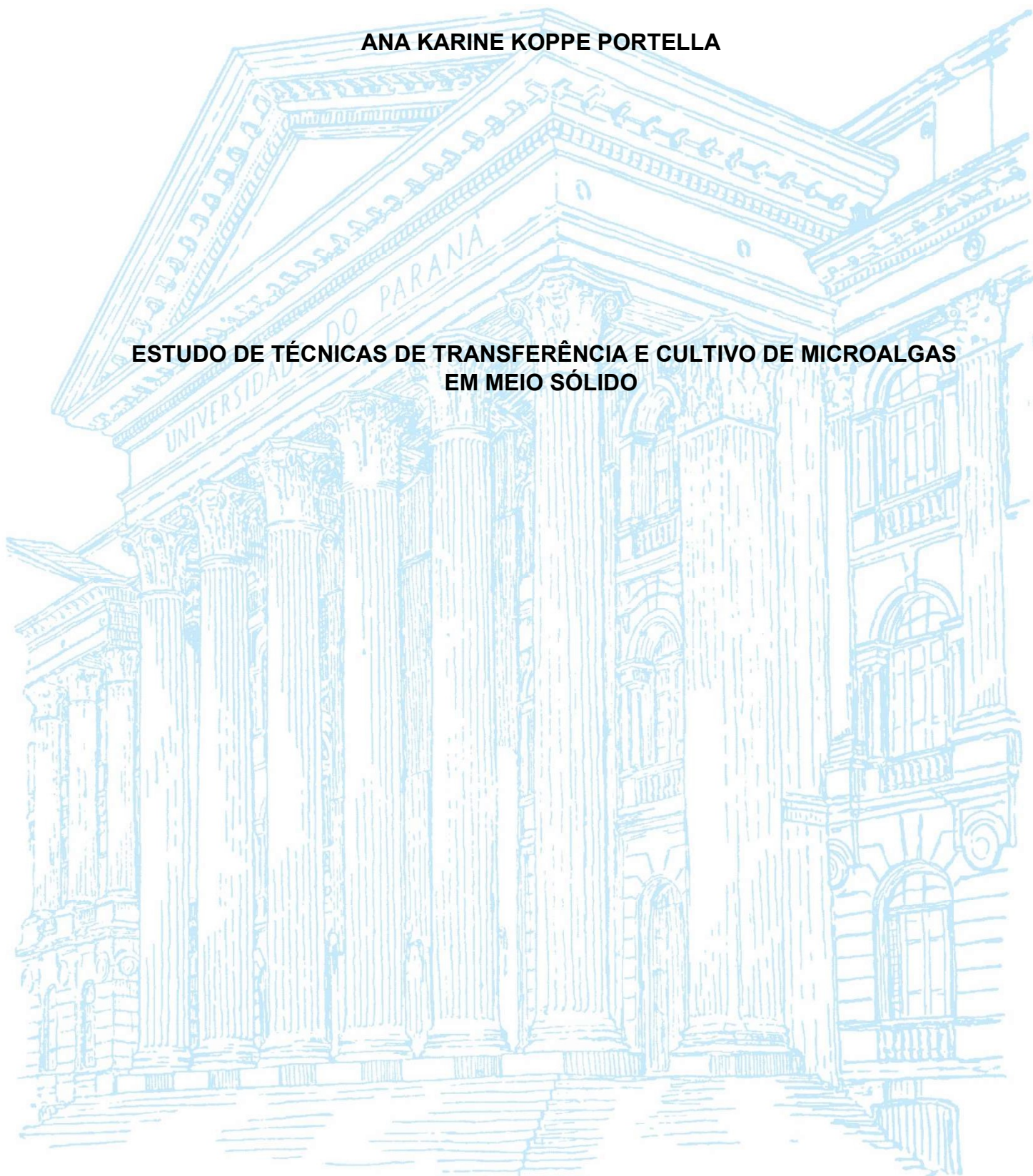


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ANA KARINE KOPPE PORTELLA**

**ESTUDO DE TÉCNICAS DE TRANSFERÊNCIA E CULTIVO DE MICROALGAS  
EM MEIO SÓLIDO**

**PONTAL DO PARANÁ  
2023**



**ANA KARINE KOPPE PORTELLA**

**ESTUDO DE TÉCNICAS DE TRANSFERÊNCIA E CULTIVO DE MICROALGAS  
EM MEIO SÓLIDO**

Trabalho de conclusão de curso de Engenharia de Aquicultura da Universidade Federal do Paraná, Centro de Estudos do Mar situada em Pontal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Aquicultura.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Melegari.

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Jose Lagreze Squella

**PONTAL DO PARANÁ  
2023**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
 COORDENAÇÃO DO CURSO DE ENGENHARIA DE AQUICULTURA  
 Avenida Deputado Anibal Khury, 2033, - Bairro Balneário Pontal do Sul, Pontal do Paraná/PR, CEP 83255-976  
 Telefone: 4135118600 - <http://www.ufpr.br/>

Despacho nº 7/2023/UFPR/R/PP/EA

Processo nº 23075.061642/2022-21

### TERMO DE APROVAÇÃO

**Ana Karine Koppe Portella**

*Estudos de Técnicas de Transferência e Cultivo de Microalgas em Meio Sólido.*

Trabalho de conclusão de curso aprovado como requisito parcial para a obtenção do grau de Engenheiro de Aquicultura da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada pelos professores

Dra. Sílvia Pedroso Melegari  
 Orientadora e presidente

Dr. Luiz Laureno Mafra Junior  
 Membro examinador

Dr. Francisco José Lagreze Squella  
 Membro examinador

Pontal do Paraná, 29/06/2023



Documento assinado eletronicamente por **SÍLVIA PEDROSO MELEGARI, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 07/07/2023, às 15:41, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **LUIZ LAURENO MAFRA JUNIOR, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 07/07/2023, às 16:07, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **FRANCISCO JOSE LAGREZE SQUELLA, PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 10/07/2023, às 17:28, conforme art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida [aqui](#) informando o código verificador **5696446** e o código CRC **F36A5BA4**.

## RESUMO

As microalgas são organismos unicelulares fotossintetizantes, autotróficos, e geram benefícios socioeconômicos para dezenas de milhares de famílias. Culturas de microalgas representam uma etapa essencial e valiosa na aquicultura. Elas são base de alimentação de invertebrados como os bivalves e bem como zooplâncton (rotíferos, copépodes, artêmias). São usadas para a extração de lipídeos e PUFA's (ácidos graxos poliinsaturados), além da extração de pigmentos e na utilização em testes de toxicidade. As cepas utilizadas para esse trabalho são das espécies *Tetraselmis* sp., *Isochrysis* sp., *Chaetoceros muelleri* e *Nannochloropsis* sp. O objetivo geral desse trabalho é viabilizar um protocolo de purificação e cultivo de microalgas em meio sólido, a fim de manter cepas de microalgas purificadas por mais tempo em laboratório, sem a necessidade de manutenção periódica, e garantir a viabilidade das cepas após transferência do meio líquido para o sólido, e do sólido para o líquido. Foram testados três métodos diferentes de inoculação, e o método que obteve melhor resultado de inoculação, foi testado em sistema de repetições a fim de comprovar sua eficácia. Nestes ensaios, a *Tetraselmis* sp. foi a microalga que melhor se adaptou ao meio sólido em relação às outras espécies. Já nos ensaios de ressuspensão das cepas do meio sólido para o meio líquido, a *Isochrysis* sp., *Nannochloropsis* sp. e a *C. muelleri* tiveram uma maior taxa de crescimento quando comparada com a *Tetraselmis* sp. Com os resultados obtidos foi possível estabelecer um método eficaz para purificação, inoculação e manutenção das microalgas testadas em meio sólido.

**Palavra-Chave:** Microalgas marinhas; meio de crescimento sólido; método de isolamento.

## ABSTRACT

Microalgae are single-celled, photosynthesizing, autotrophic organisms that generate socioeconomic benefits for tens and thousands of families. Microalgae cultures represent an essential and valuable step in aquaculture. They form the food base for invertebrates such as bivalves and zooplankton (rotifers, copepods, artemia), are used for the extraction of lipids and PUFAs (polyunsaturated fatty acids), as well as for the extraction of pigments and in toxicity tests. The strains used on this work were from the species *Tetraselmis* sp., *Isochrysis* sp., *Chaetoceros muelleri*, and *Nannochloropsis* sp. The overall objective of this work is to establish a protocol for the purification and cultivation of microalgae in a solid medium, to maintain strains of purified microalgae for a longer time in the laboratory, without the need for periodic maintenance, and to ensure the viability of the strains in the liquid-solid and solid-liquid media. Three different inoculation methods were tested, and the method that obtained the best inoculation results was tested in a repetition system to prove its effectiveness. In these tests, *Tetraselmis* sp. was the microalgae that best adapted to the solid medium in relation to the other species. *Isochrysis* sp., *Nannochloropsis* sp., and *C. muelleri* had a higher growth rate when compared to *Tetraselmis* sp. With the obtained results, it was possible to establish an efficient method for purification, inoculation, and maintenance of tested microalgae in a solid growth medium.

**Keywords:** Marine microalgae; solid growth media; purification method.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Fundação Araucária pela bolsa de iniciação científica pois sem ela o desenvolvimento desse trabalho não seria possível.

Aos professores Prof. Dr. Francisco José Lagreze Squella e Prof. Dr. Luiz Laureno Mafra Junior por terem cedido as amostras para esse trabalho.

A doutoranda Jassiara da Silva Pessoa que me auxiliou em todas as etapas do trabalho.

E em especial a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Melegari e ao Prof. Dr. Francisco José Lagreze Squella, pela orientação, competência, generosidade, compreensão e confiança, agradeço carinhosamente.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	9
1.1 JUSTIFICATIVA .....	10
1.2. OBJETIVOS.....	11
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
2.1 MICROALGAS .....	12
2.1.1 <i>Tetraselmis</i> sp.....	14
2.1.2 <i>Nannochloropsis</i> sp.....	15
2.1.3 <i>Chaetoceros muelleri</i> .....	15
2.1.4 <i>Isochrysis</i> sp.....	16
2.2 MEIOS DE CULTIVO .....	17
2.2.1 Meio líquido .....	17
2.2.2 Meio sólido.....	18
2.3 SISTEMAS DE CULTIVO.....	19
2.4 TÉCNICAS DE ISOLAMENTO DE CEPAS CONTAMINADAS.....	19
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	21
3.1 OBTENÇÃO DAS CEPAS.....	21
3.2 PREPARAÇÃO DAS VIDRARIAS .....	21
3.3 PREPARAÇÃO DO MEIO LÍQUIDO DE CULTIVO .....	21
3.5 PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO SÓLIDO NAS PLACAS.....	23
3.6 INOCULAÇÃO DAS MICROALGAS EM MEIO SÓLIDO .....	23
3.6.1 Método 1 .....	23
3.6.2 Método 2 .....	23
3.6.3 Método 3 .....	24
3.7 CONTAGEM DE CÉLULAS .....	24
3.8 RESSUSPENSÃO EM MEIO LÍQUIDO .....	25
3.9 OBTENÇÃO DA ÁREA DE CRESCIMENTO DE MICROALGAS NA PLACA.....	26
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	27
4.1 TESTES PRELIMINARES DE INOCULAÇÃO.....	27
4.2 INOCULAÇÃO DAS MICROALGAS EM MEIO SÓLIDO UTILIZANDO O MÉTODO 3 ...	30
4.3. TESTES DE RESSUSPENSÃO DAS MICROALGAS DO MEIO SÓLIDO PARA O MEIO LÍQUIDO .....	34
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	38
<b>6. RECOMENDAÇÕES</b> .....	39
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	40

