

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA
CAMPUS DE JABOTICABAL

**USO DE PLANTAS AQUÁTICAS COMO
MEIO DE CULTURA NO CULTIVO DE
ANKISTRODESMUS GRACILIS (REINSCH)
KORSHIKOV (CHLOROPHYCEAE)**

Taise Florêncio

Jaboticabal, São Paulo

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**USO DE PLANTAS AQUÁTICAS COMO
MEIO DE CULTURA NO CULTIVO DE
ANKISTRODESMUS GRACILIS (REINSCH)
KORSHIKOV (CHLOROPHYCEAE)**

Mestranda: Taise Florêncio

Orientadora: Profa. Dra Lúcia Helena Sipaúba Tavares

Dissertação apresentada ao programa de
Pós graduação em Aquicultura no Centro
de Aquicultura da Unesp-Caunesp, como
parte dos requisitos para a obtenção do
título de Mestre.

Jaboticabal, São Paulo

2017

Florêncio, Taise

F632u Uso de plantas aquáticas como meio de cultura no cultivo de
Ankistrodesmus gracilis (Reinsch) Korshikov (Chlorophyceae) / Taise
Florêncio. – – Jaboticabal, 2017
iv, 57 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro
de Aquicultura, 2017

Orientadora: Lúcia Helena Sipaúba Tavares

Banca examinadora: Maria Stela Maioli Castilho Noll, Cintia Erbert
Bibliografia

1. Meio de cultura. 2. Macrófitas. 3. Microalga. I. Título. II.
Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639:556.55

Dedico,

Aos meus pais, José e Helena que sempre me incentivaram em cada etapa, obrigada por todo amor, carinho e compreensão, mostrando que não há aprendizado que supere os valores de um homem

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por cada dia, dando - me forças e fé para não desanimar diante dos desafios.

Aos meus pais acima de tudo.

À minha orientadora Profa. Dra. Lúcia Helena Sipaúba Tavares, por sua presença, paciência, confiança e incentivo durante essa jornada. Obrigada também, pelos conselhos que muito me ensinaram e levarei para o resto da vida.

Aos meus familiares e principalmente aos meus irmãos Marcelo e Janaina, e minhas sobrinhas Thayná e Marina, pelo carinho, incentivo e apoio nas horas mais difíceis.

Ao Bruno que, além de colega de trabalho, tornou-se um grande amigo, obrigada por toda ajuda.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho do Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton, Flávia, Rodrigo, Aline, Lorena, Gustavo e Gislaine.

À Gel pela amizade que adquiri durante esta etapa, e também por toda ajuda.

Ao CAUNESP e funcionários por disponibilizar ajuda durante realização do experimento.

Ao CNPq pela bolsa de mestrado (processo 130584/2015-0).

A Fapesp pelo apoio financeiro (projeto nº 2014/24697-3).

A todos que contribuíram com este trabalho, expresso meus sinceros agradecimentos

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
ÍNDICE DE TABELAS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Microalga na Aquicultura	4
2.2 Meios de cultura.....	5
2.3 Condições de cultivo.....	7
2.4 <i>Ankistrodesmus gracilis</i>	10
2.5 Macrófitas Aquáticas.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1 Local de estudo.....	16
3.2 Cepa da microalga.....	17
3.3 Condições de cultivo e meios de cultura	17
3.4 Período experimental.....	19
3.5 Métodos analíticos.....	21
3.6 Crescimento.....	21
3.7 Dados biológicos.....	22
3.8 Composição bioquímica.....	23
3.9 Composição dos nutrientes das plantas aquáticas.....	23
3.10 Extração de pigmento.....	23
3.11 Análise estatística dos dados.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Variáveis biológicas.....	24
4.2 Variáveis bioquímica.....	30
4.3 Análise de macro e micronutrientes das macrófitas aquáticas.....	37
5. CONCLUSÃO.....	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Colônias celular de <i>Ankistrodesmus gracilis</i>	11
Figura 2. Imagens disponíveis em pefaf.org, nargir.ir e aphotoflora.....	13
Figura 3. Imagens disponíveis em ufrgs e Altavista.org.....	13
Figura 4. Imagens disponíveis em amc-nh.org e commons.org.....	14
Figura 5. Imagens disponíveis em sciendaily.com, pinteres.com e coocan.jp.....	16
Figura 6. A: Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton, B: Sala de manuseio dos experimentos, C: Cepário, cultivo de <i>Ankistrodesmus gracilis</i>	16
Figura 7. A: Diferentes meios de cultura contendo macrófita aquática, B: Meios de cultura NPK e CHU ₁₂	17
Figura 8. Montagem do experimento: A: Vitamina do complexo (B), B: Microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i> , C: adição da alga, D: Experimento montado.....	20
Figura 9. Diagrama esquemático do cultivo da microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i> em volume de 2L, onde: A = cepa; B = cultivo inicial em 2L somente em meio NPK (20:5:20); C = experimento em sistema fototrófico com fertilizante inorgânico (NPK) mais plantas aquáticas <i>Eichhornia crassipes</i> , <i>Eichhornia azurea</i> , <i>Pontederia cordata</i> e <i>Typha domingensis</i> meio CHU ₁₂ e somente o fertilizante inorgânico (NPK,20:5:20)	20
Figura 10. A: Análise de parâmetros fisiológicos, B: Análise biológica do crescimento algal.....	21
Figura 11. A: Centrifugação da biomassa algal, B: Biomassa algal para posterior análise bioquímica	23
Figura 12. A: Filtragem para a extração de pigmento, B: Amostras prontas para leitura.....	24
Figura 13. Curva de crescimento de microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i> durante o período experimental: A= meios comerciais CHU ₁₂ E fertilizante inorgânico NPK (20:5:20); B= meios de cultura a base de macrófita + fertilizante inorgânico (20:5:20)	26
Figura 14. Variação do teor de lipídio e proteína em relação aos diferentes meios de cultura.....	29
Figura 15. Variação das concentrações de amônia nos diferentes meios de cultivo.....	31
Figura 16. Variação das concentrações de nitrato nos diferentes meios de cultivo.....	32
Figura 17. Variação das concentrações de nitrito nos diferentes meios de cultivo.....	33
Figura 18. Variação das concentrações de fósforo nos diferentes meios de cultivo.....	34
Figura 19. Variação da concentração de clorofila - a nos diferentes meios de cultura.....	35

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Composição dos nutrientes nos diferentes meios de cultura NPK, CHU ₁₂ , <i>Eichhornia crassipes</i> , <i>Eichhornia azurea</i> , <i>Typha domingensis</i> e <i>Pontederia cordata</i> ...	18
Tabela 2. Taxa de crescimento e tempo de duplicação de <i>Ankistrodesmus gracilis</i> durante o período experimental.....	27
Tabela 3. Valores médios das variáveis bioquímicas e biológicas de <i>Ankistrodesmus gracilis</i> em relação aos diferentes meios de cultura.....	28
Tabela 4. Variáveis do meio de cultivo durante a fase experimental.....	36
Tabela 5. Análise de micronutrientes na forma moída (M) e na forma líquida (L) das macrófitas utilizadas como meio.....	38

RESUMO

A biotecnologia utilizada no cultivo de microalgas à base de meio comercial é de alto custo. Sendo assim, alguns estudos indicam que o uso de meios de cultura alternativos com a finalidade de reduzir o preço de produção em curto espaço de tempo e mantendo alto valor nutricional, são procedimentos a serem adotados. O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade de diferentes meios de cultivo a base de macrófitas. O meio com macrófita foi associado ao fertilizante inorgânico NPK (20:5:20). O experimento foi conduzido no período de 28 dias em triplicata. O meio de cultura com *E. crassipes* alcançou maior densidade celular (434×10^5 cel. mL⁻¹), comparado com os outros meios de cultura com macrófitas que variaram de $319,7 \times 10^5$ cel. mL⁻¹ (*E. azurea*) a $223,5 \times 10^5$ cel. mL⁻¹ (*T. domingensis*). Durante o período experimental o oxigênio dissolvido, pH e condutividade elétrica não apresentaram diferenças significativas ($P > 0,05$). A taxa de crescimento e densidade celular da microalga cultivada em meio de cultura com plantas aquáticas foram maiores ($P > 0,05$) do que no meio NPK porém, similares ($P < 0,05$) ao meio comercial CHU₁₂. Em relação aos nutrientes, o teor de N (67 g.L^{-1}) foi o mais elevado no meio de cultura com *T. domingensis* e os demais nutrientes (P, K, Ca, S, B, Cu, Fe e Zn) apresentaram concentrações abaixo de 35 g.L^{-1} , nos diferentes meios utilizados. O uso de macrófitas como fonte alternativa para ser utilizada como meio de cultura no desenvolvimento de *A. gracilis* demonstrou ser viável tanto do ponto de vista econômico, nutricional e com elevada biomassa algal, sendo que *E. crassipes*, *E. azurea* e *T. domingensis* apresentaram os melhores resultados.

Palavras- chave: meio de cultura, macrófita, microalga, NPK, CHU₁₂.

ABSTRACT

Since biotechnology in commercial medium-based culture of microalgae has very high costs, several studies recommend alternative medium cultures to reduce product costs in a short time period, coupled to high nutritional values. Objective of this work was to evaluate the quality of different macrophytes based culture media. Medium with macrophyte was associated with inorganic fertilizer NPK (20:5:20). Assay was conducted for 28 days, in triplicate. Culture medium with *E. crassipes* had the greatest cell density (434×10^5 cel. mL⁻¹) when compared to other culture media with macrophytes and ranged between 319.7×10^5 cel. mL⁻¹ (*E. azurea*) and 223.5×10^5 cel. mL⁻¹ (*T. domingensis*). Dissolved oxygen, pH and electric conductivity did not show any significant differences during the experimental period ($p > 0.05$). Growth rate and cell density of microalga cultivated in a medium with aquatic plants were greater ($p > 0.05$) than in NPK medium, albeit similar ($p < 0.05$) to the commercial medium CHU₁₂. Further, N rate (67 g.L^{-1}) was the highest in culture medium with *T. domingensis*, whilst the other nutrients (P, K, Ca, S, B, Cu, Fe and Zn) had lower than 35 g.L^{-1} concentrations in the different media employed. The use of macrophytes as an alternative source as culture medium in the development of *A. gracilis* proved to be viable from the economic and nutritional point of view, coupled to high algal biomass. *E. crassipes*, *E. azurea* and *T. domingensis* provided the best results.

Keywords: culture medium, macrophyte, microalga, NPK, CHU₁₂.

1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia utilizada na cultura de microalgas à base de meio comercial é dispendiosa, alguns estudos propõem o uso de resíduos, fertilizantes entre outros nutrientes para o cultivo de microalgas com baixo custo de produção (PEREZ-GARCIA et al., 2011). As microalgas apresentam rápido crescimento, acúmulo de lipídios, hidratos de carbono e alta produtividade (BAHADAR e BILAL KHAN, 2013). A grande vantagem no cultivo de microalga é a fácil adaptação às condições ambientais; alta eficiência fotossintética e não são competidores em áreas produtoras de alimentos (ZHU et al., 2014).

O uso de reagentes químicos durante o cultivo de microalgas para obter alta densidade, apresenta elevado custo quando comparado com outros meios de cultivo (HARUN, 2010). Estratégia de estudos tem sido focada nas limitações de comercialização, tais como o baixo custo para uma produção em larga escala, métodos de produção de biomassa com maior eficiência energética, fornecimento de nutrientes e disponibilidade de dióxido de carbono (CHISTI, 2013).

Os meios de cultura vêm sendo desenvolvidos para diferentes cultivos de microalgas. Quando se trata de meio de cultura sintético, o alto custo dos nutrientes pode representar fator limitante para uma produção (BAUMGÄRTNER, 2011). Assim, o meio de cultura alternativo é desenvolvido para se adaptar às necessidades nutricionais das microalgas para obtenção de elevada biomassa e composição bioquímica, além de economicamente viável (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA, 2001).

O uso do meio de cultura para microalgas contendo plantas aquáticas e NPK, é utilizado como fonte alternativa, apresentando concentrações elevadas de nitrogênio e fósforo, sendo de grande importância no desenvolvimento e crescimento à baixo custo. A adição de vitamina do complexo B é acrescentada para incrementar o crescimento da microalga. O fertilizante inorgânico (NPK) associado à macrófita *Eichhornia crassipes* promove ganho nutricional à

microalga *Ankistrodesmus gracilis* sendo similar ao meio comercial CHU₁₂ (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009).

O uso de macrófitas aquáticas como meio de cultura alternativo é considerado eficiente para o desenvolvimento da *Ankistrodesmus gracilis* devido à grande disponibilidade de nutrientes presentes nas plantas. Os fertilizantes inorgânicos vêm sendo usados na aquicultura, como forma de aumentar a biomassa da microalga (FIORESI e SIPAÚBA, 2008; SIPAÚBA-TAVARES e PEREIRA, 2008; SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009; 2011; 2015; 2017).

O nitrogênio por ser constituinte de diversas substâncias do metabolismo primário, é um elemento importante para as microalgas. Quando há disponibilidade de nitrogênio no cultivo ocorre o aumento nas concentrações de proteínas, carotenoides e clorofila, porém, conforme se limita o nitrogênio do meio, reduz essas concentrações (LOURENÇO, 2006; ORDOG et al., 2012).

O fósforo participa de todos os processos de trocas energéticas e na constituição de moléculas estruturais. A assimilação do fósforo é dependente da luz, possivelmente, em razão da acumulação de energia em ATP. Semelhante ao nitrogênio, o fósforo é considerado um dos principais elementos limitantes do crescimento celular (LOURENÇO, 2006).

Fatores ambientais como temperatura, luz, pH e nutrientes, não só afetam a fotossíntese e a taxa de crescimento, como também, influenciam na atividade metabólica e na composição celular das microalgas (HUANG et al., 2010).

A microalga *Ankistrodesmus gracilis* caracteriza-se por ser unicelular imóvel, possui clorofila-a e diversos minerais, sendo rica em ácidos graxos essenciais como o γ -linolênico, carotenóides e vitaminas do complexo B (YEGANEH et al., 2015)

O presente estudo teve por objetivo avaliar a influência do meio de cultura baseado em macrófita no crescimento e desenvolvimento desta microalga *Ankistrodesmus gracilis* com a finalidade de gerar uma ferramenta para uso biotecnológico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O Brasil possui grande diversidade vegetal, com 37.381 espécies sendo descritas, 3.496 de algas, distribuídas em todos os biomas brasileiros (FORZZA et al., 2012). Mais de mil cepas são mantidas em coleções ao redor do mundo, mas apenas uma pequena quantidade tem sido cultivada em escala industrial. Por serem pouco exploradas, as microalgas apresentam uma boa oportunidade para novas descobertas (OLAIZOLA, 2003).

A aquicultura é considerada uma atividade agroindustrial multidisciplinar com o cultivo de diversos organismos aquáticos, como moluscos, crustáceos e peixes, dentre esses cultivos o de algas vem ganhando grande destaque (OLIVERA, 2009).

Os primeiros estudos realizados envolvendo cultivo de microalgas no Brasil, iniciaram-se na década de 70, em laboratório com algumas dezenas de cepas na Universidade de São Paulo. A partir de 1980, esses cultivos começaram a se difundir, com envolvimento de pesquisadores e universidades de vários estados (LOURENÇO, 2006).

Pesquisas com microalgas, no Brasil, são relativamente recentes e têm focado, principalmente, o aspecto de crescimento sob diversas condições, como meios de cultura, e outros parâmetros como nutrientes, temperatura, salinidade e luz (SIPAÚBA et al., 1999).

O cultivo de microalgas pode ser realizado em diferentes meios de cultura e substratos, atuando nos processos de tratamento de efluentes, biorremediação de metais pesados, na produção de produtos biotecnológicos para a indústria de ração animal, fertilizantes e química fina (PEREZ-GARCIA et al., 2011).

2.1 Microalga na Aquicultura

O termo “microalga” é utilizado para organismos eucarióticos fotossintéticos, unicelulares, em geral com dimensões entre 1 e 10 μm . São organismos amplamente distribuídos, apresentando formas coloniais ou livres podendo ser encontrados em corpos d’água doce, salgada e salobra. Estima-se que existem aproximadamente cerca de 200-800 mil espécies de algas ao redor do mundo, e apenas 35 mil foram descritas até o presente momento (EBENEZER et al., 2012).

As microalgas podem ser definidas como microrganismos fotossintéticos, que armazenam energia solar transformando-a em energia biológica; combinando água e dióxido de carbono atmosférico na produção de biomassa (polissacarídeos, proteínas, lipídios e hidrocarbonetos) (ANDRADE e COSTA 2008). São responsáveis por manter o equilíbrio ecológico, além de possuir importância econômica e social, sendo fonte de alimento para a humanidade (GAFFNEY et al., 2014). Também são de grande utilização na aquicultura como alimento para pós-larvas de moluscos, peixes e crustáceos em decorrência da elevada biomassa e valor nutricional, pequeno tamanho e alto valor de ácidos graxos polissaturados (SUH et al., 2015).

Nas últimas décadas as microalgas têm chamado atenção devido à ampla diversidade de espécies, sendo empregadas na alimentação humana e animal, como compostos valiosos, na geração de biocombustíveis e nas indústrias farmacêutica e cosmética (DE MARCHIN, 2015).

