (FLORES, 2010).

Figura 13 - a) Cultivo de *Nitzschia sp.* b) *Nitzschia sp.*

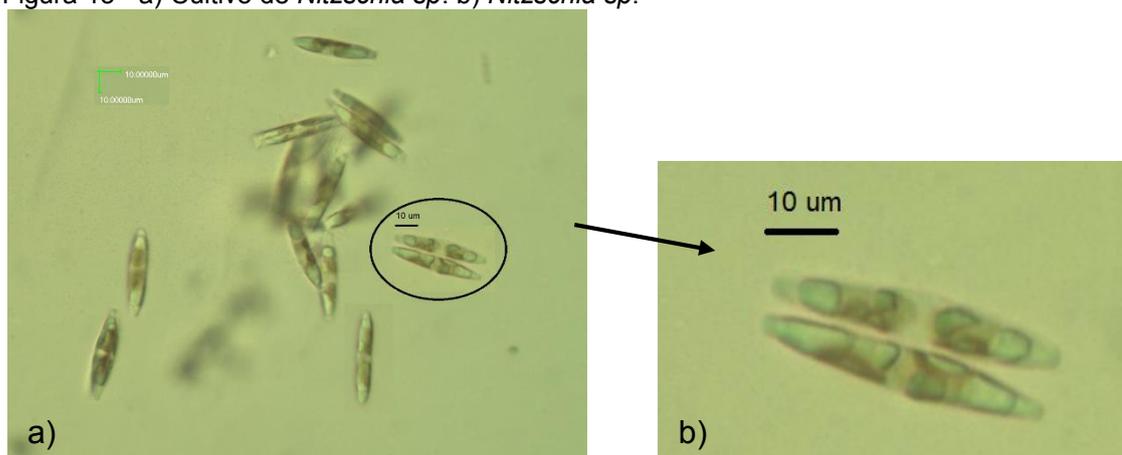
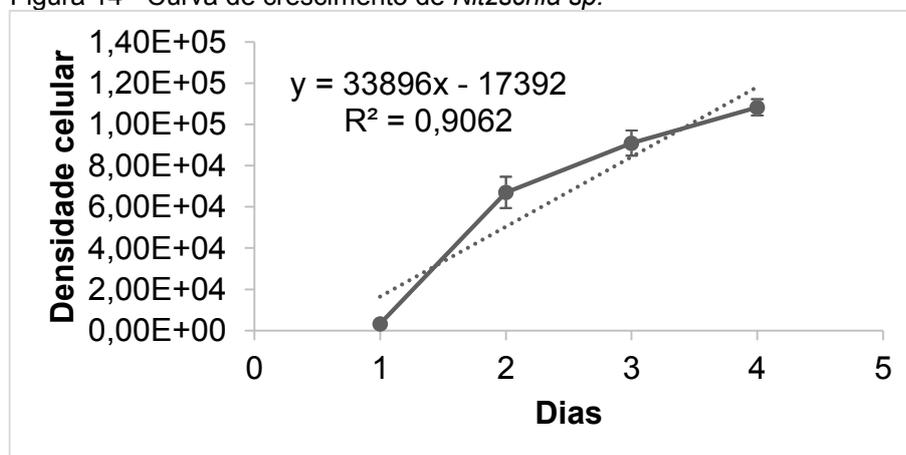


Figura 14 - Curva de crescimento de *Nitzschia sp.*



Fonte: Autora (2014).

As microalgas isoladas apresentaram tempo de cultivo variando de quatro a cinco dias e densidade celular máximas diferentes, sendo a menor obtida da diatomácea *Nitzschia* sp.com $1,08 \times 10^5$ cél.mL⁻¹ e rendimento de 0,63 g.L⁻¹, apresentando maior rendimento devido possuir uma frústula silicosa. Por outro lado, a cianobactéria *Geitlerinema amphibium* apresentou a máxima densidade alcançando $4,55 \times 10^7$ cél.mL⁻¹ com rendimento de 0,327 g.L⁻¹ (Tabela. 4).

Tabela 4 - Parâmetros de densidade celular, taxa de crescimento e rendimento de biomassa.

Táxons	Densidade celular máxima (cél.mL⁻¹)	Desvio padrão (cél.mL⁻¹)	K	Rendimento (g.L⁻¹)
<i>Desmodesmus</i> sp.	$1,18 \times 10^6$	$\pm 6,67 \times 10^4$	0,4752	0,127
<i>Scenedesmus acutus</i> .	$2,39 \times 10^6$	$\pm 6,28 \times 10^4$	0,4949	0,35
<i>Chlorella</i> sp.	$2,08 \times 10^6$	$\pm 5,91 \times 10^4$	0,3467	0,212
<i>Micractinium pusillum</i> .	$7,18 \times 10^5$	$\pm 2,98 \times 10^4$	0,4657	0,192
<i>Dictyosphaerium pulchellum</i> .	$1,95 \times 10^6$	$\pm 2,96 \times 10^5$	0,2276	0,298
<i>Geitlerinema amphibium</i> .	$4,55 \times 10^7$	$\pm 2,74 \times 10^6$	0,4843	0,327
<i>Nitzschia</i> sp.	$1,08 \times 10^5$	$\pm 3,97 \times 10^3$	0,2222	0,63

Fonte: Autora (2014).