<b>ANEXO 1 – Tabela de Dados da área de crescimento da placa .....</b>	<b>45</b>
<b>ANEXO 2 – Procedimento Operacional Padrão.....</b>	<b>47</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos unicelulares, fotossintetizantes, e um dos principais agentes responsáveis pela criação da atual atmosfera terrestre (SIMÕES *et al.*, 2016). As microalgas são encontradas crescendo em todos os biótopos devido a sua diversidade ecológica, e a sua adaptabilidade fisiológica, elas juntamente com cianobactérias constituem o fitoplâncton, e podem se classificar por tamanho sendo o menor deles o picoplâncton (0,2 – 2  $\mu\text{m}$ ), seguido pelo nanoplâncton (2 – 20  $\mu\text{m}$ ), microplâncton (20 – 200  $\mu\text{m}$ ) e mesoplâncton (200 – 2000  $\mu\text{m}$ ) (LOURENÇO, 2006). As algas e microalgas geram benefícios socioeconômicos para dezenas de milhares de famílias. Na Aquicultura, a produção de microalgas é diversificada em biomassa para a produção de biodiesel, extração de lipídeos, pigmentos e PUFAS (sigla em inglês para ácidos graxos poliinsaturados), bem como na alimentação de invertebrados, como moluscos e zooplâncton, além de ser utilizados no tratamento de efluentes (LOURENÇO, 2006; WOJCIECHOWSKI *et al.*, 2013). A FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura) registrou em 2018 a produção de microalgas mundial na ordem de 87 ton., peso seco, sendo 86 ton. apenas pela China (FAO, 2022).

As microalgas podem ser utilizadas como bioindicadores de contaminação de corpos d'água, sendo cada vez maior o uso de microalgas em testes de toxicidade em geral (LOURENÇO, 2006; SILVA, 2015). Estudos mostram que variações nos parâmetros de nitrogênio e fósforo, salinidade e o movimento da água influenciam no desenvolvimento desses microorganismos (TROBAJO; COX; QUINTANA, 2004).

Para se produzir microalgas deve se atentar aos sistemas de cultivo, que possuem inúmeras questões técnicas e científicas para o aumento da geração de biomassa algácea (TEIXEIRA *et al.*, 2015). A manutenção correta de um cultivo depende da escolha correta do meio de cultivo, a fim de manter parâmetros similares aqueles do ambiente natural (CORREIA, 2013). Dentre as formas de cultivo conhecidos encontra-se o uso de fotobiorreatores, raceways ou bolsas. Em todos os casos, as cepas que dão início aos cultivos costumam ser produzidos em meio líquido armazenados em tubos de ensaio, ou em placas de meio sólido.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Considerando a crescente demanda para os usos de microalgas nos mais diversos setores biotecnológicos, a necessidade de obtenção, bem como o armazenamento das culturas de microalgas puras está cada vez mais em evidência na atualidade. A qualidade das cepas irá interferir diretamente na quantidade de biomassa produzida pelo cultivo. Um dos maiores problemas hoje relacionados a monoculturas de microalgas é a contaminação dos cultivos por microrganismos indesejados, como outras microalgas, bactérias, protozoários e fungos, que podem prejudicar o crescimento adequado das microalgas desejadas. Essa contaminação pode ser evitada através do manejo adequado das cepas durante o cultivo.

O cultivo de cepas de diferentes microalgas em laboratório gera outro problema recorrente das culturas desses organismos, que é a manutenção das cepas em laboratório em meio líquido. Essas coleções de microalgas exigem cuidados semanais, relacionados à troca do meio de cultivo, consumo energético (autoclavagem, temperatura controlada, aeração, agitação, iluminação), e mão de obra técnica diária. A substituição do meio de cultivo líquido pelo meio sólido tem se demonstrado uma alternativa atrativa e viável, pois além de reduzir problemas de contaminações direta e cruzada associados a manipulação dos cultivos líquidos, essa alternativa apresenta outras vantagens como: economia de espaços e energia, além da redução da geração de resíduos, e a manutenção das cepas purificadas por longos períodos sem necessidade de trocas de meio de cultivo, garantindo uma mão de obra especializada no início, preparação das placas e inoculação, e sem a necessidade de pessoal diariamente em função da manutenção dos cultivos.

Embora existam normas estabelecidas pela ABNT NBR 16181/2021 para cultivo de microalgas em meio líquido (destinadas para ensaios toxicológicos), a literatura ainda carece de metodologias que descrevam técnicas associadas a transferência desses cultivos do meio líquido para o meio sólido. Alguns autores como Lourenço (2006) e Andersen (2005) citam o uso do meio sólido para isolamento de microalgas e manutenção de coleção de microalgas, mas sem especificar o método de inoculação nas placas.

Além disso, o desenvolvimento dessa pesquisa contribui para a criação da Coleção de Microalgas do Centro de Estudos do Mar (CEM) da Universidade Federal do Paraná. A Coleção de Microalgas do CEM tem como objetivo a catalogação,

purificação e armazenamento de cepas de microalgas regionais, nacionais e internacionais que servirão como fonte de material biológico especializado para a comunidade científica.

## 1.2. OBJETIVOS

Diante do exposto, o objetivo geral desse trabalho é viabilizar um protocolo de purificação e cultivo de microalgas em meio sólido, a fim de manter cepas de microalgas purificadas por mais tempo em laboratório, sem a necessidade de manutenção periódica.

Para o atendimento do objetivo geral, alguns objetivos específicos foram delineados. Dentre eles, citam-se:

- Purificar as cepas de microalgas disponíveis no CEM em meio líquido usando método de diluição sucessiva;
- Inocular as microalgas purificadas em meio sólido e acompanhar o crescimento das cepas por um determinado intervalo de tempo;
- Avaliar a viabilidade celular das microalgas após crescimento em meio sólido, através da ressuspensão e acompanhamento do crescimento das cepas no meio líquido.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 MICROALGAS

As microalgas são microrganismos fotossintetizantes muito diversos presentes nos ecossistemas aquáticos. Em sua maioria, as microalgas têm hábitos planctônicos, embora existam algumas espécies bentônicas e terrestres (habitando ambientes úmidos). As microalgas planctônicas constituem o fitoplâncton, ou seja, são componentes fotoautotróficos do plâncton (LOURENÇO, 2006). São produtoras primárias, ou seja, são base de cadeia trófica e garantem a alimentação de outros organismos aquáticos. Calcula-se que 90% da produção primária marinha global seja derivada da atividade do fitoplâncton (SIMÕES *et al.*, 2016). Além disso, as microalgas captam e armazenam substâncias complexas, tais como ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), polissacarídeos, minerais e vitaminas, antioxidantes, enzimas e peptídeos bioativos (KIM; WIJESEKARA, 2010; LOURENÇO, 2006).

Com exceção das cianobactérias, as quais são bactérias procariotas dotadas de clorofila *a*, as microalgas são organismos eucariotas, dotadas de diversas estruturas e organelas celulares, dentre as quais se encontra os cloroplastos (JACINAVICIUS *et al.*, 2013). Os cloroplastos são estruturas verdes, pardas, alaranjadas ou vermelhas, delimitado por até quatro membranas, internamente ficam os tilacóides, estrutura onde ocorre as principais reações bioquímicas da fotossíntese (LOURENÇO, 2006). Uma grande variedade de pigmentos é encontrada nas microalgas (WOJCIECHOWSKI, 2013). A clorofila *a* é encontrada em todas as espécies, algumas espécies possuem mais de um tipo de clorofila podendo ser do tipo *b*, *c* ou *d*, os chamados pigmentos acessórios, que garantem uma maior captação de luz pelo organismo. Além da clorofila existem outros pigmentos como os carotenoides, que são solúveis em solventes orgânicos e são dotados de coloração amarela, laranja, vermelha, marrom (ANDERSEN, 2005; JACINAVICIUS *et al.*, 2013; LOURENÇO, 2006).

As microalgas foram classificadas em 10 divisões, nos quais se diferenciam entre si, desde o tamanho até mesmo a composição dos pigmentos fotossintetizantes, são elas, *Cyanophyta*, *Chlorarachniophyta*, *Glaucophyta*, *Euglenophyta*, *Cryptophyta*, *Prymnesiophyta*, *Dinophyta*, *Ochrophyta*, *Rhodophyta*, *Chlorophyta* (LOURENÇO, 2006). As espécies pertencentes às divisões *Prymnesiophyta*, *Ochrophyta* e *Chlorophyta* estão dentre as mais utilizadas na aquicultura. As *Prymnesiophyta* são

organismos unicelulares flagelados em alguma parte do seu ciclo de vida. Um membro da divisão *Ochrophytas* é a classe *Bacillariophyceae*, representada pelas diatomáceas que possuem o corpo coberto por uma frústula silicosa, podendo variar tamanhos e formatos. As clorófitas compreendem as algas verdes (LOURENÇO, 2006).

A reprodução da maioria das algas se dá por divisão binária, onde uma célula se divide em duas células idênticas (LOURENÇO, 2006). O crescimento das algas é diretamente influenciado por características físicas e químicas, à medida que a quantidade de nutrientes se torna limitada ou metabólitos tóxicos acumulam, a taxa de crescimento diminui (DE PINA *et al.*, 2021). As microalgas assim como outros microorganismos seguem uma curva de crescimento, na qual é composta por quatro fases a lag onde representa o período de adaptação da célula ao meio, há nutriente mas não possui crescimento; fase exponencial ou log, representa a maior taxa de crescimento, e o maior consumo de nutrientes; fase estacionária onde a taxa de mortalidade é igual a taxa de crescimento; e a fase de declínio onde a falta de nutrientes afeta o crescimento e elas param de se multiplicar (DE PINA *et al.*, 2021; MARIANO, 2010).

Na aquicultura as microalgas estão presentes na alimentação direta de moluscos e outros invertebrados e indireta na extração de pigmentos acessórios como a astaxantina e fucoxantina, além da extração de lipídios para obtenção de biodiesel (HEMAISWARYA *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2015). Na nutrição de cultivos de organismos aquáticos a combinação de diferentes espécies de algas proporciona uma qualidade nutricional mais equilibrada e melhorando o crescimento do animal (HEMAISWARYA *et al.*, 2011; LOURENÇO, 2006).

O teor de proteínas e vitaminas é um principal fator determinante do valor nutricional das microalgas, além dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), por exemplo o ácido araquidônico (AA), ácido eicosapentaenóico (EPA), ácido docosahexaenóico (DHA) (conhecidos comercialmente como Ômega 3 e 6) (PATIL *et al.*, 2007). *Tetraselmis* sp., *Isochrysis* sp., *Chaetoceros Muellieri* e *Nannocloropsis* sp. são exemplos de microalgas muito usadas na aquicultura e em testes de toxicidade como bioindicadores de contaminação (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2021; HEMAISWARYA *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2013).