Na produção industrial de microalgas, ocorre a falta de investimentos em tecnologia para a produção, e tornando-se altamente custosas, impedindo o avanço de projetos de produção, em larga escala (WANG et al., 2014).

O interesse em cultivar microalgas chama atenção em relação ao valor comercial dos produtos extraídos com ampla variedade de aplicações (TOPARE et al., 2012). As microalgas assimilam os nutrientes existentes no concentrado incorporando-os à sua biomassa, obtendo um produto nutricionalmente rico e pode ser utilizado como suplemento alimentar na aquicultura e em outras áreas de atuação (MORIOKA et al., 2014).

A energia produzida pelas microalgas é absorvida por organismos do segundo nível trófico (consumidores primários), proporcionando uma continuação nas cadeias alimentares aquáticas, além de ser utilizada na produção de biocombustíveis (CHISTI, 2007), suplementos alimentares e fármacos (DEL CAMPO et al., 2007; MATA et al. 2010), cosméticos, nutrição animal e humana (SPOLAORE et al., 2006). Assim, o uso como fonte de alimento tem-se tornado uma prioridade, tanto para aumentar a produção destes microrganismos, como para melhorar o custo-benefício dos sistemas de produção no desenvolvimento de novas tecnologias, com efeitos benéficos à saúde (BENELHADJ et al., 2016). Além dessa gama de utilização das microalgas, também são responsáveis em pelo menos 60 % da produção primária de oxigênio da Terra (CHISTI, 2007).

A viabilidade econômica de um sistema de produção de microalgas está relacionada com os investimentos necessários para sua instalação e operação, bem como o valor agregado do produto final. Dessa forma, ao analisar a viabilidade econômica da produção de microalgas, é essencial considerar que há diferentes produtos que podem ser obtidos a partir deste cultivo, alguns com alto valor agregado. Portanto, há uma necessidade de estudos ou pesquisas específicas para o tipo de cultivo de microalgas para produção em grande escala (WANG et al., 2014).

Na década de 80 o desenvolvimento do cultivo de microalgas para alimentação direta de larvas e alevinos de peixes tomou um grande impulso. Ao longo do tempo a microalga passou a ser utilizada de forma direta (liofilizada) na ração e também, junto à fontes alternativas como fertilizantes inorgânicos e plantas aquáticas como meio de cultura como forma de baratear o custo de produção em laboratório (SIPAÚBA- TAVARES e ROCHA, 2001; FIORESI e SIPAÚBA-TAVARES, 2008; SIPAÚBA-TAVARES e PEREIRA, 2008; SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009; 2011; 2013; 2015a e b; 2017).

2.2 Meio de cultura

O cultivo de microalgas é importante para conhecimento da biologia de diferentes espécies, favorecendo a produção em ambientes controlados. A

função principal de toda microalga é a eficiência fotossintética para uma produção de material orgânico e os meios de cultura podem oferecer nutrientes necessários ao crescimento da espécie (McKIM e DURNFORD, 2006).

O crescimento e a composição das microalgas são definidos pelas condições de cultivo, e devido a capacidade de se adaptarem aos diversos ambientes, são capazes de alterar sua rota metabólica como resposta às mudanças ambientais (MATA et al., 2010).

Para o desenvolvimento de um meio de cultura, é de grande importância a concentração total de sal, fonte de carbono, fonte de nitrogênio e outros elementos como fósforo, potássio, magnésio, sódio, sulfato, microelementos, componentes orgânicos e substâncias essenciais que auxiliam no crescimento da microalga (BECKER, 1994; LOURENÇO, 2006).

Os meios alternativos de cultura para microalgas podem ser promissores, principalmente, para a produção de compostos de baixo valor agregado. Além disso, como ocorre redução do potencial de poluição dos resíduos utilizados, agrega-se valor ambiental ao processo. A utilização de resíduos para a produção de microalgas apresenta alguns desafios, como, presença de compostos tóxicos, de microrganismos e a variabilidade da composição. Uma alternativa para solucionar parte dessas questões é o isolamento de cepas de microalgas dos próprios resíduos, as quais tendem a ser mais robustas e competitivas (LIANG et al., 2010).

Para minimizar o problema da variabilidade da composição do resíduo a sugestão é a análise química, sendo que alguns grupos de pesquisa têm, utilizado resíduos, e adotado a produção de microalgas em sistemas sequenciais com uma etapa heterotrófica e outra fotoautotrófica. Zhou et al., (2012) estudaram o tratamento de esgoto doméstico utilizando um sistema sequencial de microalgas. O sistema mostrou-se mais eficaz na diminuição do potencial poluidor do que na produção de biomassa, no entanto, como o custo do cultivo foi mais baixo que o convencional, mesmo não ocorrendo grande produção de biomassa, foi considerada viável.

O meio de cultura utilizado no cultivo de microalgas é o principal fator responsável pela alta produtividade. Os nutrientes presentes nesses meios podem estimular ou inibir o crescimento de acordo com a sua disponibilidade

(SIPAÚBA-TAVARES et al., 2011). O uso de meios alternativos principalmente a base de planta aquática têm por finalidade baratear o custo de produção e também a utilização de recursos naturais. Assim, o uso de plantas aquáticas, como a *Eichhornia crassipes*, como meio de cultura proporciona uma nova ferramenta biotecnológica garantindo melhor forma de utilização dos resíduos naturais, uma vez que na aquicultura nacional são consideradas de grande impacto (SIPAÚBA - TAVARES et al., 2009).

No caso do meio com plantas aquáticas é uma grande vantagem só como forma de utilizar este resíduo biológico muito comum em aquicultura, como também, essas plantas são ricas em N e P, que são nutrientes essenciais para o crescimento das microalgas. A partir de experimentos realizados em laboratório com *Eichhornia crassipes* no cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* e *Haematococcus pluvialis*, foi constatado que essa planta aquática é uma alternativa de grande importância no desenvolvimento destas clorophyceae em laboratório (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009; 2011; 2014; 2015a e b; 2017).

2.3 Condições de cultivo

As condições de cultivo são essenciais para moldar o perfil de crescimento de cada organismo. Diferentes meios de cultura, podem interferir na composição bioquímica da microalga e acabar alterando a taxa de crescimento (COVERTI et al., 2009; LIU et al., 2008).

Fatores ambientais como a temperatura, luz, pH, salinidade e estado nutritivo do meio de cultura, não só afetam a fotossíntese e produtividade das células algais, como também influenciam na atividade metabólica e na composição celular (GUSCHINA e HARWOOD, 2009).

De maneira expressiva a temperatura pode influenciar no cultivo e cada espécie possui um perfil de crescimento em uma determinada faixa de temperatura que influencia na biomassa e conteúdo de lipídeos totais (COVERTI et al., 2009). Um dos principais fatores responsáveis por regular as respostas morfológicas e fisiológicas das células é a temperatura (ZENG et al., 2011). Em qualquer sistema de cultivo é um parâmetro importante que deve ser monitorado diariamente, não só para o crescimento eficaz das microalgas, mas também para

promover o melhor metabolismo celular e a composição bioquímica adequada (JUNEJA et al., 2013).

A luminosidade atua como um dos principais fatores sobre o cultivo de microalgas em condições fototróficas, sua limitação pode ocasionar reduções no crescimento algal (ADESANYA et al., 2014). A temperatura é um parâmetro de grande importância que deve ser monitorado, não só para o crescimento eficaz de microalgas, mas também por promover o melhor metabolismo celular e a composição bioquímica adequada (JUNEJA et al., 2013).

Alguns estudos apresentam a possibilidade de manipular as propriedades lipídicas das células algais, otimizando as condições de cultivo (temperatura e intensidade de luz) ou características do meio de cultura (concentrações de nitrogênio, fosfato e ferro) (EMDAD e BERLAND 1989; ILLMAN et al., 2000; LIU et al., 2008).

A produção de microalgas apresentou um impulso após a segunda guerra mundial. No Japão na década de 60, houve elevada produção de *Chlorella vulgaris*, tendo como principal fonte a utilização na suplementação alimentar. A partir deste impulso no cultivo de microalgas, estas passaram a ser utilizadas como fonte de proteínas unicelulares, lipídios, clorofila, carotenóides, enzimas, agente oxidante, vitaminas, antibiótico, entre outros (BOROWITZKA, 1998; SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA, 2001; RICHMOND, 2004;)

Para o cultivo de microalgas ainda há muitos desafios dentre eles pode-se citar a minimização de contaminações; fornecimento eficiente de CO₂ e luz; controle das condições de cultivo; redução de capital de investimento e custos de produção; minimização da necessidade de espaço, entre outros (MARXEN et al., 2005). Altas intensidades de luz podem levar a fotoinibição e o inverso pode limitar a atividade fotossintética afetando a produção de biomassa. O nível de sensibilidade à luz varia de acordo com a espécie (CHISTI, 2008; LONG et al., 1994)

As condições adequadas de crescimento em sistema de cultivo, devem ser relativas às exigências intrínsecas da microalga cultivada, proporcionando nutrientes necessários para seu crescimento (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA, 2001). As microalgas apresentam inúmeras vitaminas essenciais como A, B1, B12 entre outras, o teor de vitamina em microalgas varia de espécie para espécie

e de acordo com técnicas de cultivo (AL HATTAB e GHALY, 2015). A produção em escala comercial de microalgas ainda é um grande desafio em função do alto custo de produção (NAYAK et al., 2016).

A viabilidade econômica da produção de microalgas, é de grande importância ressaltando os diferentes produtos que podem ser adquiridos a partir do cultivo, agregando estes valores ao produto final, tornando o custo de produção de biomassa algal um dos grandes problemas no cultivo em escala comercial (WANG et al., 2014).

O nitrogênio, fósforo e carbono são essenciais agindo de forma significativa no crescimento e metabolismo algal. Os nutrientes como magnésio e vários cátions (Mg^{+2} , K^{+} e Ca^{+2}) mostram decréscimo no crescimento de microalgas quando limitados no meio de cultura (DROOP, 1973).

Além dos macros e micronutrientes considerados essenciais, o uso de vitaminas complementa o meio e ajuda elevar a produção de biomassa, sendo essenciais para muitas espécies (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA, 2001, SIPAÚBA-TAVARES e BACHION, 2002).

O ferro, zinco, manganês, e o enxofre são indispensáveis para o crescimento das microalgas (GHAFARI et al., 2016). A maior parte do enxofre presente nas células ocorre como componente estrutural de proteínas, por meio de dois ácidos aminados sulfurados: cisteína e metionina. O enxofre ocorre na água do mar principalmente como íons sulfato, sendo este muito abundante. Por isso, o enxofre nunca é fator limitante ao desenvolvimento de microalgas principalmente as de origem marinhas. O magnésio é essencial às microalgas, sendo constituinte da molécula de clorofila e ocorre no núcleo da célula. O magnésio também está associado às várias enzimas, sendo um ativador de suas atividades. No caso de deficiência de Mg, gera o processo designado clorose, no qual as células perdem seu conteúdo pigmentar. O ferro é extremamente importante para as microalgas, participando de inúmeras funções, como: vias biossintéticas da clorofila e dos citocromos; respiração, transporte respiratório de elétrons; fotossíntese, transporte fotossintético de elétrons; redução de nitrato e de nitrito; redução de sulfato; fixação de nitrogênio molecular e; além desses exemplos, é cofator de diversas enzimas (LOURENÇO, 2006; RODEN e

ZACHARA, 1996). Micronutrientes como alguns metais traço também desempenham papéis-chave no transporte de elétrons (RAVEN et al., 1999)

2.4 *Ankistrodesmus gracilis*

O gênero *Ankistrodesmus* agrupa espécies de células raramente solitárias, geralmente reunidas em colônias sob a forma de tufo (menos organizados) ou de feixes frouxos (mais organizados). Não existe mucilagem para manter as células juntas, elas se torcem espiraladamente umas sobre as outras para formar o feixe. Esse gênero inclui onze espécies que já foram coletadas em quase todas as regiões do mundo, o que o caracteriza como um dos gêneros mais comuns em coletas de plâncton (BICUDO e MENEZES, 2006).

Ankistrodesmus gracilis (Figura 1) pertence à classe Chlorophyceae, conhecida como o maior grupo de algas possuindo uma elevada diversidade de espécies (cerca de 17.000). A microalga *A. gracilis* é de vida livre e vive principalmente em água doce, suas células são lunadas, fusiformes, algumas vezes mais longas que o próprio diâmetro. Possui um único cloroplasto que é parietal, localizado lateralmente na célula (BICUDO e MENEZES, 2006).

Possui a cor verde intenso por conta das clorofilas a e b que mascaram os carotenos e xantofilas (REYNOLDS, 1984). Esta microalga caracteriza-se por ser unicelular imóvel e não produz zoósporos (BOLD e WYNNE, 1985).

O uso de *Ankistrodesmus gracilis* em meio de cultura em larga escala (2L, 250L e 850L) vem se desenvolvendo de forma crescente, sendo uma espécie de fácil cultivo e resistente em diferentes meios de cultura (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA, 1993; 1994; 2001; SIPAÚBA-TAVARES et al., 1999; 2014; 2015; HARDY e CASTRO, 2000; SIPAÚBA-TAVARES e BACHION, 2002).

Em sistema de cultivo “indoor” esta microalga apresenta elevado valor nutricional (SIPAÚBA-TAVARES e PEREIRA, 2008). Sob diferentes maneiras de cultivo, foi registrado um valor de teor lipídico de 24 a 31 % da massa seca para esta microalga (MATA et al., 2010).

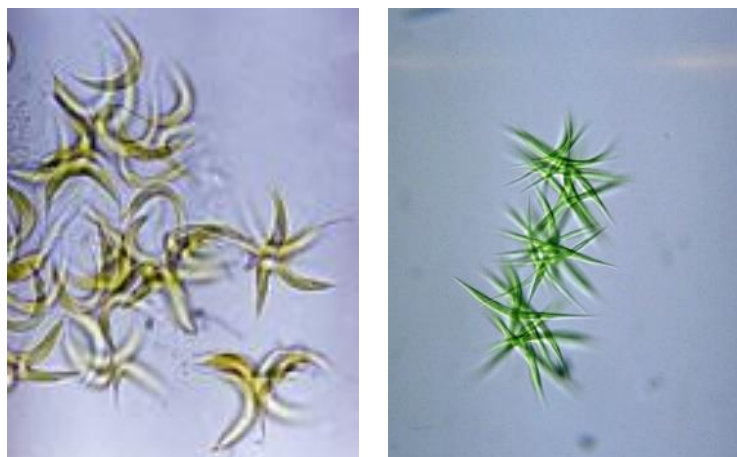


Figura 1 – Colônias de célula de microalga *Ankistrodesmus gracilis*

2.5 Macrófitas Aquáticas

As macrófitas aquáticas são definidas como vegetais visíveis a olho nu, com partes fotossintetizantes ativas e suas principais características são: acumular biomassa, acelerar a ciclagem de nutrientes, atuar como substrato para perífíton, sustentar a cadeia de detritos e herbívoros, e como fonte de oxigênio, alimento e abrigo para a vida aquática (MARCONDES et al., 2002).

As plantas aquáticas como produtoras primárias absorvem nutrientes do meio para incorporação à sua biomassa. Essas plantas servem de micro habitat para diversos microrganismos e macro invertebrados que utilizam sua raiz como habitat. Dessa forma as plantas e suas comunidades associadas atuam de forma conjunta e harmônica no metabolismo do ecossistema (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2015).

Um dos principais nutrientes necessários para o desenvolvimento das macrófitas são nitrogênio e fósforo. São elementos constituintes da biomassa das macrófitas e essenciais na composição de moléculas que atuam em processos metabólicos. O nitrogênio é importante constituinte de proteínas e o fósforo é constituinte de compostos celulares ligados ao armazenamento de energia da célula (ATP) ácidos nucleicos, fosfolipídios, nucleotídeos e fosfoproteínas (SALISBURY e ROSS 1992; LARCHER, 2000). A disponibilidade de nitrogênio e fósforo é considerada como um dos principais fatores que

controlam a ocorrência e a produção primária de macrófitas aquáticas (VAN et al., 1999).

Na aquicultura, as macrófitas aquáticas podem ser utilizadas como fertilizantes da água, aonde ocorre o aumento de organismos que participam da cadeia alimentar dos peixes (ESTEVES, 1998), ou como fonte alternativa de proteína. De acordo com a Declaração de Banguécoque, a utilização de plantas aquáticas como suplemento de alimentação em atividades da aquicultura deve ser intensificada mundialmente. No entanto, para melhor aproveitamento da biomassa das macrófitas é necessário conhecer as características da composição química (NACA/FAO, 2000).

Eichhornia crassipes, conhecida como aguapé (Figura 2) apresenta uma ampla capacidade de absorção de nutrientes, metais, sedimentos e, por esse motivo, é uma espécie considerada despoluidora de água (POTT e POTT, 2000). Com isso há vários estudos que apontam o uso dessa biomassa para a redução de nutrientes como fósforo e nitrogênio. (CHEN et al., 2010). Originada na América do Sul e sendo uma das plantas mais produtivas do mundo (ABOUL-ENEIN et al., 2011). É uma planta aquática invasiva, abundante em zonas húmidas. Apresenta grande significado ecológico em função de suas propriedades como um bio-filtro, e na capacidade de acumular metais pesados (CHIGBO et al., 1982) e seu potencial na produção de grande interesse biotecnológico (ABOUL-ENEIN et al., 2011).