5 CONCLUSÃO

De toda a diversidade contida na amostra, foi possível isolar no máximo dois táxons de algumas lagoas, considerando as técnicas de isolamento aplicadas: meio líquido (diluições sucessivas e pipetagem) e meio sólido.

A partir dos cultivos dos táxons isolados foi observado que a espécie *Geitlerinema amphibium* (cianobactéria) apresentou a melhor performance em número de célula ($4.55 \times 10^7 \pm 2.74 \times 10^6$ cél.mL⁻¹) com rendimento de 0,327 g.L⁻¹

Contrariamente, o menor número de células no decorrer do cultivo foi apresentado pelo táxon *Nitzchia sp* (diatomácea) 0,63 g.L⁻¹, e o menor rendimento exibido pela espécie *Desmodesmus sp.* 0,127 g.L⁻¹.

Com o cultivo foi possível conhecer o desenvolvimento, crescimento e rendimento das microalgas, podendo estas serem utilizadas em futuros estudos para obtenção de biomassa em aquicultura.

A realização do isolamento e cultivo com meio Guillard f/2 é eficaz para a obtenção de microalgas de ambientes naturais.

O esforço empreendido na realização deste trabalho propiciou a incorporação de novas espécies ao banco de cepa do Laboratório de Planctologia, localizado no Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará, para futuras pesquisas.

REFERÊNCIAS

- AARONSON, S.; BERNER, T.; DUBINSKY, Z. **Microalgae as a source of chemicals and natural products. Algae biomass: production and use.** [sponsored by the National Council for Research and Development, Israel and the Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung (GSF), Munich, Germany]; editors, Gedaliah Shelef, Carl J. Soeder, 1980.
- ABOU-SHANAB, R.A.I et al. **Manipulating nutrient composition of microalgal growth media to improve biomass yield and lipid content of *Micractinium pusillum*.** African Journal of Biotechnology, v. 11, n. 96, p. 16270-16276, 2012.
- ARAUJO, Ana Luzia Assunção Claudio de et al. **Uso de efluente oriundo da aquicultura no cultivo de microalgas nativas. In: congresso brasileiro de limnologia, 14, 2013, Bonito. Anuais.** Bonito: Ablimno, 2013. p. 12 - 13. Disponível em: <http://www.ablimno.org.br/eventos/xiv-cbl/resumo/648_5202deb98d35e.pdf>. Acesso em: 18 nov. 2014.
- ANAGNOSTIDIS, K. & KOMÁREK, J. **Modern approach to the classification system of Cyanophytes, 2: Choococcales.** Archiv für Hydrobiologie, suppl. 73, Algological Studis 43:157-226. 1986.
- ANAGNOSTIDIS, K. & KOMÁREK, J. **Modern approach to the classification system of cyanophytes 3 – Oscillatoriales.** Arch. Hydrobiol./suppl. 80: 1-4, Algo.Studies, 50-53: 327-472. Stuttgart. 1988.
- ANAGNOSTIDIS, K. & KOMÁREK, J. **Cyanoprokariota I. Teil Chroococcales.** – In: Ettl, H., et al. (Ed). Süßwasserflora von Mitteleuropa. Jene: J. Fischer, 19 (1): 1-548. 1998.
- ANDERSEN, R.A, ed. **Algal culturing techniques.** Academic press, 2005.
- ANDERSEN, R. A. & KAWACHI, M. 2005. **Traditional microalgae isolation techniques.** In Andersen, R. A. (Ed.) Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press, San Diego, CA, pp. 83-101.
- ANTUNES, R; SILVA, I. C. **Utilização de algas para a produção de biocombustíveis.** Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, 2010.
- BALDAUF, S.L. (2003). **The deep roots of eukaryotes.** Revista Science. 300: 703-706. 2003.
- BEAUMORD, A. C. et al. **Aplicação do índice de especificidade de hábitat em chlorococcales fitoplanctônicas, como indicador de qualidade ambiental em rios costeiros: estudo de caso do rio Itajaí-mirim, sc, brasil.** Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology, v. 7, n. 1, p. 109-117, 2010.
- BELAY A, Ota Y, Miyakawa K, Shimamatsu H. **Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*.** *J Appl Phycol* 1993; 5:235-41

BICUDO, C.E.M., MENEZES, M. **Gêneros de águas continentais do Brasil (chave para identificação e descrições)**. 2 ed. RiMa, São Carlos. Brasil, 502p. 2006

BJERK, T. R. **Microalgae cultivate in fotobiorreator and joint reactor objectiving the bio-remediation and production of biofuels** (In Portuguese: Cultivo de microalgas em fotobiorreator e reator misto visando a biorremediação e produção de biocombustíveis). Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul-Rio Grande do Sul. 2012.