### 2.1.1 *Tetraselmis* sp.

A *Tetraselmis* sp. é uma alga verde marinha flagelada, pertencente a classe *Chlorodendrophyceae*, ordem *Chlorodendrales*, e família *Chlorodendraceae* comumente utilizada na aquicultura, devido ao seu alto valor nutricional. São organismos unicelulares eucariontes com uma faixa de tamanho de 10-20 µm dependendo da espécie (GOSWAMI *et al.*, 2021). A *Tetraselmis* possui quatro flagelos, eles são grossos, de igual comprimento, mais curtos que o comprimento da célula, cobertos por pelos e escamas e são inseridas em uma depressão celular apical, possui um único cloroplasto em grande escala (Figura 1), essa microalga possui três estágios de vida; um estágio flagelado, imóvel (estágio vegetativo) e um estágio de cisto (ARORA *et al.*, 2013).

Se reproduz assexuadamente através da divisão simples, onde uma célula-mãe da origem a duas células-filhas (GOSWAMI *et al.*, 2021; MARIELA A. GONZÁLEZ, 2015). São Halotolerantes, ou seja, podem crescer em ambientes com salinidade alta ou baixa (0–35%), além de se adaptar a temperaturas em condições climáticas oceânicas (2–34°C) (CHANG *et al.*, 2020; SACRISTÁN DE ALVA; LUNA PABELLO, 2021). Várias espécies têm sido alvo de pesquisas fisiológicas e bioquímicas para avaliação de tolerância ao sal, bem como a produção de cepas de melhor qualidade nutricional para aquicultura, bem como proteína, e no teor de ácidos graxos, incluído EPA (ácido eicosapentaenóico) e AA (ácido araquidônico) (ADARME-VEGA *et al.*, 2014; CARDOSO *et al.*, 2020).

Figura 1 - Microalga *Tetraselmis* sp.



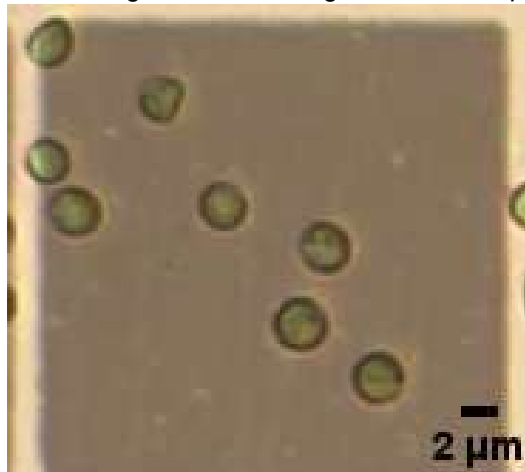
Fonte: Autora (2023)

### 2.1.2 *Nannochloropsis* sp.

A *Nannochloropsis* é uma microalga marinha unicelular e não móvel, pertence a classe *Eustigmatophyceae* e família *Eustigmataceae*. Possui uma morfologia simples, com tamanho variando de 2-8  $\mu\text{m}$  e possui plastos semelhantes a células vegetais (ZANELLA; VIANELLO, 2020). O cloroplasto com pilhas de tilacóides claramente visíveis está próximo ao núcleo, e a gotícula lipídica (LD) funciona como um depósito de energia, que pode aumentar de tamanho sob condições de estresse (Figura 2) (HUANG *et al.*, 2013; MA *et al.*, 2016; ZANELLA; VIANELLO, 2020).

Sob condições ótimas de crescimento, a quantidade e qualidade de luz, temperatura e composição do meio de cultura estão entre os principais fatores que afetam a composição química da biomassa algal, de 5 a 20% do peso seco celular é lipídio, traçando o perfil lipídico encontra-se ácidos graxos mono e poliinsaturados de maior valor nutricional (HUANG *et al.*, 2013; ZANELLA; VIANELLO, 2020).

Figura 2 - Micrografia da microalga *Nannochloropsis* sp.



Fonte: Autora (2023).

### 2.1.3 *Chaetoceros muelleri*

A *C. muelleri* é uma diatomácea marinha da classe *Bacillariophyceae* e família *Chaetocerotaceae*, as células são de coloração marrom e medem entre 5-10  $\mu\text{m}$  (DERNER, 2006) compostas de sílica que recobrem todo o corpo, podendo ser encontradas em formas solitárias ou agregadas formando colônia (Figura 3). Possuem um núcleo mais ou menos centralizado. Os cloroplastos apresentam carotenoides, as lamelas apresentam três tilacóides e os cloroplastos são envolvidos por quatro membranas, a mais externa é ligada ao retículo endoplasmático (LOURENÇO, 2006).

É uma das espécies mundialmente recomendadas para alimentação larval de crustáceos e moluscos devido ao seu alto teor de lipídios e ácidos graxos na composição (GÖKSAN; DURMAZ; GÖKPINAR, 2003). Sendo também considerada para produção de biomassa e lipídios em larga escala (WANG *et al.*, 2014).

Figura 3 - Imagem de microscopia da microalga *C. muelleri*.



Fonte: Autora (2023).

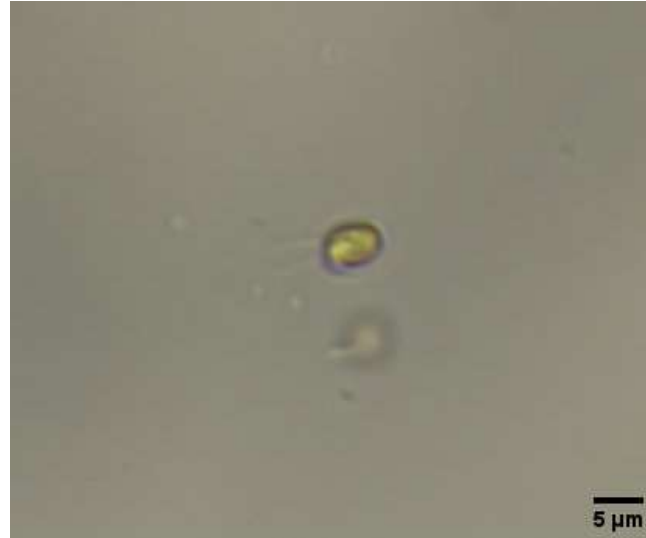
#### 2.1.4 *Isochrysis* sp.

A *Isochrysis* é uma microalga marinha unicelular fitoflagelada, pertencentes a classe *Prymnesiophyceae* e família *Isochrysidaceae*, com um tamanho de 2-7 µm, apresentam dois flagelos (Figura 4), e se locomovem na coluna d'água, possuem uma coloração marrom dourada (CUNHA, 2017). Os cloroplastos são envolvidos dentro de uma dobra de membrana do retículo endoplasmático, que se constitui num retículo endoplasmático plastidial, que se dispõem junto ao núcleo, constituído um envelope nuclear (LOURENÇO, 2006). Essa microalga também é conhecida como *Haptophyta* que é atribuído ao grupo de microalgas que possuem a presença do haptonema (estrutura vestigial, com função de orientar o movimento das células ou auxiliar na busca por alimento) (CORREIA, 2013; LOURENÇO, 2006).

Assim como as outras microalgas citadas anteriormente, a *Isochrysis* possui alto teor de ácidos graxos poliinsaturados, como DHA, um membro importante dos ômega-3, além dos ácidos graxos poliinsaturados (CORREIA, 2013). A *Isochrysis* também possui um pigmento chamado de fucoxantina, ambos componentes vitais para desenvolvimento humano do cérebro, retina e desintoxicando o corpo sendo

utilizada para a suplementação humana além da aquicultura (PROCÓPIO, 2014; SUN; WANG; LIU, 2019).

Figura 4 - Imagem da microalga *Isochrysis* sp.



Fonte: Autora (2023).

## 2.2 MEIOS DE CULTIVO

### 2.2.1 Meio líquido

Os meios de cultivo líquidos variam de acordo com sua composição química, podem ser divididos em três classes fundamentais: meios de cultura definidos, semidefinidos e indefinidos (ANDERSEN, 2005; LOURENÇO, 2006).

Os meios de cultura definidos são aqueles preparados com água de elevada pureza (destilada, deionizada ou ultrapura), adicionados os sais constituintes na água do mar e os nutrientes estimulantes ao crescimento das microalgas (ANDERSEN, 2005). Nesta condição tem-se maior controle e definição na composição do meio, em decorrência do alto custo de produção do meio definido. Essa classe de meios é utilizada para aplicações comerciais de alto valor agregado, ou podem ser empregados na manutenção de coleções de cultivo (ANDERSEN, 2005; LOURENÇO, 2006). A preparação dos meios definidos requer um manejo técnico e profissionalizado, desde a preparação da água artificial até a colocação dos nutrientes e a verificação dos parâmetros.

Os meios de cultura semidefinidos são aqueles preparados com água do mar como matriz, a qual é enriquecida com nutrientes orgânicos e inorgânicos, de composição e quantidades conhecidas, o custo de preparo dos meios semidefinidos

é relativamente mais baixa que os definidos favorecendo assim o uso em atividades variadas como a manutenção de cepas de cultivo, em laboratórios para a realização de pesquisas e a produção de biomassa algal para fins comerciais (ANDERSEN, 2005; LOURENÇO, 2006). Para a preparação dos meios semidefinidos, o manejo vem na captação e desinfecção da água do mar e a colocação dos nutrientes que vem prontos em soluções estoques.

Os meios de cultura indefinidos são feitos a partir da água do mar, enriquecida com uma mistura de nutrientes não determinada, não se sabe exatamente quais substâncias estão sendo adicionadas, apenas se sabe que estão sendo adicionadas, são meios de custo baixo porém não são comuns de serem usados em cultivos para produção comercial, pela falta de controle dos nutrientes, cultivos indefinidos são usados para manter cepas não-axênicas em coleções de cultivo, diversas espécies mixotróficas e microalgas que são difíceis de cultivar com meios definidos (ANDERSEN, 2005; LOURENÇO, 2006).

A decisão de qual meio escolher, depende do objetivo da atividade, da espécie utilizada e dos volumes de cultivo que devem ser processados (WOJCIECHOWSKI *et al*, 2013). O meio semidefinido é o mais utilizado tanto para cultivos e testes em laboratório, quanto para a produção de biomassa algacea com finalidade comercial. Existem diversos tipos de meios que variam a concentração e os tipos de nutrientes adicionados (LOURENÇO, 2006).

### 2.2.2 Meio sólido

Meios sólidos são utilizados para manter microalgas em coleções de cultivo e para isolar cepas do ambiente natural. O crescimento de microalgas no meio sólido tende a ser mais lento, tendo grande interesse para manter reservas de cepas sem que a manutenção frequente seja realizada (LOURENÇO, 2006). Meios sólidos podem ser preparados a partir de qualquer meio de cultura líquido. Basta adicionar ágar ao meio de cultura líquido, autoclavar ou aquecer o meio, e distribuí-lo ainda quente, aos frascos onde serão cultivadas as cepas (ANDERSEN, 2005; MORAES EUCLIDES, 2013).

Para o crescimento bom das microalgas em ágar, elas devem ter capacidade de crescer no meio. Alguns flagelados não crescem muito em ágar como *Heterosigma*, *Pelagomonas* e *Peridinium*, porém alguns outros como *Chlamydomonas*, *Pavlova*,

*Synura* e *Tetraselmis* crescem muito bem em ágar (ANDERSEN, 2005). A maioria das diatomáceas e os Clorarcniófitos crescem muito bem em ágar, mas dinoflagelados raramente (ANDERSEN, 2005).