Esta espécie pode ser manipulada em um ecossistema sustentável e ser usada na fitorremediação de água contaminada com metais pesados. (ALVARADO et al., 2008; SARASWAT, 2010; KASTURIARACHCHI, 2014; KOMY et al., 2013; BORKER et al., 2013). *Eichhornia crassipes*, chegando a alcançar uma produtividade de 150 toneladas/hectare/ano (WESTLAKE, 1963). Esta é uma das características que tornam as macrófitas aquáticas um grande potencial atrativo do ponto de vista econômico, pois o excesso de biomassa vegetal produzido pode ser aproveitado na produção de papel (MORTON, 1975), na alimentação de animais (MOOZHYYIL et al., 1986; CHIFAMBA, 1990; EL-SAYED, 1999), na produção de biogás (WOLVERTON e McDONALD, 1979) e atualmente na produção de microalgas (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009)



Figura 2- Imagens disponíveis em pefaf.org, nargir.ir, aphotoflora.

Eichhornia azurea (Swartz) Kunth, conhecida como dama do lago, é uma planta aquática enraizada, perene, com folhas submersas e emersas (Figura 2). É uma planta com ampla distribuição no Brasil, onde muitas vezes se manifesta como grandes tapetes flutuantes que impedem a navegação e outros usos dos recursos aquáticos. Sua reprodução ocorre por sementes e vegetativamente.



Figura 3- Imagens disponíveis em ufrgs e altervista.org.

Diversos táxons desta espécie estão espalhados como plantas daninhas ou ornamentais (BARRETT, 1978), fora dos limites de sua área nativa (ECKENWALDER e BARRET, 1986), provavelmente originária da região amazônica (CASTELLANOS, 1958). Sua reprodução é rápida e eficiente; sendo formadas até 5.000 sementes por indivíduo (ZETTLER e FREEMAN, 1972), podendo produzir até 1200 indivíduos por propagação vegetativa. Apresentando essa alta capacidade de propagação e densidade, *Eichhornia azurea* pode

reduzir a decomposição na concentração do oxigênio da água. (CUNHA-SANTINO et al., 2010).

Eichhornia azurea é encontrada em ambientes restritos e inundados, desde reservatórios naturais e artificiais do sul dos Estados Unidos até as regiões e ecossistemas do Brasil (Figura 3). Pode ser usada como fonte de alimento para capivaras, porcos e outros herbívoros, e também como habitat para muitos peixes, larvas de insetos, e desova de caramujo (POTT, 2001). Está macrófita aquática atinge valores elevados de biomassa, tornando-a fonte de material orgânico a ser decomposto, (DOS SANTOS, 2000), peixes (FRANCISCHINI et al., 2005; SILVA et al., 2010; LOPES et al., 2015); insetos (FURLAN, 2006; URSO-GUIMARÃES et al., 2014).

Em comparação com outras espécies de macrófitas, a *Eichhornia azurea* fornece uma grande diversidade de microhabitats para as comunidades de macroinvertebrados associadas (MORMUL et al., 2006), como também tem sido utilizada na decomposição de matéria orgânica em reservatórios tropicais (CUNHA SANTINO, 2010).

Pontederia cordata conhecida como orelha de veado (Figura 4), pertence à família Pontederiaceae. Esta família *apresenta* características parecidas entre seus gêneros, e com isso ocorre problemas na identificação de suas espécies. A família tem uma abrangência mundial, sendo dividida em quatro gêneros e aproximadamente 33 espécies (COOK, 1974).

Podendo ser encontrada em lugares rasos, e densos (LU e HUANG, 2012), esta espécie é bastante resistente no tratamento de diferentes tipos de efluentes, além de apresentar boa eficiência na remoção de matéria orgânica (RAMOS et al., 2009). Plantas aquáticas como *Pontederia cordata* são de grande importância para uma melhoria na qualidade das águas, uma vez que funcionam como biofiltros, podendo reter grande parte das partículas (SALATI et al., 2000; HAMMER, 1989). O uso desta macrófita no tratamento de efluentes de aquicultura ainda é recente. É de grande importância destacar que, apesar de diversos trabalhos que comprovaram a eficiência das plantas aquáticas, estudos sobre o uso da *P. cordata* ainda são escassos na aquicultura (ENNABILI et al., 1998; FARAHBAKHSHAZAD et al., 2000; TRAVAINI-LIMA e SIPAÚBA-TAVARES, 2012; TRAVAINI-LIMA et al., 2016).

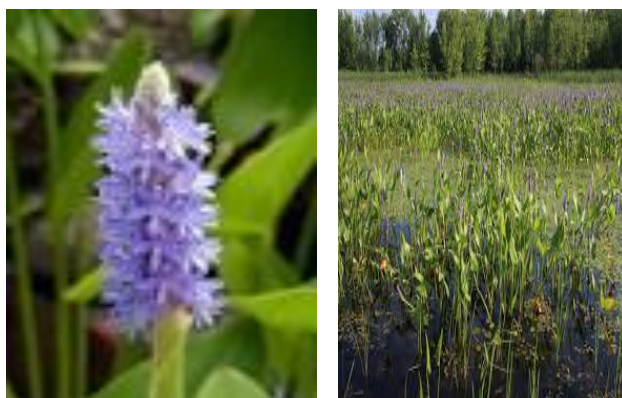


Figura 4- Imagens disponíveis em amc-nh.org e commons.org.

Conhecida como taboa *Typha domingensis* (Figura 5) é uma macrófita emergente e sua importância nos ecossistemas de áreas úmidas é devido à grande quantidade de matéria orgânica produzida por sua decomposição (THOMAZ e CUNHA, 2010). Essa macrófita está presente em povoamentos densos, ocorrendo em regiões pantanosas, margens da lagoa, lagos, rios e canais artificiais e pode ser encontrada em todo o território brasileiro (KISSMANN, 1997). Esta espécie foi introduzida na Austrália e América do Norte (AVH, 2013; CIOTIR et al., 2013) e é considerada invasiva em partes da América do Norte (GALATOWITSCH et al., 1999).

A *Typha domingensis* apresenta uma diversidade de nutrientes, sendo considerada benéfica para o ecossistema. Também apresenta uma capacidade elevada na remoção de fármacos e águas contaminadas (PARK et al., 2009; DORDIO et al., 2009b). É considerada dentre as macrófitas a que mais apresenta número de características na qual é necessário para ser uma planta invasora (NEWMAN et al., 1998). Em alguns casos, é considerada indesejável quando as condições são favoráveis para o seu crescimento, que de forma rápida se torna uma macrófita invasiva. Pioneira nos estudos de tratamento de águas residuárias, tem capacidade de remover cargas orgânicas até metais pesados e auxiliar no controle de erosão nas margens de canais (POTT; POTT, 2000).



Figura 5 – Imagens disponíveis em sciencedaily.com, pinterest.com e coocan.jp.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 Local do estudo

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton do Centro de Aquicultura, UNESP, Jaboticabal, SP. Os experimentos foram conduzidos no laboratório de cultivo de microalgas, que possui uma área total de 28,43 m² contendo uma sala de cultivo de larga escala, uma sala de assepsia e um cepário, no qual foram realizados os experimentos. (Figura 6).



Figura 6 – A: Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton, B: Sala de manuseio dos experimentos, C: Cepário, cultivo de microalga *A. gracilis*.

O cepário possui um sistema de cultivo sob condições artificiais de temperatura, aeração e iluminação. A temperatura é mantida entre $23 \pm 2^\circ\text{C}$ sob iluminação com lâmpadas fluorescentes, na intensidade de $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e

foto-período de 24h. A aeração é abastecida por um sistema artificial de compressores que permite diminuir o risco de contaminação das culturas.

3.2 Cepa de microalga

A microalga *A. gracilis* é proveniente da Universidade Federal de São Carlos; Ufscar, SP, linhagem n° 005CH, isolada da Represa do Broa (22°15'S e 47° 9'O) (SP, Brasil), posteriormente, cultivada em sistema estático não axênico com aeração constante.

3.3 Condições de cultivo e meio de cultura

Foram utilizados diferentes meios de cultura: O meio comercial CHU₁₂ preparado a base de vários reagentes químicos: Ca(NO₃)₂, K₂HPO₄, MgSO₄·7H₂O, KCl, NaCO₃, biotina e quatro meios contendo macrófitas: *Eichhornia crassipes*, *E. azurea*, *Pontederia cordata* e *Typha domingensis*, associadas ao fertilizante NPK (20:5:20) (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA, 1993) (Figura 7).

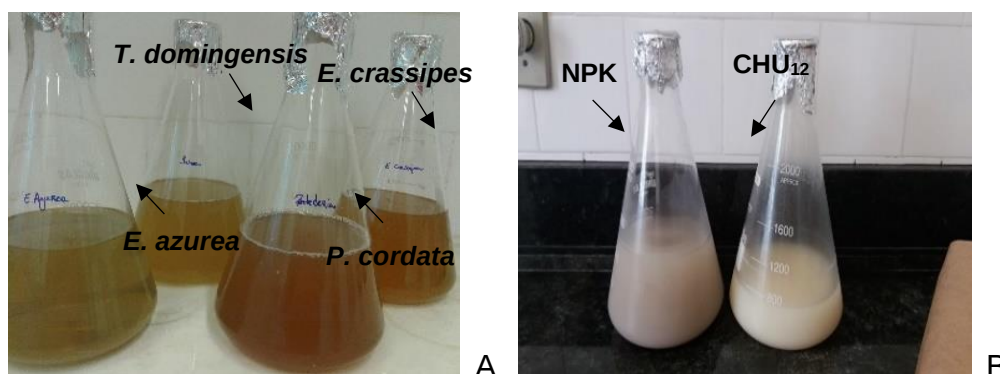


Figura 7 - A: Diferentes meios de cultura contendo macrófita aquáticas, B: Meios de cultura NPK e CHU₁₂.

O meio a base de fertilizante inorgânico NPK (20:5:20) (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA, 1993) foi associado com as quatro macrófita utilizadas neste estudo, cujo protocolo foi baseado no meio NPK com *Eichhornia crassipes* (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009). O meio comercial CHU₁₂ e o meio de fertilizante inorgânico NPK (20:5:20) (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA, 1993) foram utilizados como controle.

O meio NPK (20:5:20) é um fertilizante químico composto por uréia (fonte de nitrogênio), super-fosfato simples (fonte de fósforo) e sulfato de potássio (fonte de potássio). Para a manutenção do cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* em laboratório, cerca de 70 g de fertilizante químico NPK (20:5:20) foram pesados, posteriormente triturados, diluídos em 1,4L de água destilada e autoclavados a 120°C durante 20 minutos (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA, 2001).

Na Tabela 1 é mostrado as diferentes composições dos meios utilizados neste estudo.

TABELA 1 – Composição dos nutrientes nos diferentes meios de cultura NPK, CHU₁₂, *Eichhornia crassipes* (Ec), *E. azurea* (Ea), *Typha domingensis* (Td) e *Pontederia cordata* (Pc).

Contituíntes	Meio de cultura					
	NPK	CHU ₁₂	Ec	Ea	Td	Pc
P ₂ O ₅	2,5	-	-	-	-	-
K ₂ O	10	-	-	-	-	-
N	10	-	35,1	28,4	69,9	21,5
P	-	-	56,4	70,7	32,0	42,8
K	-	-	73,0	76,2	63,0	42,4
Ca	-	-	0,0369	0,0688	0,0431	0,0621
Mg	-	-	0,0023	0,0043	0,0027	0,0038
S	-	-	0,00003	0,00003	0,00040	0,00003
B	-	-	0,00034	0,00041	0,00053	0,00041
Cu	-	-	0,00018	0,00022	0,00028	0,00022
Fe	-	-	0,00006	0,00056	0,00073	0,00066
Zn			0,00003	0,00012	0,00038	0,00002
Tiamina	0,007	-	0,007	0,007	0,007	0,007
Vit B ₂	0,007	-	0,007	0,007	0,007	0,007
Vit B ₆	0,005	-	0,005	0,005	0,005	0,005
Vit B ₁₂ (µg.L ⁻¹)	33,0	-	33,0	33,0	33,0	33,0
Biotina (mg. L ⁻¹)	0,01	-	0,01	0,01	0,01	0,01
Ca(NO ₃) ₂	-	3,0	-	-	-	-
Na ₂ CO ₃	-	2,0	-	-	-	-
KCl	-	0,5	-	-	-	-
MgSO ₄ 7H ₂ O	-	7,5	-	-	-	-
K ₂ HPO ₄	-	0,5	-	-	-	-
FeCl ₃ 6H ₂ O	-	0,5	-	-	-	-

Fonte: Para a realização dos meios contendo macrófita a composição foi baseada em Sipaúba-Tavares et al. (2009).

Os meios de macrófitas foram preparados com as plantas aquáticas *Eichhornia crassipes*, *E. azurea*, *Typha domingensis* e *Pontederia cordata*. Cerca de cinco quilos de peso úmido passaram pelo procedimento de lavagem e secagem até peso seco constante, para isto as plantas ficaram expostas ao sol por 2 dias e depois foram levadas para a estufa à 60°C por 24 horas. Posteriormente, foram triturados em moinho manual para obtenção do pó, e após isto, esse material (pó) foi fervido em água destilada (1L) por uma hora. Posteriormente, foi filtrado e autoclavado a 120 °C durante 20 minutos (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009). Uma amostra de 70 mL do líquido de macrófita foram retirados e completados para 1400 mL de água destilada com 2,5 mL de NPK e 140 mL do inóculo da microalga *Ankistrodesmus gracilis*. Foi adicionado ao meio, vitamina de complexo B na proporção de 0,01gL⁻¹ (7mg – B₁; 7mg – B₂; 5mg – B₆; 33µg – B₁₂) mais vitamina H (0,01mg).

3.4 Período experimental

O experimento foi realizado em sistema estático e os parâmetros físicos e químicos foram mensurados periodicamente durante 28 dias, em tréplica. O inóculo utilizado para manutenção das culturas e os experimentos foram iniciados em frascos de 2L com densidade celular de 4x10⁵ cels.ml⁻¹ contendo o meio NPK (20:5:20). Quando as culturas alcançaram a fase exponencial foram transferidas para recipientes de vidro de 2L, contendo meio NPK (20:5:20) associados às diferentes espécies de macrófita (Figura 8 e 9).

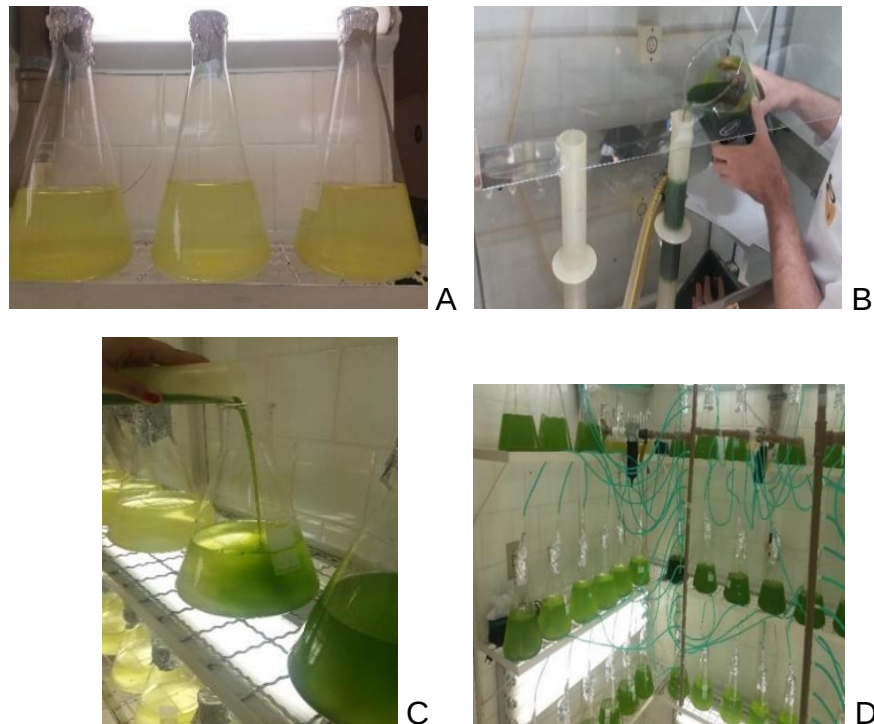


Figura 8 – Montagem do experimento: A - Vitamina do complexo (B); B - Microalga *Ankistrodesmus gracilis*; C - Adição da alga; D - Experimento montado.