BOURRELLY, P. C. 1972. **Les algues d'eau douce; initiation à la systématique, 1: les Algues Vertes**. Paris: N. Boubée. 573p.

BOURRELLY, P.. **Les Algues D'eau Douce-Initiation à la Systématique**. Tome III: Les Algues Bleues Et Rouges. Éditions M. Boubée & Cie. Paris. 509p, 1985.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **VII lista dos novos ingredientes aprovados – comissões tecnocientíficas de assessoramento em alimentos funcionais e novos alimentos**. Disponível em URL: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos_ingredientes.htm. [08 mai 2008].

BROOK, A. J. 1981. **The Biology of Desmids**. Oxford: BlackWell Scientific Publ. 216p

CALIJURI, M. C.; ALVES, M. S. A.; SANTOS, A. C. A. **Cianobactérias e Cianotoxinas em Águas Continentais**. São Paulo. Rima, 2006.

CELEKLI, A., M. Balci e H. Bozkurt. (2008). **Modelling of *Scenedesmus obliquus*; function of nutrients with modified Gompertz model**. *Bioresource Technology*, 99(18): 8742-7. doi:10.1016/j.biortech.2008.04.028.

CETESB. 2002. **Relatório de qualidade das águas interiores do Estado de São Paulo**, 2001. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, São Paulo.

COHEN, Z. (1986), **CRC Handbook of Microalgal Mass Culture**, Richmond, A., ed., CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 421–454

DAUTA, Alain. **Conditions de développement du phytoplancton. Etude comparative du comportement de huit espèces en culture. I. Détermination des paramètres de croissance en fonction de la lumière et de la température**. In: *Annales de limnologie*. EDP Sciences, 1982. p. 217-262.

DERNER R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. **Microalgas, produtos e aplicações**. Santa Maria, v 36. N.6 p.1959-1967, nov-dez, 2006.; ISSN 0103-8478.

DURAND-CHASTEL, H. **Production and use of *Spirulina* in México**. In: SHELEF, G.; SOEDER, C.J. *Algae biomass*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1980. p.51-64.

- FRANCESCHINI, Iara Maria et al. **Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica**. Artmed, 2010.
- FRANCO, André Luiz Custódio et al. **Biodiesel de microalgas: avanços e desafios**. Quim. Nova, v. 36, n. 3, p. 437-448, 2013.
- FLORES, Andres Wilfredo Rivas et al. **Consideraciones generales para el estudio y monitoreo de diatomeas en los principales rios de El Salvador**. Ciudad Universitaria, 2010.
- GOMES, R. B. **Qualidade sanitária e grau de eutrofização de uma lagoa urbana do município de Fortaleza- Ceará (Lagoa da Messejana)**. Dissertação (mestrado)- Universidade Federal da Paraíba, 2000.
- GRESSLER, Pablo Diego. **Avaliação da eficiência de desmodesmus subspicatus (r.chodat) e.hegewald & a.schmidt (chlorophyceae) cultivada em fotobiorreator tubular com efluente da ete-unisc, visando biorremediação e obtenção de energia**. 2011. 130 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2011.
- GUILLARD, R. R. L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: **Culture of marine invertebrate animal**. SMITH, W. L.; CHANLEY, M. H. (eds.). New York: Plenum Publishing, p. 29-60, 1975.
- GUIOMAR MOREIRA, Evaldení et al. **Crescimento e propriedades nutricionais de Chaetoceros muelleri Lemmerman para aquicultura: comparação entre diferentes meios de cultivo**. 2007.
- GURBUZ, F., H. Ciftci e A. Akcil, 2009. **Biodegradation of cyanide containing effluents by Scenedesmus obliquus**, Journal of Hazardous Materials 162:74-79, doi: 10.1016/j.jhazmat.2008.05.008.
- HOEK, Christiaan. **Algae: an introduction to phycology**. Cambridge university press, 1995.
- JOCHIMSEN, E. M.; Carmichael, W. W.; An, J. S.; Cardo, D. M.; Cookson, S. T.; Holmes, C. E. M.; Antunes, M. B. D.; Demelo, D. A.; Lyra, T. M.; Barreto, V. S. T.; Azevedo, S. M. F. O.; Jarvis, W. R. **Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil**. The New England Journal of Medicine 1998.
- JUNIOR, A. P. M. **Indicadores ambientais e recursos hídricos**. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 688p. Cap.2, p.65-120. 2007.
- KHAN, Fareed A.; ANSARI, Abid Ali. **Eutrophication: an ecological vision**. The botanical review, v. 71, n. 4, p. 449-482, 2005.
- KOBAYASI, Hiromu; MAYAMA, Shigeki. **Most pollution-tolerant diatoms of severely polluted rivers in the vicinity of Tokyo**. Group, v. 3, p. 10, 1982.