### 2.3 SISTEMAS DE CULTIVO

O processo de produção da microalga garante que atenda todos os requisitos necessários para que as microalgas cresçam e se multipliquem em um curto período de tempo. Com isso vários são os fatores a serem levados em conta luz, temperatura, salinidade, taxa de crescimento e o mais importante para o nível industrial a produtividade (Produção por unidade de volume X Tempo) (Tabela 1) (SIMÕES *et al.*, 2016).

Tabela 1 - Sistema de cultivo de microalgas.

SISTEMA	TIPO	PARÂMETROS	ESCALA
Cultivo Estático	FECHADO	Controle de todos os parâmetros: temperatura, luminosidade, filtração de ar e água, pH.	De tubos de ensaio a bolsas de produção de biomassa (30-150 L).
Fotobiorreator	FECHADO	Controle de todos os parâmetros	Podem ser construídos de diversos tamanhos.
Raceways	ABERTO	Controle de pH e nutrientes	Grandes volumes, produção em larga escala.

Fonte: Adaptado de Guimarães (2012); Simões *et al.* (2016)

### 2.4 TÉCNICAS DE ISOLAMENTO DE CEPAS CONTAMINADAS

O isolamento de microalgas consiste em separar células de interesse de outras células ou de microrganismos. Existem diversos métodos de isolamento de microalgas, o método deve ser escolhido de acordo com o tipo das espécies que quer isolar (flagelados, ciliados, diatomáceas) (WOJCIECHOWSKI *et al.*, 2013). Dos métodos de isolamentos conhecidos, destacam-se a diluição sucessiva, a pipetagem e o meio sólido (Tabela 2):

Tabela 2 - Técnicas de Isolamento de microalgas.

<b>TÉCNICA DE ISOLAMENTO</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>	<b>RECOMENDAÇÃO</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>
Diluição sucessiva	Dilui a amostra sucessivamente, resultando em uma progressão geométrica da concentração em forma logarítmica.	Separação de organismos abundantes na amostra.	(ANDERSEN, 2005; SINGH <i>et al.</i> , 2015)
Pipetagem	Localização da microalga de interesse em pequena porção de líquido, coletar as células de interesse utilizando uma pipeta Pasteur, ou, capilar e transferida para uma porção fresca de meio de cultivo.	Células maiores de 10 µm.	(ANDERSEN, 2005; LOURENÇO, 2006)
Meio Sólido	Adiciona uma gota da amostra original com a microalga de interesse é depositada na parte periférica da placa de ágar e com uma alça bacteriológica espalha-se em movimentos de zig-zag sobre a placa.	Microalgas pertencentes ao nanoplâncton e ao picoplâncton.	(ANDERSEN, 2005; LOURENÇO, 2006)

Fonte: Autora (2023).

### 3. METODOLOGIA

A parte experimental deste estudo foi desenvolvida no Centro de Estudo do Mar da Universidade Federal do Paraná, numa parceria entre os Laboratórios de Ecotoxicologia (LABTOX), Laboratório de Microalgas (LAMIC) e Laboratório de Engenharia e Malacocultura (LEMAqui).

#### 3.1 OBTENÇÃO DAS CEPAS

As microalgas marinhas utilizadas neste estudo foram cepas das espécies *Tetraselmis* sp., *Isochrysis* sp., *C. muelleri* e *Nannochloropsis* sp. que foram gentilmente doadas pelos professores Dr. Francisco José Lagreze Squella (LEMAqui) e Dr. Luiz Laureno Mafra Junior (LaMic), ambos com sede na Universidade Federal do Paraná – Centro de Estudos do Mar. As microalgas foram repicadas e mantidas em sistema estático, sendo feitas sempre três réplicas de cada espécie.

#### 3.2 PREPARAÇÃO DAS VIDRARIAS

No processo de limpeza de vidrarias novas utilizou-se banho de ácido nítrico 10%, por 24 horas, foram enxaguadas com água da torneira (10x) e destilada (10x), deixadas secar a temperatura ambiente e depois autoclavadas. Para as vidrarias usadas com cultivos de microalgas, as vidrarias foram previamente escovadas com hipoclorito de sódio e detergente neutro não fosfatado (extran 5%), enxaguadas com água da torneira, deixadas em banho de ácido nítrico 10% por 24 horas, enxaguadas com água da torneira (10x) e destilada (10x), deixadas secar a temperatura ambiente e depois autoclavadas.

#### 3.3 PREPARAÇÃO DO MEIO LÍQUIDO DE CULTIVO

A elaboração do meio de cultivo Conway seguiu a metodologia de WALNE, 1966, que é expressa na NBR 16181:2021 Ecotoxicologia aquática – Método de ensaio com microalgas marinhas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2021). O meio Conway é composto por quatro soluções estoque: Principal, metais, vitaminas e silicato, expressas pelas seguintes componentes (Tabela 3).

Tabela 3 - Soluções para o meio de cultivo Conway.

Solução	Reagente	Quantidade	Preparo
<b>Solução principal</b>	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,30 g	Dissolver e completar para 1000 mL com água processada. Adicionar 1,0 mL da solução de metais.
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,36 g	
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	33,6 g	
	EDTA (Na sal)	45 g	
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	20 g	
	NaNO <sub>3</sub>	100g	
<b>Solução de metais</b>	ZnCl <sub>2</sub>	2,1 g	Dissolver e completar para 100 mL com água processada.
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2,0 g	
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,90 g	
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	2,0 g	
<b>Solução de Vitaminas</b>	B <sub>12</sub> (cianocobalamina)	0,002g	Dissolver e completar para 1000 mL com água processada.
	B <sub>1</sub> (tiamina) Biotina	0,1 g 0,001 g	
<b>Solução de silicato</b>	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .H <sub>2</sub> O	4,0 g	Dissolver e completar para 100 mL com água processada.

Fonte: NBR 16181/2021 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2021)

Os reagentes foram pesados e diluídos em água ultrapura. Para cada 1 L de água do mar filtrada se utilizou a proporção de 1 mL de solução principal + metais (conforme preparo indicado na Tabela 1), 1 mL de solução de vitaminas e 2 mL de solução de silicato. Após adicionar todos os nutrientes agitou-se vigorosamente a mistura e com o auxílio de um pHmetro, mediu-se o pH do meio e retirou-se uma amostra para medir a dureza do meio e a salinidade. Com todos os parâmetros medidos o meio foi autoclavado. O pH do meio obtido foi de 8,03, salinidade de 32ppm e dureza de 4706,6 mg CaCO<sub>3</sub>/L.

### 3.4 DILUIÇÃO SUCESSIVA

Para a diluição sucessiva foram preparados quatro tubos de ensaios limpos e numerados de 1 a 4, com 5 mL de meio de cultivo Conway líquido e autoclavado. No fluxo laminar, retirou-se 1 mL do cultivo de microalga contaminado e adicionou no tubo número 1. Em seguida agitou-se o tubo e realizou o mesmo processo diluindo 1 mL do tubo 1 para o tubo 2, e assim sucessivamente. Os tubos com as diluições foram fechados e foram deixados sob iluminação, com irradiação mínima de 5000 lux, em uma temperatura de 20 ± 2 °C por 7 dias, agitando os tubos todos os dias, com auxílio de um vórtex. Após o crescimento das microalgas no tubo com menor concentração (tubo 3 ou 4) realizou o processo de diluição novamente e repetiu a sequência mais duas vezes, até o cultivo de maior diluição que crescer e estar sem contaminação.

### 3.5 PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO SÓLIDO NAS PLACAS

Com o meio Conway líquido preparado, pesou-se em uma balança analítica 15 gramas de ágar bacteriológico e diluiu em 1 L de meio de cultivo Conway, com o auxílio de um agitador magnético a completa dissolução do ágar na concentração final de 1,5%. Com a solução meio de cultivo + ágar bem homogeneizado, autoclavou-se o meio. No fluxo laminar previamente esterilizado com luz UV e etanol 70 %, foram distribuídas as placas de petri de 50mm estéreis e foram deixadas na UV até o término do processo de autoclave.

Com o meio Conway + ágar ainda quente, despejou-se a solução nas placas de petri até atingir 50 % do volume, dentro do fluxo laminar. As placas com meio foram deixadas sob o fluxo laminar fechado para esfriar e solidificar. Com o meio sólido, as placas foram deixadas sob a lâmpada UV ligada por 20 minutos para evitar contaminação por bactérias. Passado o tempo de esterilização as placas estavam prontas para inoculação das microalgas. As placas com meio sólido foram armazenadas em geladeira fechadas com parafilme e embaladas em filme PVC até serem utilizadas.

### 3.6 INOCULAÇÃO DAS MICROALGAS EM MEIO SÓLIDO

Iniciou-se o processo de determinação do melhor método de inoculação das placas iniciando com um método simples e evoluindo o processo com o passar dos testes para aumentar a taxa de sucesso.

#### 3.6.1 Método 1

Para o método 1, com uma placa de ágar (120mm) + meio de cultivo Conway, dentro do fluxo laminar limpo e esterilizado previamente com luz UV, adicionou 1mL do cultivo de microalga sobre a placa de petri e movimentou a placa cuidadosamente em movimentos circulares para espalhar a microalga sob o meio sólido. A placa foi fechada com parafilme e foi deixada em incubadora sob iluminação constante sem fotoperíodo a uma temperatura de  $20 \pm 2$  °C para crescer.

#### 3.6.2 Método 2

Para o método 2, utilizou uma placa de petri de ágar (120mm) + meio de cultivo Conway, dentro do fluxo laminar, como o auxílio de uma lamparina, uma alça de

Drigalski de vidro. Flambou a alça de Drigaski para completa esterilização, com a alça fria adicionou 1 mL do cultivo na placa, e com a alça movimentou-se levemente a placa para os dois lados a fim de distribuir todo o cultivo sobre a placa. Vedou-se a placa com parafilme e foi deixada em incubadora com temperatura de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  e sem fotoperíodo.