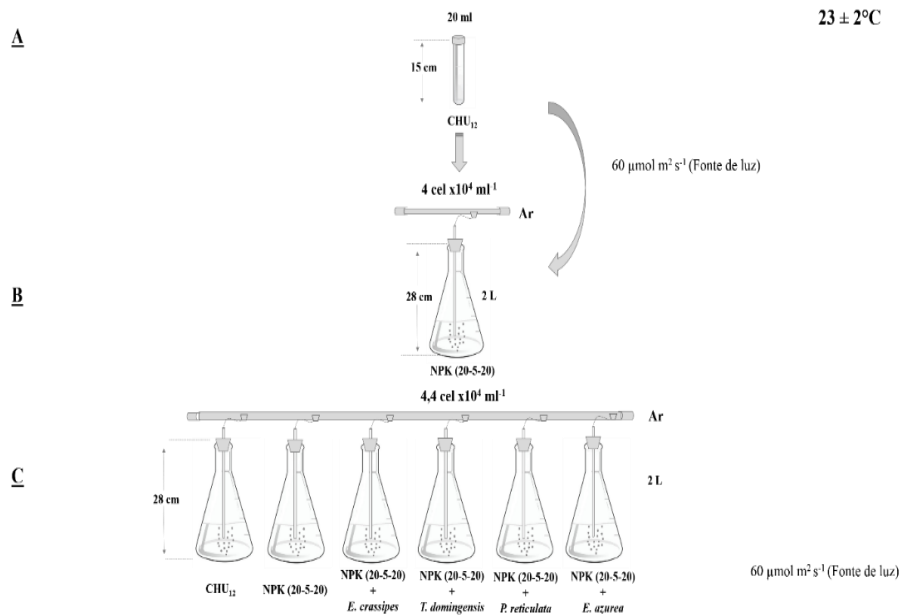


Figura 9. Diagrama esquemático do cultivo da microalga *Ankistrodesmus gracilis* em volume de 2L, onde: A = cepa; B = cultivo inicial em 2L somente em meio NPK (20:5:20); C = experimento em sistema fototrófico com fertilizante inorgânico (NPK) mais as plantas aquáticas *Eichhornia crassipes*, *E. azurea*, *Pontederia cordata*, *Typha domingensis*, meio CHU₁₂ e somente o fertilizante inorgânico (NPK 20:5:20).

As variáveis taxa de crescimento, parâmetros fisiológicos e métodos analíticos foram analisados semanalmente (1, 7, 14, 21 e 28 dias) durante o período de estudo (Figura 10).

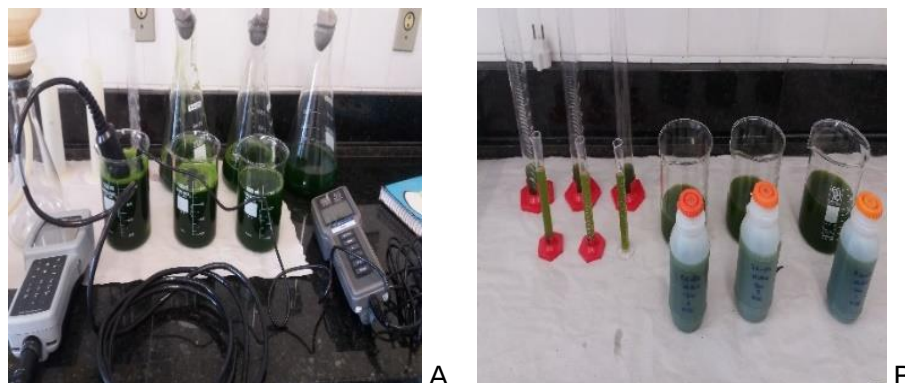


Figura 10 - A: Análise de parâmetros fisiológicos, B: Análise biológica do crescimento algal.

3.5 Métodos analíticos

Os parâmetros da qualidade do meio de cultura foram amostrados. Amônia, nitrito, nitrato e fósforo total foram quantificados espectrofotometricamente de acordo com a metodologia descrita em Koroleff (1976) e Golterman et al. (1978). A temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade do meio de cultura foram avaliados com uma sonda multiparâmetros YSI 556MPS. A biomassa da microalga foi concentrada em centrífuga, liofilizada, para análises de lipídio e proteína, seguindo a metodologia proposta por A.O.A.C (1990).

3.6 Crescimento

Alíquotas de 1 mL foram removidas nos diferentes meios testado, diariamente ao longo de 28 dias consecutivos. Amostras foram contadas em hemocítômetro de Neubauer (2x1 μL). Os valores obtidos através da contagem foram expressos em número de células $\text{mL}^{-1} \times 10^5$.

A taxa de crescimento e tempo de duplicação foram realizadas durante os dias de cultivo 1, 7, 14, 21, 28. A taxa de crescimento (k) representando as divisões por dia, foi obtida utilizando seguinte fórmula (GUILLARD, 1973):

$$k = (3.322/t_2 - t_1 \times \log N_2/N_1)$$

Onde:

t = tempo;

N = número de células e

t₂ – t₁ = diferença entre o tempo

O tempo de duplicação (Td) (tempo de divisão celular ou tempo de geração) foi calculado a partir dos resultados obtidos da taxa de crescimento, usando a fórmula:

$$T_d = 1/k-1$$

Onde Td = tempo de duplicação; 1/k-1 = divisão por dia (GUILLARD, 1973).

3.7 Dados biológicos

Para obtenção do peso seco (pg cel⁻¹) 10 mL dos diferentes meios de cultura foram coletados semanalmente e filtrados em filtro de fibra de vidro GF/C 0,7 mm de tamanho de poro. Posteriormente, os filtros foram secos em estufa a 60 °C. Após este processo, foi realizada a pesagem até peso constante. A determinação do conteúdo de cinzas (pg cel⁻¹) da microalga foi obtida pelo incineramento dos filtros em mufla a 500 °C, por 4 horas.

Para obtenção do comprimento total (µm) 50 indivíduos foram mensurados em microscópio (Leica modelo- DFC 295) com o sistema de análise de imagens Las Core (LAS V3.8), com ocular micrométrica, em um aumento de 40 vezes. O cálculo do volume celular foi obtido pelo tamanho médio celular com uso da fórmula geométrica correspondente a forma da célula (dois cones acoplados) de acordo com Vollenweider et al. (1974) e Bottrel et al. (1976). O carbono orgânico total foi calculado usando a regressão proposta por Rocha e Duncan (1985), C = 0,1204. V^{1,05}. Onde: C = teor de carbono em pg.célula⁻¹; V = volume celular.

3.8 Composição bioquímica

A biomassa algal de cada meio de cultura foi centrifugada e liofilizada (Figura 11), para análise de lipídio e proteína seguindo a metodologia proposta por A.O.A.C. (1990).

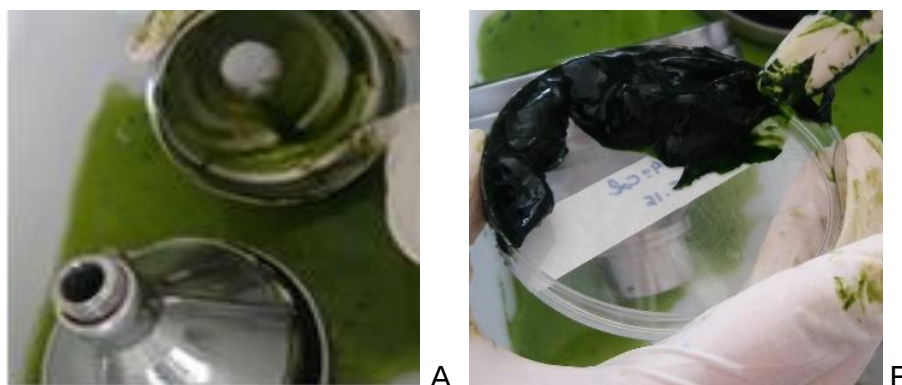


Figura 11 - A: Centrifugação da biomassa algal, B: Biomassa algal para posterior análise bioquímica (B)

3.9 Composição dos nutrientes das plantas aquáticas

Da biomassa seca utilizado para a composição dos diferentes meios de macrófita, cerca de 200g foi retirada e utilizada para a composição dos nutrientes das plantas segundo Bataglia et al (1983). Para análise foi verificado os nutrientes somente da planta (forma moída) e também do meio de cultura (forma líquida) sem microalga.

3.10 Extração de pigmento

Para a extração da clorofila-a foi realizada filtração e adicionado o etanol a 90% aquecido a 78°C. Posteriormente, as amostras foram submetidas a leitura no espectrofotômetro seguindo metodologia de Nusch (1980) (Figura 12).



Figura 12 - A: Filtração para a extração do pigmento, B: Amostras prontas para leitura, C: Espectrofotômetro Femto 700 Plus.

3.11 Análise estatística dos dados

Foi aplicada para obtenção dos dados ANOVA (one-way) para simples verificação entre meios de cultura utilizado (FOWLER et al., 1998). Diferenças foram consideradas a ser significativa na probabilidade de 5% ($p = 0,05$). Análise estatística foi realizada pelo software Statística versão 10.0 (STATSOFT, 2010).

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Variáveis biológicas

A curva de crescimento algal é de grande importância, uma vez que a fase exponencial é considerada o período ideal para fornecimento em forma de alimento aos organismos aquáticos, pois as células encontram-se em divisão celular com elevado número de indivíduos, tendo como produto final a produção de proteína (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA, 1993).

O crescimento de *Ankistrodesmus gracilis* nos diferentes meios de cultura apresentou melhores resultados para meio comercial NPK, aonde a densidade celular final foi de $398,4 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$ e de $261,4 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$, para o CHU₁₂. Dentre os meios com macrófitas, *Eichhornia crassipes* obteve maior densidade ($434,0 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$) seguida de *E. azurea*, ($319,7 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$), *Pontederia cordata* ($281,9 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$) e *Typha domingensis* ($223,5 \times 10^5 \text{ cel mL}^{-1}$) (Figura 13). Os meios de *E. crassipes*, *E. azurea* e *P. cordata* apresentam densidades celulares acima do meio comercial CHU₁₂.

O cultivo de microalgas é essencial para o crescimento de cada organismo. Diferentes meios de cultura, podem agir de uma forma não adequada

e acabar interferindo na composição bioquímica da microalga, podendo ocorrer alterações na taxa de crescimento (COVERTI et al., 2009; LIU et al., 2008).

Estudos realizados por EL Nabis (2012), evidenciaram diferenças significativas ($P < 0,05$) nas densidades celulares entre cinco diferentes meios de cultura. O meio com fertilizante agrícola apresentou maior valor $69 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ no 14º dia, a urea apresentou valor médio de $46 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$, o meio com sulfato de cálcio apresentou valor de $36 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$, o fertilizante inorgânico NPK (10:20:20) e o NPK (14:14:14) apresentaram menor densidade celular $14 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$ e $10 \times 10^6 \text{ cel mL}^{-1}$, respectivamente.

Sipaúba-Tavares et al., (2017) cultivando *Ankistrodesmus gracilis* em três diferentes meios de cultura, verificaram que até o 10º dia de crescimento, o fertilizante inorgânico NPK (20:5:20) foi o que apresentou a maior biomassa algal e a partir do 13º dia até o final do experimento, o meio comercial CHU₁₂ apresentou a maior densidade celular.

A intensidade luminosa é outro fator de impacto limitante no crescimento das microalgas, estimulando maior geração de biomassa (RICHMOND, 2004). Cada microalga possui uma preferência pela intensidade de luz, neste caso a *Ankistrodesmus gracilis* cultivada em meios alternativos como NPK (20:5:20) e macrófita (*Eichhornia crassipes*) apresenta uma preferência ao redor de $60 \mu \text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$ abaixo desta intensidade luminosa o crescimento tende a ser menor (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2015; SIPAÚBA-TAVARES et al., 2017).

Ankistrodesmus gracilis em meio de fertilizante inorgânico e *Eichhornia crassipes* cultivada em $40 \mu \text{mol.m}^{-2} \text{s}^{-1}$ apresentou uma densidade máxima de $25,5 \times 10^5 \text{ cls.mL}^{-1}$ (14º dia) e $24,2 \times 10^5 \text{ cls.mL}^{-1}$ (13º dia), respectivamente (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2015b).

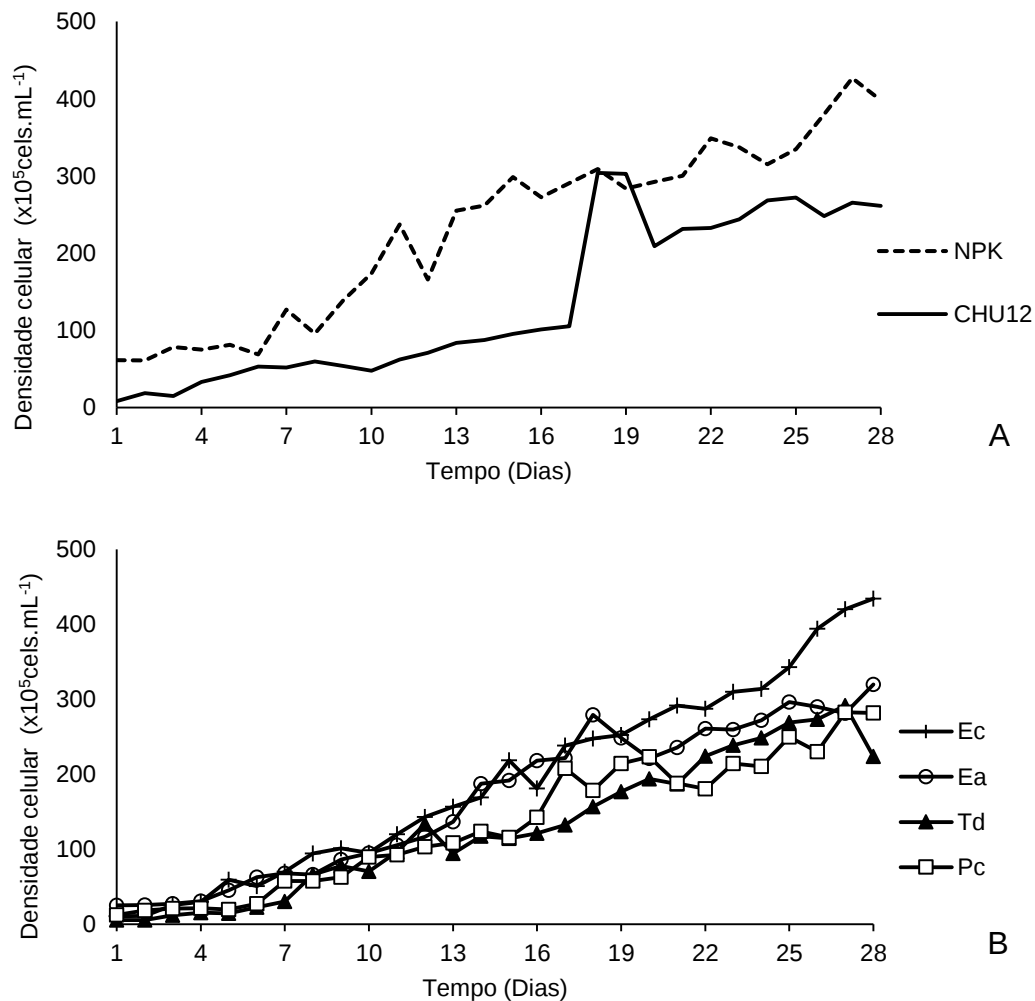


Figura 13 – Curva de crescimento de *Ankistrodesmus gracilis* durante o período experimental: A= meios comerciais CHU₁₂ e de fertilizante inorgânico NPK (20:5:20); B= meios de cultura a base macrófita + fertilizante inorgânico (20:5:20).

O maior tempo de duplicação para a *Ankistrodesmus gracilis* foi no meio NPK (9,28) e em relação a taxa de crescimento foi menor no meio NPK. Nos meios com macrófita, *Eichhornia crassipes* (K=0,20) e *Typha domingensis* (K=0,22) apresentaram as maiores taxas de crescimento, porém todos os meios de cultura foram inferiores ao meio comercial CHU₁₂ (K=0,31). O tempo de duplicação foi mais rápido no meio CHU₁₂ (3,27 dias) e mais lento no meio NPK (9,28 dias) (Tabela 2).

Tabela 2 – Taxa de crescimento e tempo de duplicação de *Ankistrodesmus gracilis* durante o período experimental.

Parâmetros	Meios de cultura					
	NPK	CHU12	Ec	Ea	Td	Pc
Taxa de crescimento (K)	0,11	0,31	0,2	0,14	0,22	0,17
Tempo de duplicação (dias)	9,28	3,27	5,02	7,36	4,75	5,74

O peso seco e teor de cinzas foram similares entre os meios de macrófita exceto para a *Pontederia cordata* que foi similar ao meio NPK. Para estes dois parâmetros analisados o meio comercial CHU₁₂ apresentou os maiores valores. O peso seco apresentou diferenças entre os meios de cultura ($p < 0,05$). Para o meio CHU₁₂ apresentou maior valor, sendo uma média de 673,4 pg cel⁻¹. Entre os meios alternativos o peso seco apresentou o menor valor médio NPK 267,6 pg cel⁻¹ (Tabela 3). Comparando esses resultados com Hardy e Castro (2000), utilizando esse mesmo meio de cultura NPK (20:5:20) para o cultivo de *Ankistrodesmus gracilis*, obtiveram resultado de peso seco inferiores (125,0 pg cel⁻¹) aos encontrados nesse trabalho.