KOMÁREK, J. & Anagnostidis, K. 1999. **Cyanoprokaryota. 1. Teil Chroococcales** In: Ettl, H.; Gardner, G.; Heynig, H. & Mollenheuer, D. (Eds.). Süßwasserflora von Mitteleuropa. Jena, Gustav Fischer.

KOMARÉK, J. & Marvan, P., 1992. **Morphological Diff. in Natural Populations of the Genus *Botryococcus* (Chlorophyceae)**. Archiv fuer Protistenkunde 141: 65-100.

LOBO, E.A.; CALLEGARO, Maróstica; V.L. BENDER, E.P. **Utilização de algas diatomáceas epilíticas como indicadoras da qualidade da água em rios e arroios da Região Hidrográfica do Guaíba, RS, Brasil**. Edunisc, 2002.

LOURENÇO, S.O.; **Cultivo de algas marinhas – princípios e aplicações**. São Carlos-SP: RiMa, 2006.

MARINHO, Y. et al. **Avaliação do crescimento da *Chlorella vulgaris* em diferentes pH** Objetivando Sua Inserção Na Matéria prima Do Biodiesel. Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão-JEPEX, 2009

MENDES, M.C.Q., et al. **Coleção de microalgas de ambientes dulciaquícolas naturais da Bahia, Brasil, como potencial fonte para a produção de biocombustíveis: uma abordagem taxonômica**. Acta Botanica Brasilica, v. 26, n. 3, p. 691-696, 2012.

MÉNDEZ SUAZA, L. et al. **Crecimiento de *Scenedesmus quadricauda* en efluentes cloacales de la ciudad de Trelew**, Chubut, Argentina. 2010.

NUNES, T. S.; LIMA, M. A. 2004. **Cianobactérias de um manancial de abastecimento urbano, Rio Pequeno, Linhares-ES**. 24º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental. ABES – Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental.

OGUNSEITAN, O. **Microbial Diversity – Form and Function in Prokaryotes**. Blackwell Publishing, Oxford, 2005, 292 p.

PORTELLA, M.C et al. **Produção de organismos planctônicos para alimentação inicial de larvas de peixes de água doce**. Boletim Instituto de Pesca, São Paulo (Bra), v. 24, p. 79-89, 1997

REDAELLI, Cristiane et al. **Influência da intensidade da luz sobre a biofixação de carbono em *Chlorella minutíssima***. Universidade Federal do Rio Grande, 2011.

ROUND, F.E.; Crawford, R.M. & Mann, D.G. 1990. **The Diatoms, Biology & Morphology of the Genera**. Cambridge, Cambridge University Press.

RICHMOND, Amos. **Microalgal biotechnology at the turn of the millennium: a personal view**. Journal of Applied Phycology, v. 12, n. 3, p. 441-451, 2000.

SÁNCHEZ-VÉLEZ, A.; GARCÍA-NÚÑEZ, R. M. **Biomonitorio de rios en la gestion de cuencas; Una aproximación introductoria**. In: IX Congreso Nacional de Irrigación, Simposio. 1999. p. 63-71.

SHELEF, G; SOEDER, C.J; BALABAN, M. (Ed). **Algae biomass; production and use**. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1980.

SHANTHALA, M.; HOSMANI, Shankar P.; HOSETTI, Basaling B. **Diversity of phytoplanktons in a waste stabilization pond at Shimoga Town**, Karnataka State, India. Environmental monitoring and assessment, v. 151, n. 1-4, p. 437-443, 2009.

SINGH, J., GU, S. 2010. **Commercialization potential of microalgae for biofuels production**. Renewable and Sustainable Energy Reviews 14.

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

SOUZA, E.A, **Potencial de cianobactérias para a biorremediação de águas e solos contaminados por arsênio**. 2007. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of Fermentation Technology**. Second Edition. Butterworth Heinemann, Elsevier Science, 1995, 357 p.

TOMASELLI, L. The microalgal cell. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. Oxford: Blackwell Science, 2004. p.3-19.

Vitousek, P.M., Mooney, H.A., Lubchenco, J., and Melillo, J.M., 1997, **Human domination of Earth's ecosystems**: Science, v. 277, p. 494–499.

WATANABE, T. & KIRON, V. 1994. **Prospects in larval fish dietetics**. **Aquaculture**, 124: 223- 251.

WEHR, John D. **Freshwater algae of North America: ecology and classification**. Academic Press, 2002.