### 3.6.3 Método 3

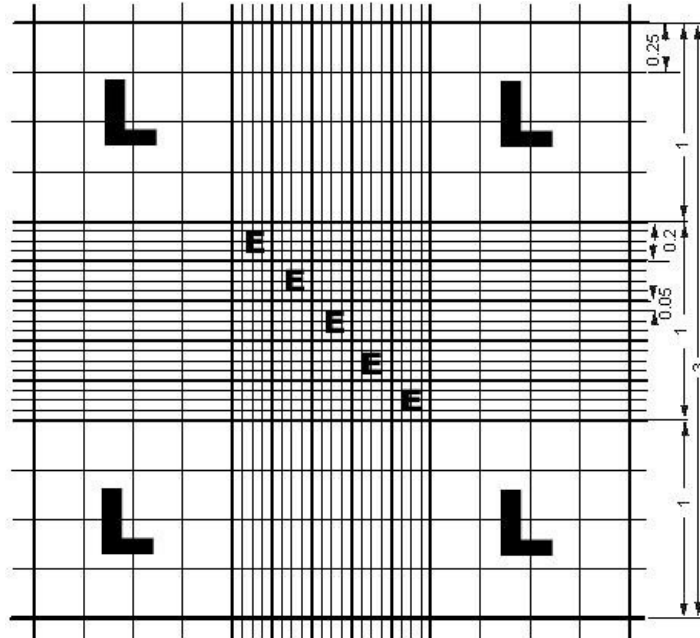
Para o método 3 foi utilizada as metodologias de Heasman *et al.* (2000) e Andersen (2005), onde os cultivos líquidos de microalgas contaminados foram centrifugados para aumentar o número de células por mL e assim isolar microalgas de bactérias ou outras microalgas de menor densidade. Algumas microalgas são sensíveis a grandes rotações, um exemplo delas é a *C. muelleri* que possui frústulas de silicato que podem se quebrar, e até mesmo estourar liberando o citoplasma para fora da célula. A centrifugação foi realizada em uma centrífuga de bancada (KASVI K14-0815P) que comporta oito tubos com 15 mL. As amostras de cultivo de microalgas foram transferidas para tubos de centrífuga estéreis do tipo falcon de 15 mL devidamente identificados. As amostras foram centrifugadas a uma velocidade de  $1300\times g$  por 10 minutos, a uma temperatura de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ , as amostras centrifugadas cuidadosamente foram retiradas da centrífuga para evitar a ressuspensão e com uma pipeta estéril de 5 mL retirou-se o sobrenadante, concentrando as células das microalgas em 1 mL. Em seguida os tubos foram agitados com o auxílio de um vórtex para ressuspender todas as células sedimentadas. Uma alíquota dessa suspensão foi retirada para contagens de células no microscópio. Os tubos com as amostras centrifugadas foram levados até o fluxo laminar para inoculação das placas, foi utilizado 200  $\mu\text{L}$  de amostra para cada placa de petri de 50 mm previamente preparada com meio Conway sólido, com auxílio de uma alça bacteriológica estéril foi espalhada a amostra por toda a placa. As placas então foram levadas para incubadora, com temperatura de  $20\pm 2^{\circ}\text{C}$  e sem fotoperíodo por 7 dias.

### 3.7 CONTAGEM DE CÉLULAS

Todas as amostras foram contadas a partir de uma câmara de Neubauer. A contagem seguiu as recomendações do fabricante, sendo contadas células grandes

(>10  $\mu\text{m}$ ) nos compartimentos L e células pequenas (<10  $\mu\text{m}$ ) nos compartimentos E, assim como mostrado na Figura 5.

Figura 5 - Câmara de Neubauer.



Fonte:(DELIAMC, 2014)

### 3.8 RESSUSPENSÃO EM MEIO LÍQUIDO

Depois de 7 dias as placas que possuíram melhor crescimento das algas, foram ressuspensas, as placas foram abertas e com uma alça bacteriológica estéril de 1  $\mu\text{L}$  esfregou-se na placa com a microalga e retirou uma alíquota de células e mergulhou a alça em 2 mL de meio de cultivo em um tubo de ensaio. Agitou a alça para a completa transferência de células, repetiu esse processo em mais três tubos de ensaio fazendo uma quadruplicada das amostras de ressuspensão, as amostras foram levadas para incubadora a  $20 \pm 2$  °C sem fotoperíodo, esse processo foi realizado para as quatro espécies trabalhadas, foi contado o número de células ressuspensas no dia da inoculação no meio líquido e no final de 7 dias, a fim de avaliar se as amostras apresentaram crescimento ou não, calculando através da fórmula de Monod (Equação 1). Os tubos de ensaios foram agitados uma vez por dia todos os dias até o final do experimento.

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{X_f}{X_o}\right)}{(T_f - T_o)} \quad (1)$$

Onde:

$\mu$ : Taxa de crescimento exponencial;  
 $X_f$ : Densidade de células final;  
 $X_o$ : Densidade de células inicial;  
 $T_f$ : Tempo final;  
 $T_o$ : Tempo inicial.

### 3.9 OBTENÇÃO DA ÁREA DE CRESCIMENTO DE MICROALGAS NA PLACA

Estes testes foram realizados com três concentrações diferentes de microalgas em suspensão para cada espécie, e para cada concentração se inoculou quatro placas, o resultado obtido foi quantificado em planilha eletrônica onde foram tratados a fim de encontrar a média e o desvio padrão. As imagens das placas no início e no final (7 dias) foram tiradas com câmera acoplada no microscópio (XCAM 2.0 MP). As fotografias das placas foram tiradas com câmera de 50 MP, e as imagens foram tratadas a partir do Software ImageJ (versão bundled com 64-bit Java 8), onde foi usado o ajuste de contraste para avaliar o crescimento nas placas. Com o próprio software foi possível calcular a área total da placa e as áreas de crescimento da microalga.

O crescimento das placas foi quantificado usando uma subtração simples da área da placa inoculada final (após 7 dias) menos a área inicial (dia da inoculação). Com o resultado da subtração foi possível avaliar o crescimento da microalga, resultado positivo: cresceu, resultado negativo: não cresceu. Para o cálculo da porcentagem total da área de crescimento das microalgas foi dividido a área da placa inoculada final pela área total da placa, o resultado obtido correspondeu a porcentagem de crescimento da placa.

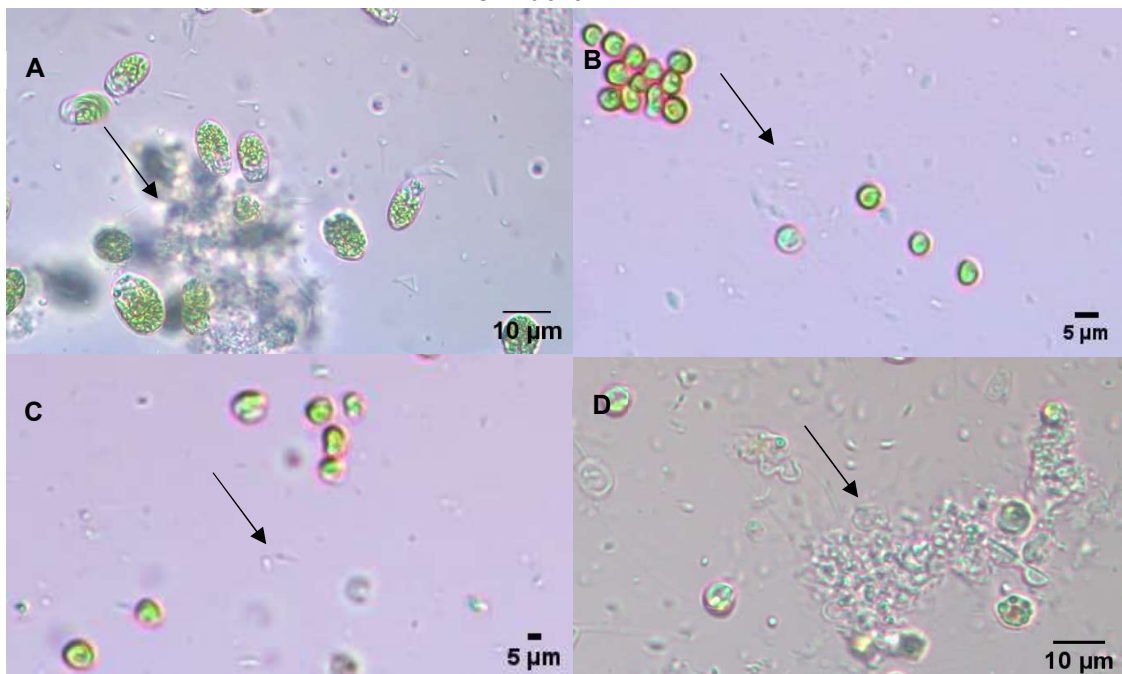
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 TESTES PRELIMINARES DE INOCULAÇÃO

Os testes preliminares de inoculação iniciaram no final de 2022 com o início de uma Iniciação Científica que visa a implantação da Coleção de Microalgas do Centro de Estudos do Mar. Os testes preliminares foram realizados para avaliar os métodos propostos de inoculação em meio sólido, e o método que obtivesse melhor crescimento e um isolamento das cepas sem contaminação, seria testado a fim de comprovar sua eficiência.

Todas as cepas de microalgas disponibilizadas para este estudo apresentaram contaminação evidente de microrganismos diversos além da microalga de interesse, como bactérias, protozoários e fungos. A presença desses microrganismos foi identificada visualmente pelo microscópio ótico, conforme registro nas imagens apresentadas na Figura 6.

Figura 6 - Micrografia da microalga com contaminação por microrganismos, as setas pretas apontam contaminação por bactérias. A. *Tetraselmis* sp.; B. *Nannochloropsis* sp.; C. *Isochrysis* sp.; D. *C. muelleri*.

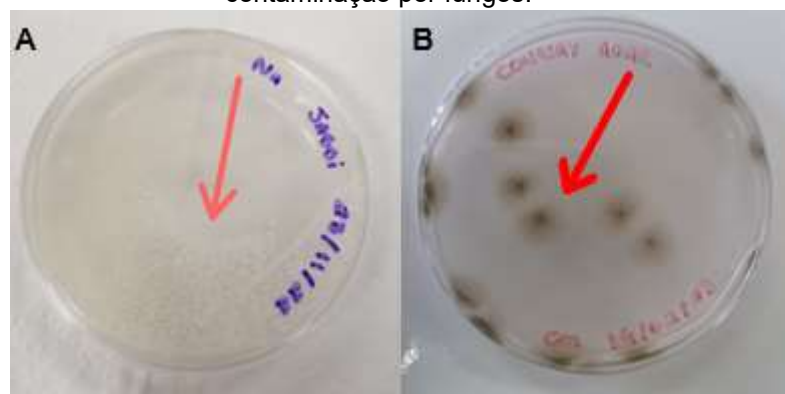


Fonte: Autora (2023).

Com o início dos testes de inoculação em meio sólido utilizando o método 1 e 2, a contaminação visualizada em microscópio foi confirmada pelo crescimento de bactérias (Figura 7 A), e em algumas placas, pela presença de fungos (Figura 7 B).

As placas testadas com essas técnicas não apresentaram crescimento visual da microalga de interesse, devido a quantidade muito baixa de células de microalgas em relação a quantidade de outros microrganismos. Como a placa de ágar é um meio rico em nutrientes para crescimento de vários microrganismos, neste caso as bactérias e fungos acabam ganhando espaço e dominando em crescimento quando comparado as microalgas.

Figura 7– A. Placa de meio sólido utilizando o método 1, microalga *Nannochloropsis* sp. com contaminação de bactérias; B. Placa de meio sólido utilizando o método 2, microalga *C. muelleri* contaminação por fungos.