Diversos fatores influenciam o volume celular das microalgas, dentre eles a temperatura (MARTÍNEZ et al., 2000), intensidade luminosa (CELEKLI e DONMEZ, 2006) e disponibilidade de nutrientes (LURLING, 2006).

Neste estudo o volume celular foi similar entre os meios de macrófita variando de $20,3 \pm 5 \mu\text{m}^3$ (*Eichhornia crassipes*) a $26,7 \pm 29,2 \mu\text{m}^3$ (*Typha dmingensis*), sendo similar entre os meios NPK e CHU₁₂ (Tabela 3).

Na produção em larga escala, muitas das microalgas apresentam grande eficiência, entretanto, a escolha de espécie envolve diversas questões como a velocidade de crescimento e sua composição bioquímica. As variáveis são influenciadas por diferentes fatores: meio de cultura utilizado, processo de cultivo, intensidade luminosa, temperatura, salinidade e fotoperíodo (BROWN et al., 1997).

Organismos da família Chlorophyceae são comumente utilizados em cultivos de larga escala e na alimentação de organismos aquáticos por terem como principal característica a parede celular mais fina, quando comparada com as diatomáceas. Assim, a quantidade de carbono orgânico total em relação ao

peso seco é maior (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA, 1993). O carbono constitui 40 a 60% da biomassa algal (FISCHER e ALFERMANN, 1995). Na avaliação da qualidade da microalga como alimento, este parâmetro é de grande importância (ROCHA e DUNCAN, 1985). O carbono orgânico total foi similar ($P<0,05$) entre os meios de macrófitas e mais elevado nos meios NPK e CHU₁₂. Tanto o comprimento total, volume celular e TOC apresentaram um padrão similar, com menores valores para os meios de macrófita e maiores nos meios NPK e CHU₁₂. (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores médios das variáveis bioquímicas e biológicas de *Ankistrodesmus gracilis* em relação aos diferentes meios de cultura.

Características	Meios de cultura					
	NPK	CHU ₁₂	Ec	Ea	Td	Pc
Comprimento total (µm)	18±2,5 ^a	15±2,7 ^{ab}	14,1±2,5 ^b	14,6±1,8 ^b	14,3±1,9 ^b	13,6±1,8 ^b
Volume celular (µm ³)	57±28 ^{ab}	68±35 ^a	20,3±5,0 ^c	22,2±6,9 ^c	22,7±3,07 ^c	26,7±29,2 ^c
TOC (pg cell ⁻¹)	8,5±4 ^{ab}	10±6 ^a	2,87±0,7 ^c	3,16±1,05 ^c	3,22±0,4 ^c	3,31±0,4 ^c
Peso seco (pg cell ⁻¹)	267,6±60,0 ^b	673,4±299 ^a	329,0±66,7 ^{ab}	441,6±69,2 ^{ab}	441,5±236 ^{ab}	576,8±226 ^b
Teor de cinzas (% peso seco)	3,06±0,67 ^b	6,8±2,04 ^a	4,8±1,31 ^{ab}	4,9±1,1 ^{ab}	3,4±2,2 ^{ab}	3,0±2,5 ^b

Os principais componentes das microalgas, tais como as proteínas, carboidratos, lipídios, dentre outros componentes com pigmentação, ácidos graxos e vitaminas (ZENG et al., 2011). As microalgas apresentam grande potencial para a produção elevada de lipídios e proteína, esse rendimento varia de espécie para espécie, podendo ser adaptada a certas estratégias de cultivo (EHIMEN et al., 2011; CASTRO et al., 2015). As proteínas apresentam os componentes mais abundantes em todas as espécies (BECKER, 2007).

Neste estudo, o teor de proteína para os diferentes meios de cultura esteve acima de 30% de peso seco sendo que para o NPK o valor médio foi de 46,7%, para o meio CHU₁₂ o valor médio foi de 45,6%, para o meio com *Eichhornia crassipes* o valor médio foi de 37,2%, e o para o meio *E. azurea* o valor médio foi de 35,5%, para a *Typha domingensis* e *Pontederia cordata* apresentaram

valores similares 30,0 e 30,6%, respectivamente, com as maiores porcentagens para o meio NPK ($P < 0,05$) variando de 30,0 a 46,7% de biomassa (Figura 14).

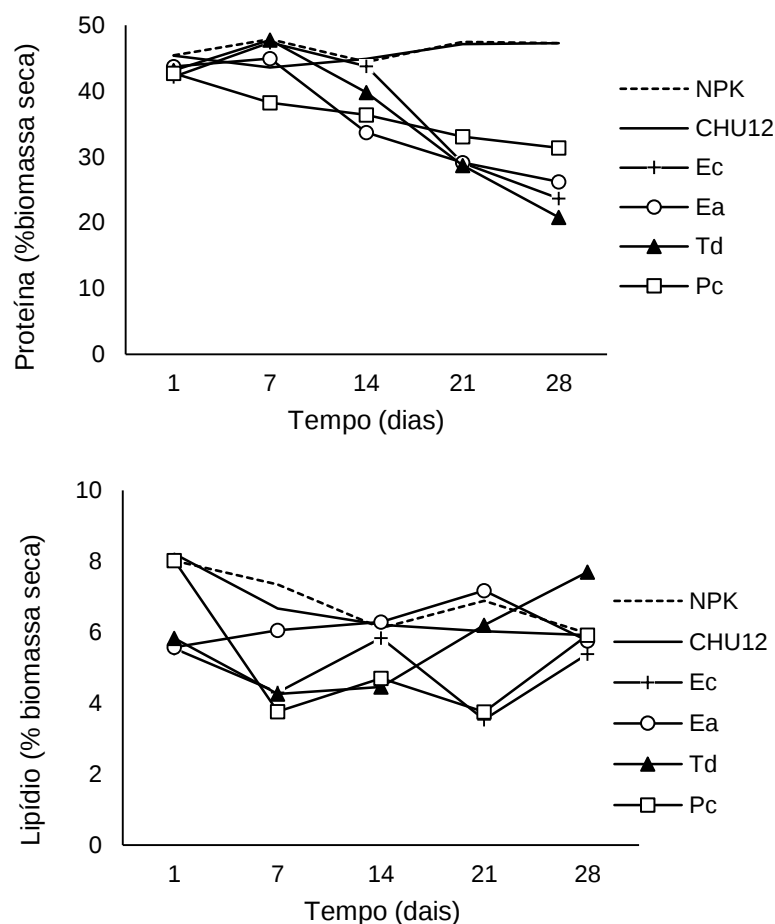


Figura 14 - Variação do teor de lipídio e proteína em relação aos diferentes meios de cultura.

Sipaúba-Tavares e Pereira (2008) trabalhando com *Ankistrodesmus gracilis* em meio NPK em tanques de 850 L com iluminação constante, obtiveram valores de proteínas de 47,3% de peso seco, similares aos encontrados neste trabalho. Matos et al. (2012) avaliando o cultivo de *Chlorella* sp. em meio de cultura à base de concentrado de dessalinização com objetivo de avaliar teor de proteína, obteve valor médio de 48,8%.

A média do conteúdo de lipídios das células das algas varia entre 1% a 70%, mas pode chegar a 90% do peso seco, sob certas condições (AMIN, 2009; MENG et al., 2009; MATA et al, 2010).

Cianobactérias dos gêneros *Anabaena* e *Oscillatorias*, apresentaram menor valor de de lipídio, com 2% e em *Arthospira* com 7%, com valor máximo sendo encontrado entre 75 – 85% de seu peso seco (BEHRENS et al., 1996). Dentre a ampla variedade da composição das microalgas, as espécies *Dunalliella tertiolecta* e *Nannochloris atumus* (Chlorophyceae) apresentam um conteúdo lipídico de 94-99%, enquanto *Tetraselmis suecica* (Prasinophyceae) apresenta maior valor em torno de 91,5% (BASOVA, 2005).

Sandefur et al. (2016) apresentaram baixo valor de lipídio para a microalga *Porphyridium cruentum* cultivada em esterco suíno 4,7%. Estudos evidenciam que o esterco suíno apresenta uma taxa de 1 a 14% de conteúdo lipídico por unidade de peso seco (ASGHARPOU et al., 2015). Já para *Chlorella* sp. cultivada em meio de cultura a base de concentrado de dessalinização apresentou valor maior comparado com cultivo em esterco suíno, 11,4% de lipídio (MATOS et al., 2012). Fioresi e Sipaúba-Tavares (2008) cultivando *Ankistrodesmus gracilis* com esterco suíno inatura e biodigerido em volume de 2L e 250L verificaram que em volume 2L os teores de lipídio foram maiores com 17% PS e 20% PS quando comparados ao maior volume com 7,5% e 8,5%, respectivamente.

Para o meio de CHU₁₂ o lipídio apresentou um valor médio de 6,87% de biomassa seca, para o meio NPK uma média de 6,61% de biomassa seca, para *Eichhornia azurea* uma média de 6,17% de biomassa seca, para a *Typha domingensis* uma média de 5,69% de biomassa seca, para a *Pontederia cordata* uma média de 5,20% de biomassa seca, para a *E. crassipes* uma média de 4,92% de biomassa seca. Foi observada diferença significativa entre os meios ($p < 0,05$). Os valores de lipídios foram superiores ao meio comercial quando comparado aos outros meios de cultura (Figura 14).

4.2 Variáveis Bioquímica

Microalgas apresentam maior taxa de crescimento quando a fonte de nitrogênio é a amônia mesmo em diferentes condições de intensidade de luz (RUCKERT e GIANI, 2004). A amônia não é a principal fonte de nitrogênio

preferida pelas microalgas, porém é a fonte mais eficiente, uma vez que é necessária energia para sua absorção. (TOCQUIN et al., 2012).

No cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* a amônia apresentou algumas variações nos diferentes tipos de meio de cultura. O meio contendo *Typha domingensis* e *Eichhornia azurea* apresentou valores menores, sendo 0,477 mg.L⁻¹ e 0,374 mg.L⁻¹, respectivamente. Para os meios de cultura CHU₁₂, *Pontederia cordata*, NPK e para *Eichhornia crassipes* os teores de amônia foram maiores 0,775 mg.L⁻¹, 0,920 mg.L⁻¹, 1,03 mg.L⁻¹, 1,23 mg.L⁻¹, respectivamente, apresentando (p<0,01) entre os meios de cultivo analisados (Figura 15).

A amônia é um composto nitrogenado e por essa razão é mais fácil de ser assimilado pelas microalgas. As clorofíceas podem remover até 97% da amônia contida no meio de cultura para o seu crescimento (WANG et al., 2012). A variação da assimilação da amônia vai depender da microalga e tipo de meio de cultura. Por exemplo *Chlorella vulgaris* cultivada em diferentes efluentes de suinocultura assimilou mais de 85% da amônia total contida no meio de cultivo (KUMAR et al., 2010). Já Charity et al. (2009) cultivaram a microalga *Scenedesmus* sp. em efluente de piscicultura e obtiveram uma redução de 94,44% na amônia total.

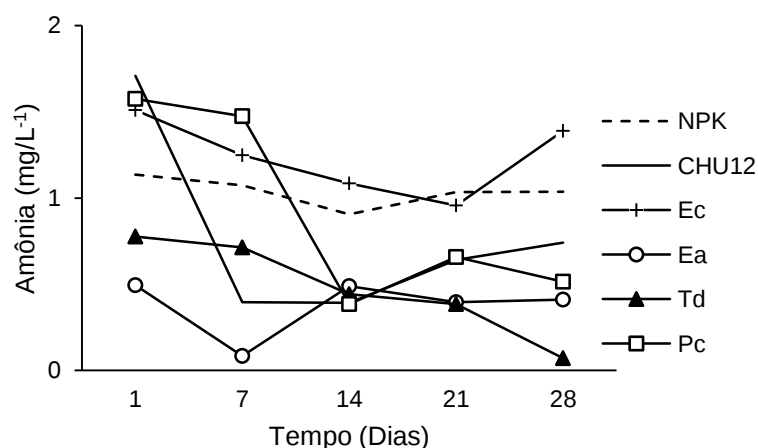


Figura 15 - Variação das concentrações de amônia nos diferentes meios de cultura.

Bertoldi et al., (2006) avaliaram o consumo de nitrato pela microalga *Chlorella vulgaris* em diferentes soluções hidropônicas, constataram taxa de remoção entre 80% e 87% de nitrato. A assimilação de nitrato pela microalga necessita de um maior consumo de energia pela célula, o nitrato não consumido é reduzido a nitrito e amônia (HERRERO et al., 2001). Estudos de Li et al. (2011) e Shen (2010), apresentaram uma desaceleração da taxa de crescimento diário em cultivos de *Chlorella* sp., à medida que ocorreu o consumo dos nutrientes, principalmente nitratos e fosfatos, essenciais para o crescimento das algas.

Ao longo do experimento foi observado uma redução de nitrato, principalmente a partir do 14º dia. Em relação aos compostos nitrogenados, o nitrato foi o mais consumido por *Ankistrodesmus gracilis* evidenciando a importância deste composto para a microalga. A amônia é assimilada preferencialmente pela maioria das microalgas, sendo uma das principais fontes de nitrogênio, em cultivos de larga escala é usada por apresentar baixo custo (XIA et al., 2013), apresenta estabilidade no pH, pode ser utilizado em elevadas concentrações que não interfere no crescimento, induz rápido crescimento e controla a contaminação por bactéria (DAVIS et al., 1953).

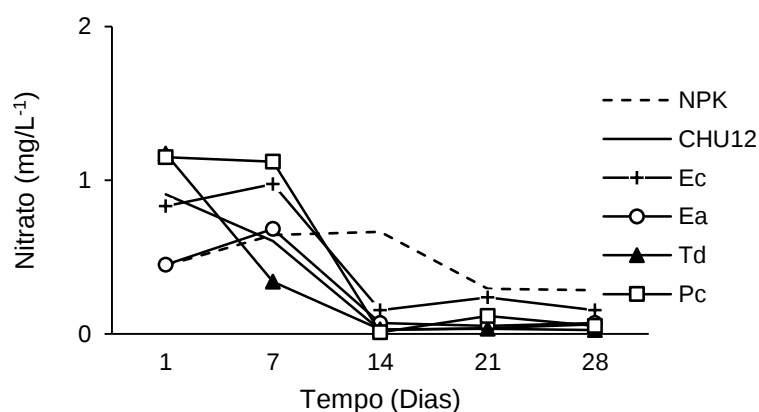


Figura 16 - Variação das concentrações de nitrato nos diferentes meios de cultura

Em relação ao nitrito as concentrações em geral ficaram abaixo de 0,5 mg.L⁻¹ exceto nos meios NPK e *Eichhornia crassipes* que no 14º dia e 21º dia apresentaram um pico 0,079 mg L⁻¹ e 0,085 mg L⁻¹, respectivamente (Figura 17).

Estudos tem evidenciado que as concentrações de nitrito, podem provocar a inibição do crescimento algal (ABE et al., 2002; YANG et al., 2004).

Abe et al. (2002) obtiveram 22% de remoção de nitrito utilizando a microalga *Trentepohlia aurea*, valor considerado inferior aos três meios de cultura do presente trabalho. Samori et al. (2013) apresentaram uma redução nesse nutriente em quase 100% em apenas três dias de cultivo da microalga *Desmodesmus communis* em um efluente de estação de tratamento urbano, evidenciando resultados semelhante na redução deste composto utilizando efluente de camarão.

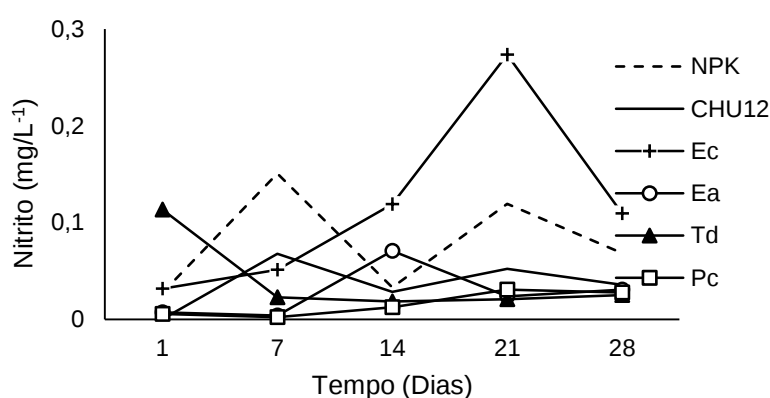


Figura 17 – Variação das concentrações de nitrito nos diferentes meios de cultura

Os valores de fósforo (Figura 18) para os diferentes meios de cultura foram considerados elevados. Sipaúba-Tavares et al. (2015) obteve altos teores de nitrogênio e fósforo para a microalga *Haematococcus pluvialis*, sendo considerado nutrientes essenciais para cultivo. Cultivos com a microalga *Scenedesmus obliquus* e a Cianobacteria *Microcystis aeruginosa* apresentou um valor de 1, 4 a 10 mg L⁻¹ de fósforo, com o aumento do fósforo. A clorofila - a também obteve uma variação (CHEN et al., 2011).

O meio de cultura com *Typha domingensis* apresentou valor de fósforo 1,8 mg.L⁻¹, evidenciando alta disponibilidade deste nutriente no meio. O teor de fósforo nos meios *Eichhornia azurea*, NPK e *Pontederia cordata* apresentou valores médios com 1,7 mg.L⁻¹, 1,6 mg.L⁻¹ e 1,5 mg.L⁻¹, respectivamente. Nos meios de cultivo com *E. crassipes* e o CHU₁₂ os teores foram mais baixos 1,2 mg

L^{-1} e $1,05 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Para o fósforo foram observadas diferenças significativas ($p < 0,01$) entre os meios de cultura.

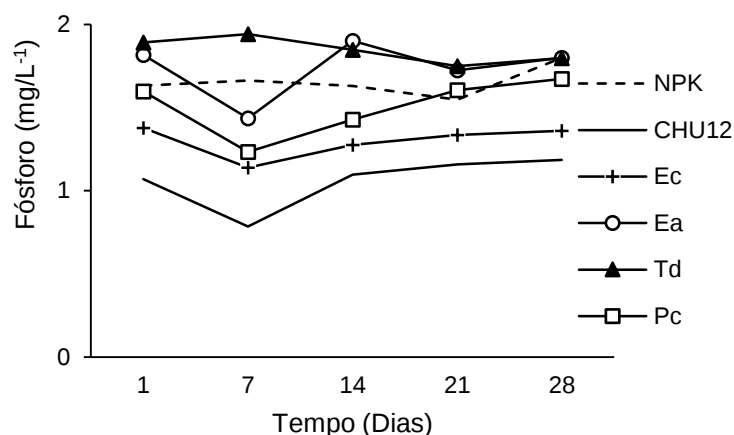


Figura 18 - Variação das concentrações de fósforo nos diferentes meios de cultura

Os teores de nitrogênio e fósforo estão relacionados como os principais fatores que influem no crescimento e estrutura da comunidade de microalgas, ligadas à acumulação da biomassa (AZIM et al., 2004). O nitrogênio é um elemento essencial para o desenvolvimento no crescimento das microalgas, reprodução e outras atividades metabólicas (WANG et al., 2013). O fósforo apresenta vários elementos estruturais e necessários para o crescimento e desenvolvimento das microalgas, sendo incluso na forma de ortofosfato e polifosfatos, apresentando 1% da biomassa seca (HU et al., 2004; HEALEY et al., 1982). Por exemplo, culturas da microalga verde *Scenedesmus obliquus* e da Cianobacteria *Microcystis aeruginosa* cultivadas na presença de 1, 4 ou 10 mg/L^{-1} de fósforo, o teor de clorofila aumentou na medida em que o nível de fósforo aumentou (CHEN et al., 2011). O fósforo é um componente indispensável para o cultivo de microalgas na forma de fosfato ou fosfato de hidrogênio, exercendo importante papel nos processos metabólicos das microalgas, como a conversão de energia e fotossíntese (JUNYING et al., 2013).

A clorofila-a é um pigmento encontrado nos organismos fotossintéticos oxigenados, como as plantas, algas e Cianobacteria. É de grande importância na fotossíntese, pois absorve e transfere energia luminosa (CHEN, 2015). Por exemplo, quando *Chlorella* sp. e *Monoraphidium dybowskii* cultivados sob três

intensidades de luz diferentes (40, 200 e 400 μmol), uma redução na produção de clorofila foi encontrada em um aumento na intensidade da luz (HE et al., 2015). Além disso, *Scenedesmus dimorphus* cultivada durante 14 dias sob baixa intensidade de luz (16,91 μmol) apresentou um aumento de 128% no seu conteúdo intracelular de clorofila em comparação com as condições de controle (123,47 μmol). Com isso a alta produtividade de clorofila não foi alcançada devido à baixa densidade celular (FERREIRA et al., 2016). Também apresenta grandes aplicações no campo biotecnológico (TIMBERLAKE e HENRY 1986).

A produção de clorofila-a partir do cultivo de microalga pode ser modulada pela alteração das condições da cultura, não só pela espécie mas também pelas condições de cultivo (ENCARNAÇÃO et al. 2012). Sendo usada como um indicador de biomassa a clorofila - a está presente na maioria das algas, podendo ser medida de forma indireta na concentração indicada (CLARKE et al. 2006).

As concentrações de clorofila-a apresentaram maiores valores para o meio de cultura com *Pontederia cordata* (1.861,4 mg L⁻¹), *Eichhornia azurea* (1.578,1 mg L⁻¹), NPK (1.552,7 mg L⁻¹) e para a *E. crassipes* (1.289,1 mg L⁻¹), já para o meio de cultura com *Typha domingensis* e o CHU12 as médias foram 799,4 mg L⁻¹ e 697,0 mg L⁻¹, respectivamente (Figura 19).

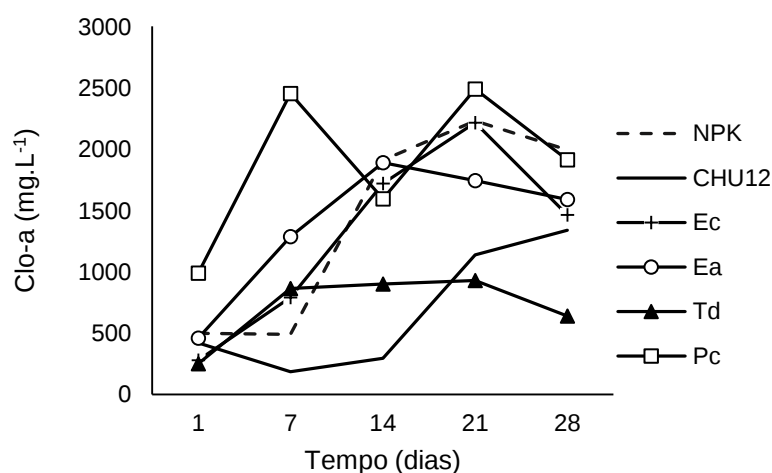


Figura 19 - Variação da concentração de Clorofila - a nos diferentes meios de cultura.

O uso de fertilizantes inorgânico NPK (20:5:20) como meio de cultura, apresenta resultados satisfatórios para a produção de *Ankistrodesmus gracilis*, obtendo altas densidades e baixo custo de produção em um curto espaço de

tempo, quando comparados ao meio tradicional CHU₁₂. O NPK apresenta teores de N e P maiores que outros meios de cultura utilizado (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA, 1993; SIPAÚBA-TAVARES et al., 1999)

No meio NPK os valores de oxigênio foram maiores comparando com os outros meios testados, com média de 8,74 mg L⁻¹ para a NPK, 7,52 mg L⁻¹ para a *E. azurea* 7,7 mg L⁻¹ e 7,4 mg L⁻¹ para o CHU₁₂. O menor valor apresentado foi para a *Pontederia cordata* e para *Typha domingensis* com 6,8 mg.L⁻¹ e 6,3 mg.L⁻¹, respectivamente (Tabela 4).

No cultivo de microalgas a oxigenação do meio de cultura é um dos principais fatores, pois promove o movimento das células evitando a sedimentação e com isso a taxa de crescimento, diminuindo a biomassa algal (JACOB et al., 2012).

Em geral o pH nos diferentes meios de cultura foi alcalino exceto para o meio de *Pontederia cordata* (Tabela 4). Grande parte das espécies de microalgas possuem desenvolvimento adequado em pH neutro, porém algumas espécies podem se desenvolver melhor em condições ácidas ou alcalinas (ZENG et al., 2011).

Variações foram observadas na condutividade elétrica quando comparados o meio com fertilizante inorgânico NPK e os outros meios de cultura. O meio NPK apresentou maior valor sendo 1.608,87 µS cm⁻¹, seguido do meio comercial CHU₁₂ com média 637,35 µS cm⁻¹; *Eichhornia crassipes* com 655,9 µS cm⁻¹; *Eichhornia azurea* 427,2 µS cm⁻¹, *Typha domingensis* e a *Pontederia cordata* apresentaram os menores valores de condutividade elétrica, 302,7 µS cm⁻¹ e 294,8 µS cm⁻¹, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Variáveis do meio de cultura durante a fase experimental.

Variáveis	Variáveis do meio de cultura					
	NPK	CHU12	Ec	Ea	Td	Pc
Oxig. dissolvido (mg.L ⁻¹)	8,74±0,33 ^a	7,43±0,31 ^{bc}	7,26±0,22 ^{bc}	7,77±0,80 ^b	6,30±0,49 ^{cd}	6,84±0,31 ^d
pH	8,65±0,35 ^a	8,56±2,29 ^a	9,38±1,86 ^a	7,67±1,88 ^a	8,79±1,35 ^a	6,89±1,33 ^a
Cond. elétrica (µS.cm ⁻¹)	1.608,8±117,4 ^a	637,3±758 ^b	655,9±101,0 ^b	427,2±142,4 ^c	302,7±40,7 ^c	294,8±56,5 ^c

4.3 Análise de macro e micronutrientes das macrófitas aquáticas

Alguns elementos são de grande importância para o crescimento e desenvolvimento das microalgas, tais como carbono (C), oxigênio (O), hidrogênio (H), nitrogênio (N), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), ferro (Fe), enxofre (S), fósforo (P) e elementos traços (JUNYING et al., 2013, SIPAÚBA TAVARES e ROCHA, 2001).

Na biomassa das plantas o Ca, P, Mg, S, Cu, Fe e Zn apresentaram resultados similares. Já o N no meio de cultura com *Eichhornia crassipes* foi maior 23,8 g.Kg⁻¹ em relação as demais macrófitas que apresentaram uma média de 10,8 g.Kg⁻¹. O K apresentou uma média de 18,58 g.Kg⁻¹ para as plantas aquáticas, exceto *Pontederia cordata* que apresentou valor de 6,5 g.Kg⁻¹

No meio líquido o P, K, Ca, S, B, Cu, Fe, Zn, foram similares para as quatro plantas. O Mg apresentou valores consideráveis exceto para a *E. azurea*, que apresentou um valor de 0,0043 mg.L⁻¹. O nitrogênio apresentou valor diferenciado para *Typha domingensis* (66,9 mg.L⁻¹) e para a demais macrófitas uma média de 28,3 mg.L⁻¹. O P para *Eichhornia azurea* 70,7 mg.L⁻¹ apresentou maior valor do que para as demais plantas que foi uma média de 43,7 mg.L⁻¹ (Tabela 5).

Os fatores bioquímicos das microalgas estão relacionados à vários processos que interferem na absorção e assimilação de nutrientes. Quando o meio possui limitação de nitrogênio, a microalga reage de forma direta aumentando os teores de lipídeos ou carboidratos e consequentemente, aumentando a síntese de proteínas (ILLMAN et al., 2000; RICHMOND, 2004).

O teor de fósforo para as microalgas pode apresentar diferentes respostas no cultivo de componentes celulares. Para *Ankistrodesmus falcatus* a limitação deste nutriente aumenta a produção de lipídeos e carboidratos, diminuindo a síntese de proteínas (KILHAM et al. 1997).

Tabela 5. Análise de macro e micronutrientes na forma moída(M) e na forma líquida(L) das macrófita utilizadas como meio de cultivo.

Nutrientes (g.L ⁻¹)	Macrófitas							
	<i>E.crassipes</i>		<i>E.azurea</i>		<i>T.domingensis</i>		<i>P.cordata</i>	
	M	L	M	L	M	L	M	L
N	23,8	35,1	9,8	28,4	12,4	66,9	10,4	21,5
P	3,3	56,4	1,8	70,7	2,0	32,0	1,8	42,8
K	24,2	73,0	14,1	76,2	17,2	63,0	6,5	42,4
Ca	7,0	0,0369	7,2	0,0688	5,4	0,0431	5,7	0,0621
Mg	3,2	0,0023	2,7	0,0043	1,8	0,0027	1,1	0,0038
S	3,8	0,00003	0,9	0,00003	0,7	0,00040	4,4	0,00003
B	14,1	0,00034	31,9	0,00041	19,9	0,00053	13,8	0,00041
Cu	23,3	0,00018	4,1	0,00022	5,3	0,00028	53,4	0,00022
Fe	3019,1	0,00006	2683,2	0,00056	2269,4	0,00073	3312,7	0,00066
Zn	106,6	0,00003	100,6	0,00012	59,5	0,00038	84,9	0,00002

O desenvolvimento da biomassa da microalga depende da presença de vários macros e micronutrientes. No grupo dos macronutrientes destacam-se elementos como N, P e K e uma fonte de carbono inorgânico. No grupo dos micronutrientes destacam-se Fe, Cu, Zn e o B (KHOO et al., 2011).

Os micronutrientes em concentrações baixas e quando em excesso podem não ser benéfico no meio de cultura. Por exemplo, o molibdênio (Mo) é necessário para a assimilação do nitrogênio. O cobalto é usado pelas microalgas que sintetizam vitamina B₁₂. Podendo ser adicionado outras vitaminas, tais como a tiamina e a biotina (SOARES, 2000; LOURENÇO, 2006). Uma grande carga de (Fe) é responsável por aumentar consideravelmente os teores lipídicos em *Chlorella vulgaris* (LIU et al., 2008). O Ferro (Fe) para as macrófitas apresenta uma média de 2.821,5 g.Kg⁻¹ sendo essencial para o metabolismo do Nitrogênio, fotossíntese e na síntese de citocromos (SOARES, 2000).

CONCLUSÃO

O meio comercial CHU₁₂ apresenta todos os macro e micronutrientes necessários para o desenvolvimento e crescimento de *Ankistrodesmus gracilis*, mas de uma forma geral tanto o fertilizante inorgânico quanto as macrófitas mostraram bom desempenho para *A. gracilis*, apresentando os fatores fisiológicos similares ao meio comercial, principalmente em relação à taxa de crescimento, tempo de duplicação, teor de proteína e lipídio. Em relação ao P e à clorofila-a os meios alternativos foram superiores ao comercial.

Os resultados evidenciaram que as macrófitas podem ser utilizadas como meio de cultura para *Ankistrodesmus gracilis*, sendo *Eichhornia crassipes* e *Typha domingensis* com melhores resultados para taxa de crescimento e tempo de duplicação e *E. crassipes* e *E. azurea* com os melhores teores de proteína e lipídio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- ABE, K., IMAMAKI, A., HIRANO, M. Removal of nitrate, nitrite, ammonium and phosphate ions from water by the aerial microalga *Trentepohlia aurea*. **Journal of Applied Phycology**, v.14 p.129-134, 2002.
- ABOUL-ENEIN, A. M., AL-ABD, A. M., SHALABY, E. A., ABULELA, F., NASR-ALLAH, A. A., MAHMOUD, A. M., ELSHEMY, H. A. *Eichhornia crassipes* (Mart) solms From water parasite to potential medicinal remedy. **Plant Signaling & Behavior**, v.6 p.1-3, 2011.
- ADESANYA, V. O., DAVEY M. P., SCOTT S. A., SMITH A. G. kinetic modelling of growth and storage molecule production in microalgae under mixotrophic and autotrophic conditions. **Bioresource Technology**, n.157 p.93-304, 2014.
- AL HATTAB, M., GHALY, A. Production of biodiesel from marine and freshwater microalgae. A review. **Microalgae**, v. 14 p.18, 2015.
- ALVARADO, S., GUÉDEZ, M., LUÉ-MERÚ, M. P., NELSON, G., ALVARO, A., JESÚS, A. C., GYULA, Z. Arsenic removal from waters by bioremediation with the aquatic plants Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and Lesser Duckweed (*Lemna minor*). **Bioresource Technology**, v.99 n.17 p.8436-8440, 2008.
- AMIN, S. Review on biofuel and gas production process from microalgae. **Energy Conversion and Management**, v. 50 p.1834-1840, 2009.
- ANDRADE, M. R., COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciência e Agrotecnologia**, n.32 p.1551-1556, 2008.
- ASGHORPOU, M., RODGERS, B., HESTEKEN, J. A. Eicosapentaenoic acid from *Porphyidium cruentum* of microalgae for pharmaceutical products. **Energies**, v.8 n.9 p. 1487-1508, 2015.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C.). **Official methods of analysis**. 15th, ed, DC, 1990.

AVH: Australia's Virtual Herbarium, Accessed on August 12, 2013.

AZIM, M. E., RAHAMAN, M. M., WAHAB, M. A., ASAEDA, T., LITTLE, D. C., VERDEGEM, M. C. J. Periphyton based pond polyculture system: a bioeconomic comparison of on-farm and on-station trials. **Aquaculture**, v.242 p.381-396, 2004.

BAHADAR, A., BILAL KHAN, M. Progress in energy from microalgae: a review. *Renew. Sustain. Energy Rev*, v.27 p.128-148, 2013.

BARRETT, S. C. H. Floral biology of *Eichhornia azurea* (Swartz) Kunth (Pontederiaceae). **Aquatic Botany**, v.5 p.217-228, 1978.

BASOVA, M. M. Fatty acid composition of lipids in microalgae. **International Journal on Algae**, v.7 n.1 p.33, 2005.

BATAGLIA, O. C., FURLANI, A. M. C., TEIXEIRA, J. P. F., FURLANI, P. R., GALLO, J. R. Chemical analysis methods for plants, **Boletim Técnico**. Instituto agrônômico, v. 78 p.43, 1983.