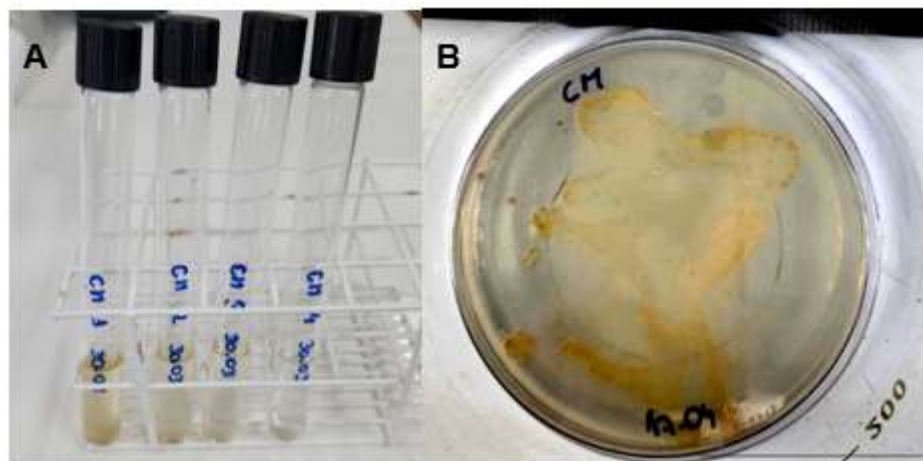
Fonte: Autora (2023).

Com o objetivo de minimizar essa contaminação, foi iniciado o protocolo de diluição sucessiva, e em contrapartida, testes de novos métodos para inoculação de microalgas em meio sólido com um crescimento mais rápido e sem precisar de manutenção frequente. Depois das diluições sucessivas, as cepas de microalgas foram mantidas em cultivo estático em tubos de ensaio, sob luz sem fotoperíodo com temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ .

O protocolo de diluições sucessivas começou a apresentar resultados positivos para a purificação das microalgas de interesse (Figura 8 A). Com crescimento lento, mas constante e um cultivo mais limpo, observou um aumento no número de células de microalgas nos cultivos. Conseqüentemente, estes cultivos após o protocolo de diluições sucessivas apresentaram um melhor crescimento na placa em meio sólido (Figura 8 B). Contudo, algumas amostras ainda apresentaram contaminação por bactérias após a diluição sucessiva. Com isso, foi desenvolvido a aplicação do método 3 de inoculação, com o uso de centrifugação, contribuindo assim para um aumento na concentração de células de microalgas e favorecendo seu crescimento em comparação com outros microrganismos indesejados, evitando uma contaminação

futura. O método 3 foi a técnica de inoculação em meio sólido após diluição sucessiva que apresentou maior crescimento de microalgas em relação a bactérias, devido ao aumento significativo de células de microalgas inoculadas na placa inicialmente. Com isso, esse método foi o escolhido para avaliação da sua eficiência de manutenção das microalgas inoculadas em meio sólido.

Figura 8- A. Diluição sucessiva da microalga *C. muelleri*; B. Placa de meio sólido utilizando o método 3, microalga *C. muelleri* barra de escala 5cm.

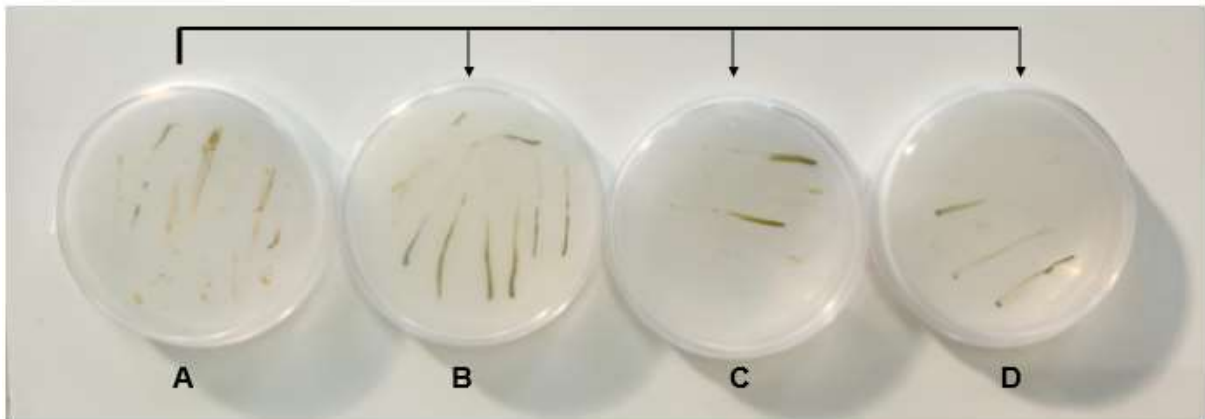


Fonte: Autora (2023).

Além dos resultados satisfatórios do crescimento visual de todas as espécies na placa utilizando o método 3, foi dado início a manutenção das espécies nas placas e avaliação da durabilidade delas em meio sólido. Os testes preliminares foram realizados com a *Nannochloropsis* sp., pois foi a primeira espécie que teve seu cultivo purificado e em contrapartida o que melhor cresceu. A placa foi inoculada e após 7 dias foi repicada para uma nova placa, a fim de evitar contaminação. Com essa placa a cada 15 dias era repicado para uma nova placa através de alça bacteriológica.

Com isso, a *Nannochloropsis* sp. cresceu e se desenvolveu em novas placas até 45 dias depois da sua inoculação. Percebeu-se uma perda na coloração verde para amarelada depois dos 45 dias da placa inicial, o que indicaria o início da fase de declínio das células em meio sólido, mas mesmo com a troca de placa após 45 dias obteve crescimento da microalga em meio sólido na nova placa (Figura 9).

Figura 9 Teste de durabilidade do cultivo sólido com microalga *Nannochloropsis* sp. A. Placa com 7 dias após a inoculação; B. Placa inoculada 15 dias após a inoculação da placa A; C. Placa inoculada 30 dias após a inoculação da placa A; D. Placa inoculada 45 dias após a inoculação da placa A.



Fonte: Autora

#### 4.2 INOCULAÇÃO DAS MICROALGAS EM MEIO SÓLIDO UTILIZANDO O MÉTODO 3

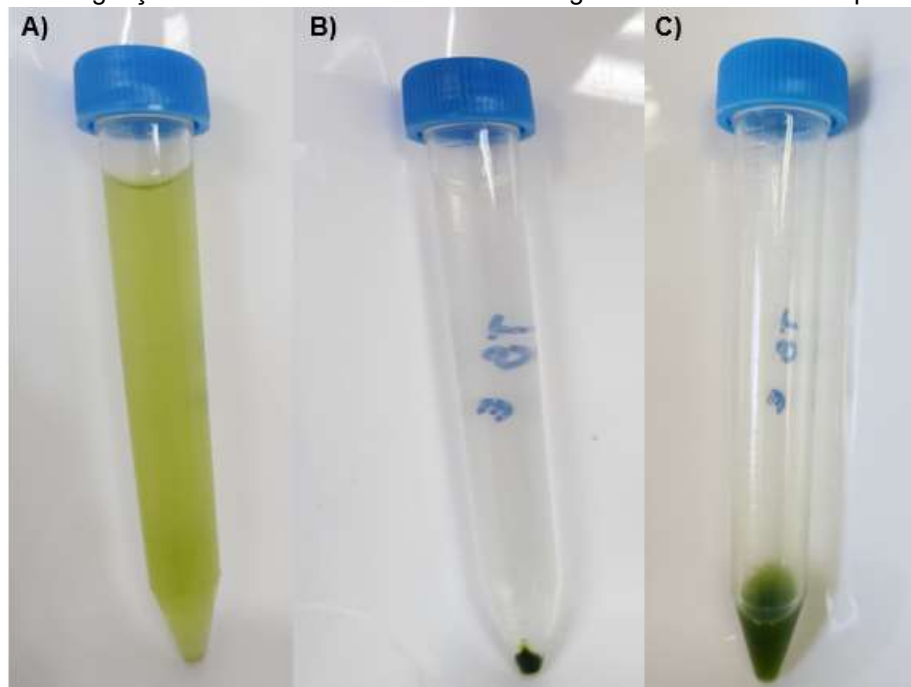
Com as cepas purificadas iniciamos o experimento, no qual foi testado o método 3 como um protocolo operacional de inoculação de microalgas em meio sólido, utilizando a metodologia descrita. As cepas purificadas por diluição sucessiva apresentaram coloração e aspecto esperado para um cultivo saudável (Figura 10), e uma densidade celular adequada para início dos testes, células  $>10 \mu\text{m}$  densidade após centrifugação de  $1 \times 10^5 \text{ cel.mL}^{-1}$ ; células  $<10 \mu\text{m}$  densidade após centrifugação superior a  $1 \times 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$  (esses valores foram os encontrados no próprio trabalho). Uma alíquota de cada um dos cultivos de microalgas foi retirada, antes e depois da centrifugação (Figura 11), para serem contadas em câmara de Neubauer.

Figura 10 – Cultivos de microalga purificados após diluição sucessiva e mantidos em cultivo estático. *Nannochloropsis* sp. (Na). *Isochrysis* sp. (ISO). *Tetraselmis* sp. (TS). e *C. muelleri* (CM) purificados por diluição sucessiva.



Fonte: Autora (2023).

Figura 11 – Detalhamento das etapas do método 3. A) Amostra de microalga antes de ir para a centrifugação; B) Amostra recém tirada da centrifuga; C) Amostra após o descarte do sobrenadante e a agitação da biomassa decantada. Microalga da foto *Tetraselmis* sp.



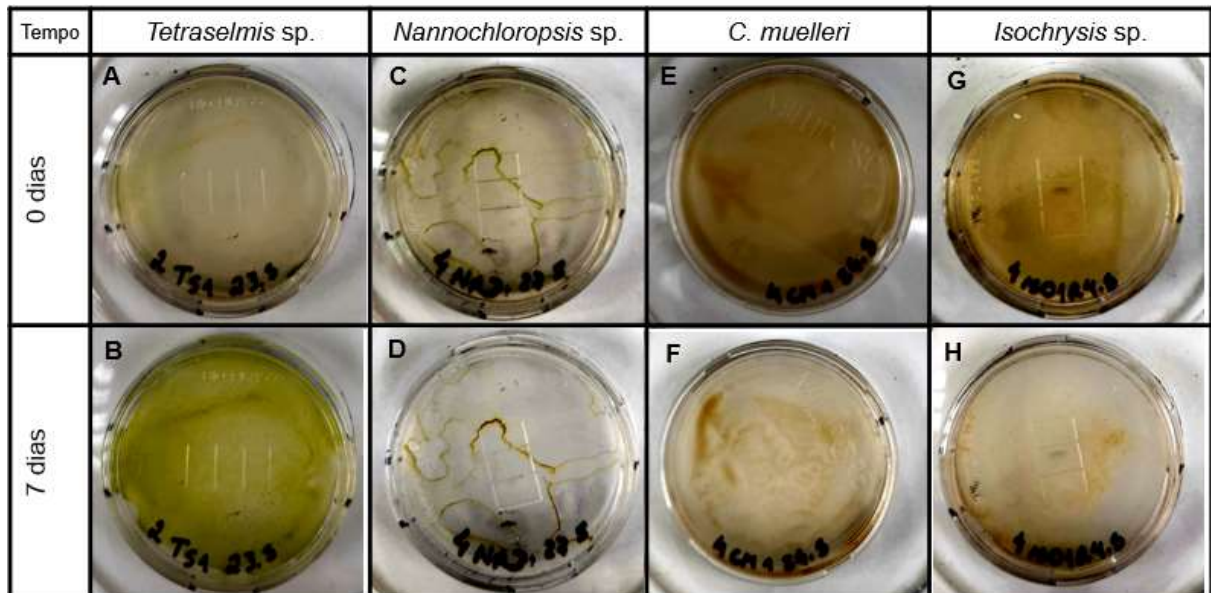
Fonte: Autora

Considerando a etapa de centrifugação da metodologia descrita, alguns autores como Heasman *et al.* (2000) e Andersen (2005), falaram sobre a fragilidade das células de algumas microalgas quando submetidas à altas rotações, causando danos estruturais como perdas de células viáveis por explosão ou quebra de frústulas

em diatomáceas. Utilizando o tempo e a rotação descrita, foi avaliado no microscópio os danos causados nas microalgas após centrifugação.