BAUMGARTNER, T. R. S. Cultivo e extração de óleo das microalgas *Scenedesmus sp.* e *Spirulina sp.* para a síntese de ésteres visando à produção de biodiesel. **PEQ/UEM**, p.124, 2011.

BEARDALL, J., YOUNG, E. E., ROBERTS, S. Approaches for determining phytoplankton nutrient limitation. **Aquatic Sciences**, v.63 p.44 –69, 2001.

BECKER, E. W. Microalgae, **Biotechnology and Microbiology**, Cambridge University Press. p.293, 1994.

BECKER, E.W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**, n.25 p.207-210, 2007.

BEHRENS, P. W., KYLE, D. J. Microalgae as source of fatty acids. **Journal of Food Lipids**, v.3 p.259, 1996.

BENELHADJ, S., GHARSALLAOUI, A., DEGRAEVE, P., ATTIA, H., GHORBEL, D. Effect of pH on the functional properties of *Arthrospira (Spirulina) platensis* protein isolate. **Food Chemistry**, n.194 p.1056-1063, 2016.

BERTOLDI, F. C. Lipids, fatty acids composition and carotenoids of *Chlorella vulgaris* cultivated in hydroponic wastewater. **Grasas y Aceites**, n.57 p.270-274, 2006.

- BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil: chave para identificação e descrições. **Rima**, p.502, 2006.
- BOLD, H. C., WYNNE, M. J. Introduction to the Algae. Structure and Reproduction. Englewood Cliffs. **Prentice-Hall**, p.720, 1985.
- BORKER, A. R., MANE, A. V., SARATALE, G. D., PATHADE, G. R. Phytoremediation potential of Eichhornia crassipes for the treatment of cadmium in relation with biochemical and water parameters. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v.25 n.6 p.443-456, 2013.
- BOROWITZKA, M. A. LIMITS TO GROWTH. *IN*: YS WONG & NFY TAM (EDS) WASTEWATER TREATMENT WITH ALGAE. **SPRINGER-VERLAG**, p.203-226, 1998.
- BOTTREL, H. H.; DUNCAN, A.; GLIWICZ, Z. M.; GRYGIEREK, E.; HERZIG, A.; HILLBRICH-ILKOWSKA, A.; KURASAWA, H.; LARSSON, P.; WEGLENSKA, T. A. Review of problems in zooplankton production studies. **Norwegian Journal of Zoology**, v.24 n.1 p.419-456, 1976.
- BROWN, M. R.; JEFREY, S. W.; VOLKMAN, J. K.; DUNSTAN, G. A. Nutricional properties of microalgae for mariculture. **Aquaculture**, v.151 n.1- 4 p.315-331, 1997.
- CASTELLANOS, A. Las pontederiaceae de Brasil. **Arquivos do Jardim Botânico**, v.16 p.149-217, 1958.
- CASTRO Y.A., ELLIS J.T., MILLER C.D., SIMS R.C. Optimization of wastewater microalgae saccharification using dilute acid hydrolysis for acetone, butanol, and ethanol fermentation, **Appl. Energy** v.140 p.14-19, 2015.
- CELEKLI, A.; DONMEZ, G. Effect of pH, light, intensity, salt and nitrogen concentration on growth and β -carotene accumulation by a new isolate of Dunaliella sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.22 n.2 p. 183-189, 2006.
- CHARITY, E. A. R., ALEXANDRA, L. V. B., CARMEN, H. C. L., EVER, D. M. A. Biomass production of microalga Scenedesmus sp. with wastewater from fishery. **Revista Tecnica de la Facultad de Ingenieria Universidad del Zulia**. v.32 n.2 p.126 - 134, 2009.

CHEN, M. L. I. A cyanobacterium that contains chlorophyll f-a red-absorbing photopigment. **FEBS Lett** v.586 p.3249-3254, 2015.

CHEN, M., LI, J., DAI, X., SUN, Y., CHEN, F., Effect of phosphorus and temperature on chlorophyll a contents and cell sizes of *Scenedesmus obliquus* and *Microcystis aeruginosa*. **Limnology**, v.12 p.187-192, 2011.

CHEN, X.; CHEN, X.; WAN, X.; WENG, B.; HUANG, Q.; Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) waste as an adsorbent for phosphorus removal from swine wastewater. **Bioresource Technology**; v.101 p.9025-9030; 2010.

CHIFAMBA, P. C. Preference of *Tilapia rendalli* (Boulenger) for some species of aquatic plants. **J. Fish Biol**, v.36 p.701-705, 1990.

CHIGBO, F. E., SMITH, R.W., SHORE, F. L. Uptake of arsenic, cadmium, lead and mercury from polluted waters by the water hyacinth *Eichornia crassipes*. **Environ. Pollut**, v.27 p.31-36, 1982.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol, **Trends Biotechnology**, v.26 p.126-131, 2008.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v.25 p.294-306, 2007.

CHISTI, Y. Constraints to commercialization of algal fuels. **J. Biotechnol.** p. 201-214, 2013.

CIOTIR, C. H., KIRK, J., ROW, J. R. FREELAND. Intercontinental dispersal of *Typha angustifolia* and *T. latifolia* between Europe and North America has implications for *Typha* invasions. **Biological Invasions** v.15 p.1377–1390, 2013.

CLARKE, E. D., SPEIRS, D. C., HEATH, M. R. WOOD S. N., GURNEY W. S. C., HOLMES S. J. Calibrating remotely sensed chlorophyll-a data by using penalized regression. **Splines jornal of the Royal Statistical Society**, v.55 p.331-353, 2006.

COLLIER, J. L., S. K. Herbert, D.C., Fork, and A.R. Grossman. Changes in the cyanobacterial photosynthetic apparatus during acclimation to macronutrient deprivation. **Photosynthesis Research**, v.42 p.173-183, 1994.

COOK, C. D. K. Water Plants of the World. **W. Junk**, p.561, 1974

COVERTI, A., CASAZZA, A. A., ORTIZ, E. Y., PEREGO, P., BORGHI, M. D. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for Biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing**, v.48 p.1146-1151, 2009.

CUNHA-SANTINO M. B. O destino dos detritos de *Eichhornia azurea* (Sw.) Kunth. em um reservatório tropical. **Acta Limnol. Bras.** v.22 p.109-121, 2010.

DAVIS, E. A., DEDRICK, J., FRENCH, C. S., MILNER, H. W., MYERS, J., SMITH, J. H. C., SPOEHR, H. A. Laboratory experiments on *Chlorella culture* at the Canegie Institution o Washington department of plant biology. In: BURLEY, J. S. ed. **Algal culture**, p.105-153, 1953.

DE MARCHIN, T., ERPICUM, M., FRANCK, F. Photosynthesis of *Scenedesmus obliquus* in outdoor open thin-layer cascade system in high and low CO₂ in Belgium. **Journal of Biotechnology**, v.215 p.2-12 2015.

DEL CAMPO, J. A., GARCÍA-GONZÁLEZ, M., GUERRERO, M. G. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v.74 p.1163-1174, 2007.

DORDIO, A.V., DUARTE, C., BARREIROS, M., CARVALHO, A.J.P., PINTO, A.P., DA COSTA, C.T. Toxicity and removal efficiency of pharmaceutical metabolite clofibric acid by *Typha* spp. – potential use for phytoremediation? **Bioresour. Technol** v.100 p.1156-1161, 2009b.

DOS-SANTOS I., WITTMANN D. Legitimate pollination of the tristylous flowers of *Eichhornia azurea* (Pontederiaceae) by *Ancyloscelis gigas* bees (Anthophoridae, Apoidea) **Plant Syst Evol.** v.223 n.127-137, 2000.

DROOP, M. R., 25 years of algal growth kinetics. **Botanica Marina**, Argyll, v. XXVI, p.99-112, 1982.

EBENEZER, V., MEDLIN, L. K., KI, J. S., Molecular Detection, Quantification, and Diversity Evaluation of Microalgae. **Mar. Biotechnol**, v.1 p.129-142, 2012.

ECKENWALDER J. E., BARRETT, S. C. H. Phylogenetic systematics of Pontederiaceae. **Systematic Botany**, v.11 p.373-391, 1986.

EHIMEN E.A., SUN Z.F., CARRINGTON C.G., BIRCH E.J., EATON-RYE J.J. Anaerobic digestion of microalgae residues resulting from the biodiesel production process, **Appl. Energy** v.88 p. 3454-3463, 2011.

EL NABIS. J. A. Development of cheap and simple culture médium for the microalgae *Nannochloropsis* sp. based on agricultural grade fertilizers available in the local Market of gaza strip (Palestine). **Journal of Al Azhar University Gaza (Natural Sciences)**, v.14 p.61-74, 2012.

EL-SAYED, A. F. M. Alternative dietary protein sources for farmed tilapia, *Oreochromis* spp. **Aquaculture**, v.179 p.149-168, 1999.

EMDAD I. D., BERLAND B. Variation in lipid class composition during batch growth of *Nannochloropsis salina* and *Pavlova lutheri*. **Mar Chem** v.26 p.215-225, 1989.

ENCARNAÇÃO, T., BURROWS, H. D., PAIS, A. C., CAMPOS, M. G., KREMER, A. Effect of N and P on the uptake of magnesium and iron and on the production of carotenoids and chlorophyll by the microalgae *Nannochloropsis* sp. **J Agric Sci Technol** v.2 p.824 - 832, 2012.

ENNABILI, A., ATER, M.; RADOUX, M. Biomass production and NPK retention in macrophytes from wetlands of the Tingitan Peninsula. **Aquatic Botany**, v. 62 p.45-56, 1998.

ESTEVES, F. A. Die bedeutung der aquatischen makrophyten für den stoffhaushalt des schönsees. III. Die anorganischen hauptbestandteile der aquatischen makrophyten. **Gewässer und Abwässer**, v. 66/67 p. 29-94, 1980.

FARAHBAKHSHAZAD, N., MORISON, G. M., SALATI, E. F. Nutrient removal in a vertical upflow wetland in Piracicaba, **Ambio**, v.29 p.74-77, 2000.

FERREIRA, V. S., PINTO, R. F., SANT'ANNA, C. Low light intensity and nitrogen starvation modulate the chlorophyll content of *Scenedesmus dimorphus*. **J Appl Microbiol** v.120 p.661-670, 2016.

FIORESI, T., SIPAÚBA-TAVARES L. H. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (Chlorophyta) em laboratório a base de esterco suíno. **Revista Biotemas**, v.21 n.1 p. 7-16, 2008.

FISCHER, U., ALFERMANN, A. W. Cultivation of photoautotrophic plant cell suspension in the bioreactor: influence of culture conditions. **Journal of Biotechnology**, v. 41 n. 1 p. 19-28, 1995.

FORZZA, R. C., BAUMGRATZ, J. F. A., BICUDO, C. E. M., CANHOS, D. A. L., CARVALHO JR., A. A., COELHO, M. A. N., COSTA, A. F., COSTA, D. P., HOPKINS, M. G., LEITMAN, P. M., LOHMANN, L. G., LUGHADHA, E. N., MAIA, L. C., MARTINELLI, G., MENEZES, M., MORIM, M. P., PEIXOTO, A. L., PIRANI, J. R., PRADO, J., QUEIROZ, L. P., SOUZA, S., SOUZA, V. C., STEHMANN, J. R., SYLVESTRE, L. S., WALTER, B. M. T., ZAPPI, D. C., New Brazilian floristic list highlights conservation challenges. **BioScience**, v.62 p.39-45, 2012.

FOWLER J., COHEN L., JAWIS P. Practical statistics for field biology. 2nd ed, **John Wiley e Sons**, p.259, 1998.

FRANCESCHINI M.C., CAPELLO S., LHANO M.G., ADIS J., WYSIECKI M.L. Morfometria de los estádios ninfales de *Cornops aquaticum* BRUNER (1906) (Acrididae: Leptysminae), **Amazoniana**. v.18 p. 373–386, 2005.

FULAN J.A., HENRY R. The Odonata (Insecta) assemblage on *Eichhornia azurea* (Sw.) Kunth (Pontederiaceae) stands in Camargo Lake, a lateral lake on the Paranapanema River (State of São Paulo, Brazil), after an extreme inundation episode. **Acta Limnol Brasiliensia**, v.18 n.4 p.423-431, 2016.

GAFFNEY, M., O'ROURKE, R., MURPHY, R. Manipulation of fatty acid and antioxidant profiles of the microalgae *Schizochytrium* sp. through flax seed oil supplementation. **Algal Research**, v.6 p.195-200, 2014.

GALATOWITSCH, S. M., N. O. ANDERSON & P. D. ASCHER. Invasiveness in wetland plants in temperate North America. **Wetlands** v.19 p.733–755, 1999.

GHAFAARI, M., RASHIDI, B., HAZNEDAROGLU, B. Z. Effects of macro and micronutrients on neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae. **Biofuels**, 2016.

GOLTERMAN, H. L., CLYMO, R. S., OHNSTAD, M. A. M. **Methods for physical and chemical analysis of fresh water**. 2ed. Blackwell Scientific Publication. n.8 p.113, 1978.

GUILLARD, R. R. L. Division rates. In: STEIN, J. R. (Ed.). Handbook of phycological methods: culture methods and growth measurements, **Cambridge University Press**, p.289-311, 1973.

GUSCHINA, I. A., HARWOOD, J. L. The versatility of algae and their lipid metabolism, **Biochimie**. v.91 n.6 p. 679-684, 2009.

HAMMER, D. A. Constructed wetlands for wastewater treatment: municipal, industrial and agricultural. **Lewis Publishers**, v. 831, 1989.

HARDY, E. R., CASTRO, J. G. D. Qualidade nutricional de três espécies de clorofíceas cultivadas em laboratório. **Acta Amazonica**, v.30 p.39-47, 2000.

HARUN, R., DANQUAL, M. K., FORDE, G. M. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. **Journal of chemical technology and biotechnology**, v.85 n.2 p.199-203, 2010.

HE, Q., YANG, H., WUA, L., HUA, C. Effect of light intensity on physiological changes, carbon allocation and neutral lipid accumulation in oleaginous microalgae. **Bioresour Technol** v.191 p.219-228, 2015.

HEALEY, F. P., CARR, N. G.; WHITTON, B. A. The biology of cyanobacteria. (eds), **Blackwell Scientific**, Oxford, UK, 1982.

HERRERO, A., MURO-PASTOR, A. M. FLORES, E. Nitrogen control in cyanobacteria. **Journal of Bacteriology**, v.183 p.411-425, 2001.

HU, Q. Environmental Effects on Cell Composition. In: RICHMOND (Ed), A. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. **Blackwell Science**, p.312-351, 2004.

HUANG, G., CHEN, F., WEI, D., ZHANG, X., CHEN, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, v.87 n.1 p.38-46, 2010.

ILLMAN, A. M., SCRAGG, A. H. e SHALES, S. W. Increase in *Chlorella strains* calorific values when grown in low nitrogen medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v.27 p.631- 635, 2000.

JACOB, A., BUCHARSKY, E. C., GUENTERSCHELL, K. The Application of Transparent Glass Sponge for Improvement of Light Distribution in Photobioreactors. **Journal of Bioprocessing e Biotechniques**, v.02 n. 01 p. 1-8, 2012.

JIN, X., CHU, L., YAN, F., LENG, Q. Effects of lanthanum (III) and EDTA on the growth and competition of *Microcystis aeruginosa* and *Scenedesmus quadricauda*. **Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters**, v.39 p.86-93, 2008.

JUNEJA, A., CEBALLOS, R. M.; MURTHY, G. S. Effects of environmental factors and nutrient availability on the biochemical composition of algae for biofuels production: A review. **Energies**, v.6 n.9 p.4607-4638, 2013.

JUNYING, Z., JUNFENG, R., BAONING, Z. Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel. **Chinese Journal of Catalysis**, v.34 p.80-100, 2013.

KASTURIARACHCHI, J. C. Removal of nutrients (N and P) and heavy metals (Fe, Al, Mn and Ni) from industrial wastewaters by phytoremediation using water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) under different nutritional conditions. **Journal of Environmental Management**, v.87 n.3 p.450–460.

KHOO, H. H., SHARRATT, P. N., DAS, P., BALASUBRAMANIAN, R. K., NARACHARISSETTI, P. K., SHAIK, S. Life cycle energy and CO₂ analysis of microalgae-to-biodiesel: Preliminary results and comparisons. **Bioresource Technol**, v.102 p. 5800-5807, 2011.

KILHAM, S., KREEGER, D. A., GOULDEN, C. E., LYNN, S. G. Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*. **Freshwater Biology** 38: 591-596, 1997.

KISSMANN, K.G. **Plantas Infestantes e Nocivas**. BASF, p. 802- 807, 1997.

KOMY, Z. R., ABDELRAHEEM, W. H., E ISMAIL, N. M. Biosorption of Cu²⁺ by *Eichhornia crassipes*: physicochemical characterization, biosorption modeling and mechanism. **Journal of King Saud University-Science**, v.25 n.1 p.47-56, 2013.

KOROLEFF, F. Determination of nutrients. In Grassnof, K. (Ed.). **Methods of seawater analysis**, Verlag Cemie, p.7, 1976.