Não foi observado danos estruturais evidentes das microalgas: as microalgas flageladas como a *Tetraselmis* sp. e a *Isochrysis* sp. demonstraram natação normal, e a diatomácea *C. muelleri* apresentou suas frústulas intactas. Com isso essa metodologia demonstrou ser adequada, a as microalgas foram inoculadas após centrifugação. As imagens das placas recém inoculadas (T=0) e depois de 7 dias (T=7) foram registradas e são apresentadas na Figura 12, para comparação e avaliação da taxa de crescimento das microalgas em meio solido.

Figura 12 - Fotos tratadas com o software ImageJ do tempo zero e de 7 dias respectivamente das microalgas estudadas A – B. *Tetraselmis* sp.; C – D. *Nannochloropsis* sp.; E – F. *Isochrysis* sp.; G – H. *C. muelleri*.



Fonte: Autora (2023)

Após 7 dias da inoculação, as placas que obtiveram maior crescimento visual no meio sólido foram ressuspensas em meio líquido a fim de avaliar a viabilidade e crescimento das microalgas que foram mantidas em meio solido por esse período. Além disso, as imagens das placas registradas nos dias 0 e 7 foram tratadas no software ImageJ com o objetivo de avaliar e medir as áreas de crescimento das microalgas nesse período. Os dados foram organizados e são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Demonstração dos resultados obtidos seguindo o método de inoculação 3 e a avaliação do crescimento das microalgas no meio sólido após 7 dias de inoculação.

Espécie	Ensaio (n=4)	Densidade celular inicial ( $\times 10^6$ cel.mL <sup>-1</sup> ) em suspensão	Densidade celular após centrifugação ( $\times 10^6$ cel.mL <sup>-1</sup> ) para inoculação [1]	% de placas com Crescimento [2]	Área de crescimento na placa (%) [3]
<i>Tetraselmis</i> sp.	1	0,776	9,46	100	92 ± 5
	2	0,53	8,9	100	64 ± 15
	3	0,086	4,3	100	74 ± 8
<i>Isochrysis</i> sp.	4	3,07	33,2	25	31 ± 13
	5	2,08	31	75	23 ± 25
	6	1,88	30,5	50	8 ± 4
<i>C. muelleri</i>	7	2,39	28,5	100	39 ± 24
	8	2,31	20,2	50	8 ± 19
	9	1,01	16,1	50	10 ± 3
<i>Nannochloropsis</i> sp.	10	16,1	318	100	10 ± 6
	11	15,5	130	100	13 ± 10
	12	9	103	75	13 ± 17

[1] Fator de concentração 15/1.

[2] Placas que tiveram área > 0 na subtração com a área inicial (Anexo 1).

[3] Porcentagem de crescimento da microalga na área da placa depois de 7 dias.

Fonte: Autora (2023).

Algumas observações feitas ao logo desse período são importantes para serem destacadas: a espessura do meio de cultura sólido (meio Conway + ágar) na placa (Como o meio sólido foi despejado nas placas sem muito critério de quantidades, algumas placas ficaram mais espessas que outras) e a incidência de luminosidade sobre elas faz com que o meio sólido opaco se torne mais translúcido com o tempo, esse efeito foi visível nas placas da *Isochrysis* sp. e *C. muelleri*, pois o meio sólido nessas placas foi feito no mesmo dia da inoculação. Já para as placas da *Tetraselmis* sp. e *Nannochloropsis* sp., o meio sólido nessas placas foram feitos no dia anterior da inoculação. Essas diferenças não interferiram nos resultados deste estudo, pois a imagem dos cultivos das microalgas inoculadas foi tratada no software para ajuste no contraste.

Considerando os resultados obtidos nesse experimento, foi possível observar que para as quatro espécies testadas, a densidade celular na inoculação das placas interfere no seu crescimento em longo prazo. Dentre as espécies de microalgas testadas, a *Tetraselmis* sp. e *Nannochloropsis* sp. apresentaram os melhores resultados de crescimento em meio sólido, onde 100% das placas inoculadas para a *Tetraselmis* sp. cresceram, e uma média de 92% das placas *Nannochloropsis* sp. cresceram. Esses resultados independem da densidade celular inoculada. Cabe

destacar aqui que a *Nannochloropsis* sp. apesar ter um elevado número de placas com crescimento, a área de espalhamento da microalga na placa foi menor. Uma hipótese que pode explicar essa não conformidade vista nessa espécie, pode se dar pelo tamanho reduzido da célula desta espécie comparada as demais espécies testadas. Não foram encontrados dados na literatura que correlacionem tamanho e área de crescimento em meio sólido que corroborem com essa hipótese, outra hipótese que poderia ser avaliada seria na intensidade de cor do primeiro ao último dia de testes visto que a *Nannochloropsis* sp. é uma célula pequena e não móvel o que dificultaria a locomoção para outras áreas da placa.

A *C. muelleri* cresceu relativamente bem na maior densidade celular de inoculação com um bom crescimento da área de placa ( $39 \pm 24\%$ ), e nas réplicas com a maior concentração obteve um crescimento em todas as placas.

Já para a *Isochrysis* sp., esta foi a espécie que obteve resultados mais distintos dentre as espécies testadas. Na maior concentração de densidade celular de inoculação era esperado um maior crescimento, mas foi observado um crescimento em meio sólido de apenas 25% das placas inoculadas. O melhor resultado para essa microalga entre as três concentrações testadas, foi na densidade de inoculação de  $310 \times 10^5$  cel/mL que obteve um crescimento em 75% das placas. Não há muitos trabalhos na literatura especificando e correlacionando o tamanho das células ao crescimento das microalgas nas placas de meio sólido, mas o que foi avaliado dentro do laboratório e testados em todos os métodos concentrações maiores de células garantem um maior aproveitamento de material, pois aumentam as chances de sucesso no crescimento da microalga na placa.

#### 4.3. TESTES DE RESSUSPENSÃO DAS MICROALGAS DO MEIO SÓLIDO PARA O MEIO LÍQUIDO

Para os ensaios de ressuspensão das microalgas do meio sólido para o meio líquido, foram escolhidas as placas com melhor crescimento de cada espécie ao longo de 7 dias (Figura 12). As microalgas foram resuspensas seguindo a metodologia em meio Conway líquido e foram acompanhadas por 7 dias após a ressuspensão. A densidade celular inicial foi contada logo após a ressuspensão e novamente contada

no final dos 7 dias. Os resultados foram organizados e tratados e os dados são expressos na Tabela 4, a fim de acompanhar a taxa de crescimento das microalgas.

Tabela 5 – Taxa de crescimento celular das espécies de microalgas ressuspendidas do meio sólido para o meio líquido Conway após de 7 dias (n=4). Dados da literatura apresentados para as espécies em meio líquido Guillard f/2.

Espécie	Densidade celular média inicial ( $\times 10^4$ cel.mL <sup>-1</sup> ), T = 0 d	Densidade celular média final ( $\times 10^4$ cel.mL <sup>-1</sup> ), T = 7 d	$\mu$ (dias <sup>-1</sup> )	Taxa de crescimento na literatura	Temperatura na literatura
<i>Tetraselmis</i> sp.	32,94	76,15	0,12 $\pm$ 0,05	0,39 <sup>A</sup>	25 $\pm$ 2°C
<i>Isochrysis</i> sp.	37,13	646,25	0,40 $\pm$ 0,02	0,47 <sup>B</sup>	25 $\pm$ 2°C
<i>C. muelleri</i>	12,9	568,13	0,54 $\pm$ 0,05	0,56 <sup>C</sup>	25 $\pm$ 2°C
<i>Nannochloropsis</i> sp.	72,9	2035	0,48 $\pm$ 0,00 7	0,36-0,47 <sup>D</sup>	28°C

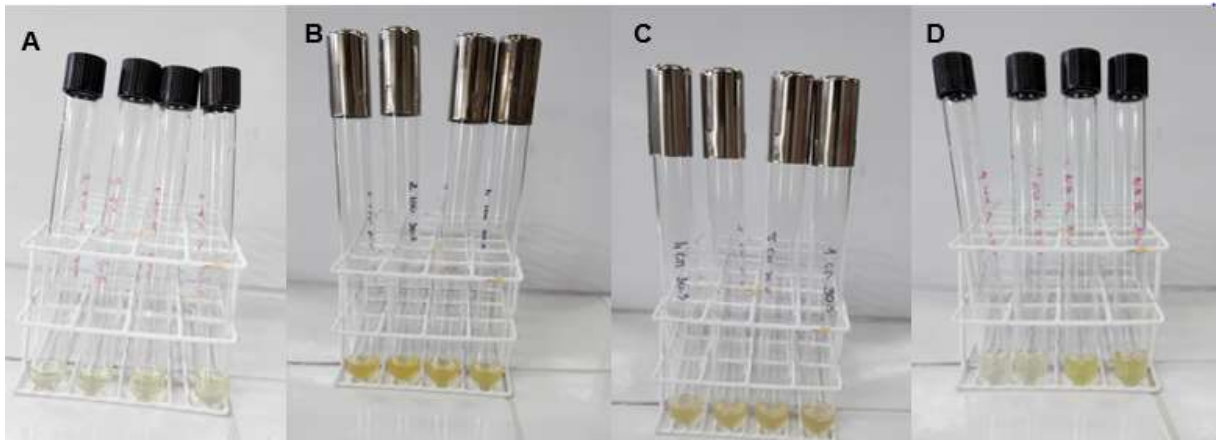
Fonte: Autora (2023); A. (OHSE *et al.*, 2008); B. (OHSE *et al.*, 2008); C. (HOLANDA, 2017); D. (SALES, 2015).

Este ensaio teve como objetivo a avaliação da viabilidade dessas cepas na transição sólido – líquido. A taxa de crescimento destas microalgas no retorno ao meio líquido foi avaliada pela densidade celular inicial e final do período de teste de 7 dias, utilizando a Equação 1. Todas as microalgas ressuspendidas apresentaram crescimento expressivo após ressuspensão em meio líquido, com aumento exponencial da densidade celular, além do crescimento visual (Figura 13).

Em relação a taxa de crescimento apontado na literatura (Tabela 4), diversos fatores influenciam essa taxa: salinidade, temperatura, pH, proporção de nutrientes, além do tamanho celular.

Das microalgas testadas, a *Tetraselmis* sp. a espécie teve sua taxa de crescimento mais distintas dos valores relatados na literatura, quando comparado as demais espécies testadas.

Figura 13 – Amostras de microalgas ressuspendidas após 7 dias de inoculação. A. *Tetraselmis* sp.; B. *Isochrysis* sp.; C. *C. muelleri*; D. *Nannochloropsis* sp.