KUMAR, M. S., MIAO, Z. H., WYATT, S. K. Influence of nutrient loads, feeding frequency and inoculum source on growth of *Chlorella vulgaris* in digested

piggery effluent culture medium. **Bioresource Technology**, v.101 p.6012–6018, 2010.

LARCHER, W. Ecofisiologia vegetal. **Rima**, p.531 2000.

LI, Y., CHEN, Y. F., CHEN, P., MIN, M., ZHOU, W., MARTINEZ, B., ZHU, J., RUAN, R. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. **Bioresource Technology**, v.102 n.8 p.5138-5144, 2011.

LIANG, Y., SARKANY, N., CUI, Y., BLACKBURN, J. M., Batch stage study of lipid production from crude glycerol derived from yellow grease or animal fats through microalgal fermentation. **Bioresource Technology**, v.101 p.6745-675, 2010.

LIU, Z. Y., WANG, G., ZHOU, B. C. Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v.99 p.4717-4722. 2008.

LONG, S.P., HUMPHRIES, S., FALKOWSKI, P. G. Photoinhibition of photosynthesis in nature. Annual Review of Plant Physiology and Plant **Molecular Biology**, v.45 p.633-662,1994.

LOPES T. M., CUNHA E. D., SILVA J. C. B., BEHREND R. D. L., GOMES L. C. Dense macrophytes influence the horizontal distribution of fish in floodplain lakes. **Environ Biol Fish**, v.98 p.1741-1755, 2015.

LOURENÇO, S. O. Cultivo de Microalgas Marinhas – princípios e aplicações, 1. ed. **Rima**, 2006.

LU X. M., HUANG, M. S. A correlação entre a qualidade da água e a variação diurna de *Pontederia cordata* fisiologia 's **Int. J. Environ. Sei. Technology**, v.9 p.311-313, 2012.

LURLING, M. GEEST, G. V. SCHEFFER, M. Importance of nutrient competition and allelopathic effects in suppression of the green alga *Scenedesmus obliquus* by the macrophytes *Chara*, *Elodea* and *Myriophyllum*. **Hydrobiologia**, v.556 p.209-220, 2006.

MARCONDES, D. A. S., VELINI, E. D., MARTINS, D., TANAKA, R. H., CARVALHO, F. T., CAVENAGHI, A. L., BRONHARA, A. A. Fluridone efficacy in

controlling submersed aquatic weeds and its effects on some environmental characteristics. **Planta Daninha**, v.20 p.63-71, 2002.

MARTÍNEZ, M. E.; SANCHEZ, S.; JIMENEZ, J. M.; EL YOUSFI, F.; MUNOZ, L. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalgae *Scenedesmus obliquus*. **Bioresource of Technology**, v.73 n.3 p. 263-272, 2000.

MARXEN, K., VANSELOW, K., LIPPEMEIER, S., HINTZE, R.; RUSER, A., HANSEN, U. A photobioreactor system for computer controlled cultivation of microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v.17 n.6 p.535-549, 2005.

MATA, T. M., MARTINS, A. A., CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14 p.217-232, 2010.

MATOS, P. A., MARIOKA, I. R. L., SANT`ANNA, S. E., FRANÇA, B. K. Protein and lipids contents from *Chlorella* sp. cultivated in residual concentrated desalination. **Ciência Rural**. Online, doi: 10.1590/0103-8478cr20211104.

MCKIM, S. M., DURNFORD, D. G. Translational regulation of light-harvesting complex expression during photo acclimation to high - light in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.44 p.857-865, 2006.

MENG, X., Biodiesel production from oleaginous microorganisms. **Renewable Energy**, v.34, p.1-5, 2009.

MOOZHIL, M., PALLAUF, J. Chemical composition of the water fern, *Salvinia molesta*, and its potential as feed source for ruminants. **Econ. Bot**, v.40 n. 3 p.375-383, 1986.

MARIOKA, L. R. I. Flocculação de *Chlorella* sp. produzida em concentrado de dessalinização e estudo de método de extração de lipídeos intracelulares, **Química Nova**, v.37 n.1 p.44-49, 2014.

MORMUL, R. P., VIEIRA, L. A., PRESSINATTE, S. J., MONKOLSKI, A. and SANTOS, A. M. Sucessão de invertebrados durante o processo de decomposição de duas plantas aquáticas (*Eichhornia azurea* e *Polygonum ferrugineum*). **Acta Scientiarum**, v.28 n. 2 p.109-115, 2006.

MORTON, J. F. Cattails (*Typha* spp). Weed problem or potential crop? **Econ. Bot**, v. 29, p.7-29, 1975.

NACA/FAO. Desenvolvimento da Aquicultura para Além de 2000: A Declaração de Bangucoque e Estratégia. NACA, Bangucoque e FAO, 2000.

NAYAK M., KAREMORE A., SEM R. Performance evaluation of microalgae for concomitant wastewater bioremediation, CO₂ biofixation and lipid biosynthesis for biodiesel application, **Algal Res.** v.16 p.216-223, 2016.

NEWMAN, S. SCHUETTE, J. GRACE, J. B. RUTCHERY, K. FONTAINE, T. REDDY, K. R. PIETRUCHA, M. Factors influencing cattail abundance in the northern Everglades. **Aquatic Biology** v.60 p.265-280, 1998.

NUSCH, E. A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. **Archiv für Hydrobiologie**, v.14, p.14-36, 1980.

OLAIZOLA, M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v.20 p.459, 2003.

OLIVERA, C. R., O panorama da aquicultura no Brasil: A prática com foco na sustentabilidade. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v.2 n.1, 2009.

ORDOG, V. Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogenstressed *Chlorella minutissima* cultures. **J. Appl Phycol**, v.24 n.4 p.907-914, 2012.

PADIAL J.M., CASTROVIEJO-FISHER S., KOHLER J., VILA C., CHAPARRO J.C., DE LA RIVA I. Deciphering the products of evolution at the species level: the need for an integrative taxonomy. **Zool Scr.** v.38 n.4 p.431-447, 2009.

PARK, N., VANDERFORD, B.J., SNYDER, S.A., SARP, S., KIM, S.D., CHO, J. Effective controls of micropollutants included in wastewater effluent using constructed wetlands under anoxic condition. **Ecol. Eng.** v.35 p.418–423, 2009.

PÉREZ-GARCIA O., ESCALANTE F. M. E., DE-BASHAN L. E., BASHAN Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. **Water Research** v.45 p.11-36, 2011.

POTT, V. J., POTT, A. **Plantas aquáticas do Pantanal**. EMBRAPA, p. 404, 2000.

POTT V.J., POTT A. **Plantas aquáticas do Pantanal**. Embrapa; Corumbá: 2001.

RAMOS, M. R. Remoção da carga orgânica de água residuária de lavanderia têxtil utilizando pontederia parviflora Alexander. **Revista Internacional de Meio Ambiente Subterrâneo** v.1, 2009.

RAVEN, J. A., EVANS, M. C. W., KORB, R. E. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. **Photosynthesis Research**, v.60 n.111-150, 1999.

REYNOLDS, C. S. The ecology of freshwater phytoplankton. Cambridge: **University Press**, p.384, 1984.

RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. **Oxford: Blackwell Science**, p.566, 2004.

ROCHA, O., DUNCAN, A. The relationship between cell carbon and cell volume in freshwater algal species used in zooplanktonic studies. *Journal of Plankton Research*, Oxford, v.7 n. 2 p.279-294, 1985.

RODEN, E. E., ZACHARA, J. M. Microbial reduction of crystalline iron (III) oxides: influence of oxide surface area and potential for cell growth, **Environmental Science e Technology**, v.30 p.1618-1628, 1996.

RUCKERT, G., GIANI, A. Effect of nitrate and ammonium on the growth and protein concentration of *Microcystis viridis* Lemmermann (Cyanobacteria). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27 p. 325-331, 2004.

SALATI FILHO, E., MARCONDES, D.S., SALATI, E., ELIAS, J.M., N OGUEIRA, S.F. Assessment of the efficiency of constructed wetland sistem – Pilot plant – for tertiary treatment. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON WETLANDS SYSTEMS FOR WATER POLLUTION CONTROL, **Proceedings**. v.2 p.971-976, 2000.

SALISBURY, F. B., ROSS, C. W. Plant physiology. 4. ed, **Wadsworth Publishing Company**, p.682, 1992.

SAMORI G., SAMORI C., GUERRINI F., PISTOCCHI R. Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae

consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: Part I. **Water Research**, v.47 n.2 p.791- 801, 2013.

SANDEFUR, H. N., ASGHAOUPOUR, M., MARIOTT, J. GOTTBURG E., VADEN, J., MATLOCK, M., HESTEN J. Recovery of nutrients from swine wastewater using ultrafiltration: Applications for microalgae cultivation in photobioreactors. **Ecological Engineering**, n.94 p.75-84, 2016.

SILVA F. R., PRADO, V. H. M., ROSSA-FERES, D. C. Amphibia, Anura, Hylidae, *Dendropsophus melanargyreus*: distribution extension, new state record and geographic distribution map. **Check List**. v. 6 n.3 p. 402-404, 2010.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H., ROCHA, O. Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes: I- algas clorofíceas. **Biotemas**, v.6 p.93-106, 1993.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H., ROCHA, O. Sobrevivência de larvas de *Piaractus mesopotamicus* (Holberg, 1887) (Pacu) e *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Tambaqui), cultivadas em laboratório. **Biotemas**, v. 7, n.1-2, p.46-56, 1994.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H., BRAGA, F. M. S. Study of feeding habits of *Piaractus mesopotamicus* (Pacu) larvae in fish ponds. Naga - **The ICLARM Quarterly**, v. 22, n. 1, 1999.

SIPAÚBA-TAVARES L. H., ROCHA O. Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos. **Rima**, p.106, 2001.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H., BACHION, M. A. Population growth and development of two species of cladocera, *Moina micrura* and *Diaphanosoma birgei*, in laboratory. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62 n. 4A p. 701-711, 2002.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H., PEREIRA, A. M. L. Large scale laboratory cultures of *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) and *Diaphanosoma birgei* Korinek (Cladocera). **Brazilian Journal of Biology**, v.68 n.4 p.875-883, 2008.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H., IBARRA, L. C. FIORESI, T. B. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (REISCH) Korsikov (Chlorophyceae) em laboratório

utilizando meio CHU12 e de macrófita com NPK. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.35 p.111-118, 2009.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H., MILLAN, R. N. BERCHIELLI, F. A., BRAGA, F. M. S. Use of alternative media and different types of recipients in a laboratory culture of *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korshikov (Chlorophyceae). **Acta Scientiarum**. Biological Sciences, v.33 p.247-253, 2011.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H., DIAS, S. G. TRAVAINI-LIMA, F., SCARDOELLI-TRUZZI, B., BOARETO, C. A. **Macrophytes in Neotropical Aquaculture Farms: Positive and Negative Effects. Macrophytes: Biodiversity, Role in Aquatic Ecosystems and Management Strategies**. 1ed.: Nova Science Publishers, v.1 p.59-84, 2014.

SIPAÚBA - TAVARES L. H., BERCHIELLI – MORAIS F. A., SCARDOELLI-TRUZZI B., Growth of *Haematococcus pluvialis* flotox in alternative media. **Brazilian Journal of Biology**. V.75, n. 4, 2015a.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H., SEGALLI A. M. D. L., SCARDOELLI-TRUZZI B. Aquatic Plants: Alternative médium for microalgae growth. **Animals of Aquaculture Research**, v.2 p.1009, 2015b.

SIPAÚBA-TAVARES L. H., SEGALLI, A. M. D. L., BERCHIELLI-MORAIS F. A., SCARDOELLI-TRUZZI B. Development of low cost culture médium for *Ankistrodesmus gracilis* based on inorganic fertilizer and macrophytes. **Acta Limnologia Brasiliensis**, v.29 p.5 2017.

SOARES, R. J. B. **Avaliação da possibilidade de tratamento de um efluente piscícola marinho por microalgas**. Universidade do Porto, p.152, 2000.

SPOLAORE, P., CASSAN, C. J., DURAN, E., ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **J. Bioscience and Bioengineering**, v.101 p.87-96, 2006.

STATSOFT, INC. STATISTICA: **Data analysis software system**. Version 8.0. São Caetano do Sul, 2010

SUH, S. S., KIM, S. J., HWANG, J., PARK, M., LEE, T.K., KIL, E. J., LEE, S. Fatty acid methyl ester profiles and nutritive values of 20 marine microalgae in Korea. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p.191-196, 2015.

THOMAZ, S. M., E. R., Cunha. The role of macrophytes in habitat structuring in aquatic ecosystems: methods of measurement, causes and consequences on animal assemblages composition and biodiversity. **Acta Limnologica Brasiliensia**, n.22 v.2 p.218-236, 2010.

TIMBERLAKE, C. F. HENRY, B. S. Plant pigments as natural food colours. **Endeavour**, v.10 n.1 p. 31-36, 1986.

TOCQUIN, P., FRATAMICO, A., Franck, F., Screening for a low-cost medium reveals an unexpected impact of a low N/P ratio on vegetative growth *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Applied Phycology**, v.24 p.365-373, 2012.

TOPARE, N. S., CHOPADE, S. G., RENGE, V. C., KHEDAR, S. V., BHAGAT, S. L. An algae bioreactor from Recycle water bottle for Cultivation of Algae, **International Journal of Chemtech Research**. v.4 p.1, 2012.

TRAVAINI-LIMA, F., MILSTEINS, A., SIPAÚBA-TAVARES, L. H. Season differences in plankton community and removal efficiency of nutrientes and organic matter in a subtropical constructed wetland. **Wetlands**, DOI: 10.1007/513157-016-0804-1. Online, 2016.

TRAVAINI-LIMA, F., SIPAÚBA-TAVARES, L. H. Efficiency of a constructed wetland for wasterwaters treatments. **Acta limnologica brasiliensia**, v.24 n.3 p. 255-265, 2012.

URSO-GUIMARÃES M. V., PELÁEZ-RODRÍGUEZ M. P., Trivinho-Strixino, S. New species of Lopesia (Diptera, Cecidomyiidae) associated with *Eichhornia azurea* (Pontederiaceae) from Brazil. **Iheringia Série Zool**. v.104 n.4 p.478-483, 2014.

VAN, T. K.,WHEELER, G. S., e CENTER, T. D. Competition between hydrilla verticillata and Vallsneria Americana as influenced by soil fertility. **Aquatic Botany**, v.62 p.225-233, 1999.

- VOLLENWEIDER, R. A. A manual on the methods for measuring primary production in aquatic environments. **Oxford: Blackwell Scientific Publ**, p. 255, 1974.
- WANG, H., XIONG, H., HUI. Z., ZENG, X. Mixotrophic cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggery wastewater to produce lipids. **Bioresource Technology**, v.104 p.215-220, 2012.
- WANG, J., HAN, D., SOMMERFELD, M.R., LU, C. AND HU, Q. Effect of initial biomass density on growth and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* in an outdoor photo bioreactor. **Journal of Applied Phycology**, v. 25 n.1 p.253-260, 2013.
- WANG, J., YANG, H., WANG, F. Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: status and prospects. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.172 p.7, 2014.
- WANG, L., LI, Y., CHEN, P., MIN., M., CHEN, Y., ZHU, J., RUAN, R. R. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. **Bioresource Technology**, v.101 n.8 p.2623-2628, 2010.
- WESTLAKE, D. F. Comparison of plant productivity. **Biol. Rev**, v.38 p.385-425, 1963.
- WOLVERTON, B. C., McDONALD, R. C. Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) productivity and harvesting studies. **Econ. Bot**, v.33, n.1, p.1-10, 1979.
- XIA, L. J, GE, H., ZHOU, X. J., ZHANG, D.J., HU, C. Photoautotrophic outdoor twoRstage cultivation for oleaginous microalgae *Scenedesmus obtusus* XJR15. **Bioresource technology**, v.144 p.261-7, 2013.
- YANG, S., WANG, J., CONG, W. Utilization of nitrite as nitrogen source by *Botryococcus braunii*. **Biotechnology Letters**, v.26 p.239-243, 2004.
- YEGANEH, S., TEIMOURI, M., AMIRKOLAIE, A. K. Dietary effects of *Spirulina platensis* on hematological and serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Research in Veterinary Science**, n.101 p.84-88, 2015.

ZENG, X., DANQUAH, M. K., CHENA, X. D., LU, Y. Microalgae bioengineering: from CO₂ fixation to biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **Kidlington**, v.15 p.3252-3260, 2011.

ZETTLER, F. W., FREEMAN, T. E. Plant pathogens as biocontrols of aquatic weeds. **Annual Review of Plant Pathology**, v.10 n.1 p.455-470, 1972.

ZHOU, W., MIN, M., LI, Y., HU, B., MA, X., CHENG, Y., LIU, Y., CHEN, P., RUAN, R. A hetero-photoautotrophic two-stage cultivation process to improve wastewater nutrient removal and enhance algal lipid accumulation. **Bioresource Technology**, Essex, v.110 p.455, 2012.

ZHU, L. D., HILTUNEN, E., ANTILA, E., ZHONG, J. J., YUAN, Z. H., WANG, Z. M. Microalgal biofuels: Flexible bioenergies for sustainable development. *Renawable and Sustainable. Energy Reviews*, v.30, 2014.

)