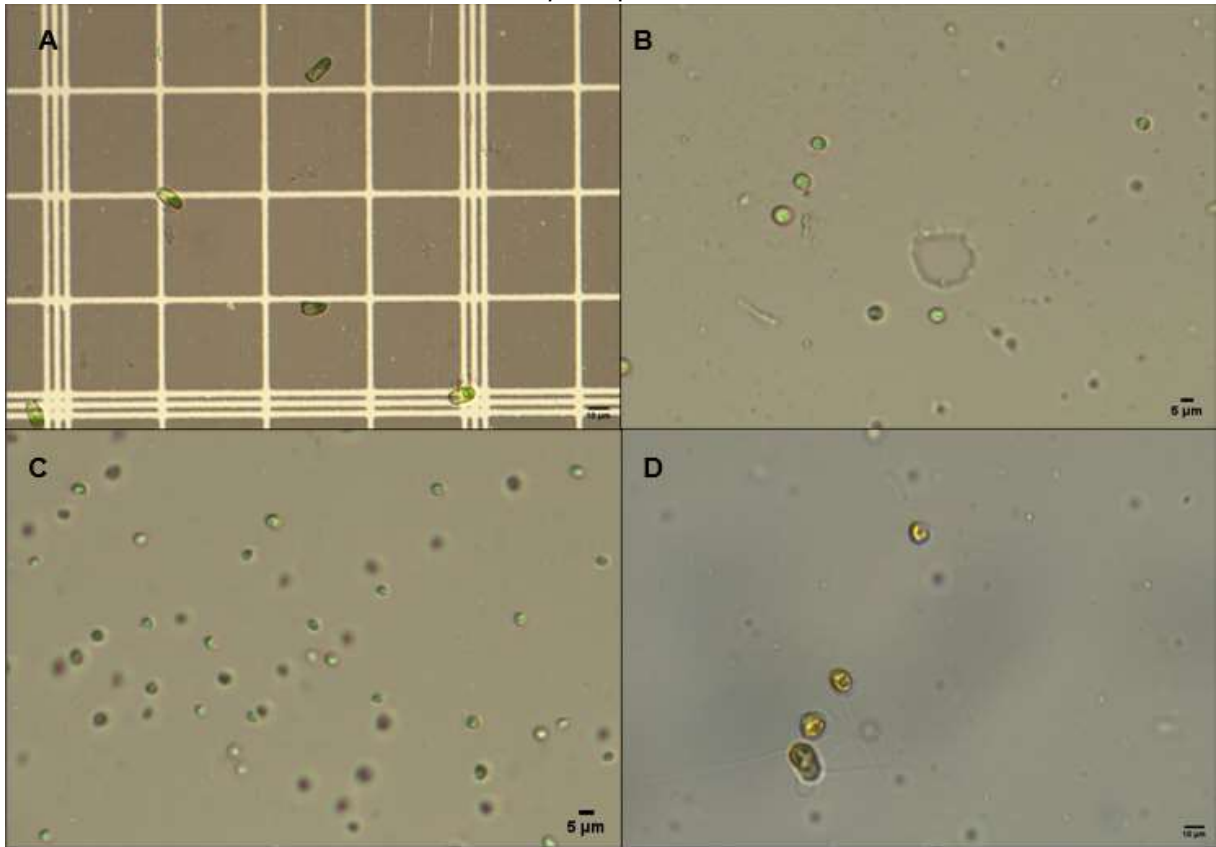


Fonte: Autora (2023)

Conforme relatado previamente por Andersen (2005) e Heasman *et al.* (2000), a *C. muelleri* poderia sofrer danos em relação a quebrar a frústula quando empregado a metodologia da centrifugação e assim prejudicar na divisão celular e no seu crescimento. Contudo, esta espécie apresentou uma taxa de crescimento mais próximas dos valores reportados na literatura, demonstrando que a centrifugação não ocasionou prejuízos as células, quanto a estrutura e divisão celular.

Com os resultados apresentados nestes estudos, foi possível demonstrar que a etapa de centrifugação auxiliou para a concentração de células, garantindo um crescimento adequado das microalgas, além de diminuir a contaminação das cepas. A metodologia apontou resultados no crescimento das microalgas na placa, e em fase preliminar a durabilidade das cepas em cultivo sólido por mais tempo sem manutenção (até 45 dias). Já na viabilidade delas na ressuspensão sem contaminação, apesar das cepas apresentarem crescimento, também apresentaram algumas bactérias (Figura 14), porém menos contaminação, do que vistos anteriormente na Figura 6, antes do processo de diluição sucessiva e a inoculação nas placas. Com os presentes resultados, evidenciamos que o método 3 foi um método adequado para a purificação, inoculação e manutenção de monoculturas das microalgas utilizadas neste estudo em meio sólido, sendo um método promissor para se tornar um protocolo laboratorial da Coleção de Microalgas do CEM-UFPR.

Figura 14 - Microalgas após a ressuspensão, A. *Tetraselmis* sp.; B. *Isochrysis* sp.; C. *Nannochloropsis* sp.; D. *C. muelleri*.



Fonte: Autora (2023)

## 5. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos no presente estudo, é possível concluir que o cultivo e manutenção de microalgas marinhas em meio sólido se demonstrou uma opção viável e eficiente para as espécies utilizadas quando comparada ao meio líquido. Dentre os resultados obtidos destacam-se:

- O método de inoculação em meio sólido de microalgas com centrifugação previa (método 3) se demonstrou viável para as espécies trabalhadas, com auxílio na purificação de cepas de microalgas.
- As espécies *Isochrysis* sp. e *C. muelleri* tiveram um resultado melhor quando passadas de sólido – líquido, do que de líquido – sólido. Como o objetivo desse trabalho era estudar e encontrar um método eficaz e certo de inoculação, não foi testado a taxa de crescimento da *Isochrysis* sp. e da *C. muelleri* no meio líquido – líquido, para verificar se há uma diferença significativa no aumento da taxa de crescimento dessas espécies quando comparadas a troca de meio sólido – líquido.
- Já a *Tetraselmis* sp. se adaptou mais na transição líquido- sólido do que sólido – líquido, mesmo assim obteve resultados bons. O mesmo vale para a *Nannochloropsis* sp. que se adaptou bem nas duas transições de meios, e teve sua taxa de crescimento semelhante a encontrada na literatura.
- Todas as espécies apresentaram boa viabilidade celular na ressuspensão, mantendo um crescimento estável ao longo de todo o estudo.

Diante das conclusões obtidas, todos os objetivos propostos no início do trabalho foram atingidos, garantindo uma comprovação da eficiência do método descrito.

## 6. RECOMENDAÇÕES

A partir das observações obtidos neste estudo, alguns pontos ainda precisam ser explorados para um melhor entendimento dos resultados e ficam aqui registrados como recomendações para futuros estudos. Dentre as recomendações, destacam-se:

- Um melhoramento da metodologia com o descarte total do sobrenadante após a centrifugação e adicionando novo meio de cultura a fim de diminuir a contaminação.
- Um estudo da durabilidade das cepas no meio sólido, com ressuspensão e transferências para novas placas periódicas (a partir de 30 dias), a fim de descobrir o tempo certo para repique de cada espécie e assim garantir manutenção em tempos corretos, economizando tempo e mão de obra, considerando que quanto mais se maneja um cultivo de microalgas pode aumentar o risco de contaminações.
- Testar os cultivos com fotoperíodo, no nosso laboratório o sistema de fotoperíodo não estava funcionando, por isso não foi testado com esse sistema, mas o fotoperíodo garante uma melhor adaptabilidade das microalgas ao meio, pois garantem um ambiente próximo ao natural.
- Avaliar a intensidade da cor dos cultivos como outro método de avaliar o crescimento da microalga na placa.
- Avaliar se há uma diferença significativa na taxa de crescimento de espécies passadas do sólido – líquido das que não foram colocadas em meio sólido.
- Avaliar o crescimento e a eficácia do método com outras espécies de microalgas.

## 7. REFERÊNCIAS

ADARME-VEGA, T. Catalina *et al.* Effects of long chain fatty acid synthesis and associated gene expression in microalga *Tetraselmis* sp. **Marine Drugs**, Australia, v. 12, n. 6, p. 3381–3398, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md12063381>. Acesso em: 8 jun. 2023

ANDERSEN, Robert A. **Algal Culturing Techniques**. New York: Elsevier Academic Press. 578 p. 2005

ARORA, Mani *et al.* *Tetraselmis indica* (Chlorodendrophyceae, Chlorophyta), a new species isolated from salt pans in Goa, India. **European Journal of Phycology**, v. 48, n. 1, p. 61–78, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09670262.2013.768357>. Acessado em: 8 jun. 2023

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 16181/2021**. Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com Microalgas Marinhas. Rio de Janeiro, 2021.

CAMPOS, Viviane Borges; BARBARINO, Elisabete; LOURENÇO, Sergio de Oliveira. Crescimento e composição química de dez espécies de microalgas marinhas em cultivos estanques. **SciELO**, v. v.40, n.2, p. 339–347, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010005000009>

CARDOSO, C. *et al.* Lipid composition and some bioactivities of 3 newly isolated microalgae (*Tetraselmis* sp. IMP3, *Tetraselmis* sp. CTP4, and *Skeletonema* sp.). **Aquaculture International**, v. 28, n. 2, p. 711–727, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10499-019-00489-w>. Acesso em: 8 jun 2023

CHANG, Kwang Suk *et al.* Enhanced lipid productivity in AGP knockout marine microalga *Tetraselmis* sp. using a DNA-free CRISPR-Cas9 RNP method. **Bioresource Technology**, v. 303, p. 122932, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122932>. Acesso em: 15 maio 2023.

CORREIA, Catarina Alexandra da Silva Rosado. **Desenvolvimento e otimização de meios de cultura para o cultivo de microalgas marinhas**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia dos Recursos Marinhos) Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche Instituto Politécnico de Leiria, 2013. Disponível em: <https://iconline.iplleiria.pt/bitstream/10400.8/1051/1/Relat%C3%B3rio%20Est%C3%A1gio%20Catarina%20Rosado%20Correia.pdf>. Acesso em: 30 maio 2023.

CUNHA, George Martins da. **Efeito do Percentual de Colheita das Microalgas *Isochrysis aff. galbana* E *Pavlova lutheri* em Sistema Semicontínuo**. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) Programa de Pós-Graduação em Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/206480>. Acesso em: 31 maio 2023.

DERNER, Roberto Bianchini. **Efeito de Fontes de Carbono no Crescimento e na Composição Bioquímica das Microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com Ênfase no Teor de Ácidos**. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, 2006. Disponível em: <http://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/88993>. Acesso em: 1 jun. 2023.

DELIAMC. **Práctica Nº14. Visualización de una Cámara de Recuento**, 2014. Disponível em: <https://practicadehematologiaycitologia.wordpress.com/2014/11/23/practica-no14-visualizacion-de-una-camara-de-recuento/>. Acesso em: 27 maio 2023.

DE PINA, Luís Celso Cardoso *et al.* Avaliação de um sistema de cultivo de microalgas com um mix de fotobiorreatores tubular e de placas paralelas, para produção de biomassa de microalgas em meios de cultura alternativos / Evaluation of a microalgae cultivation system with a mix of tubular and parallel plate photobioreactors for microalgae biomass production in alternative culture media. **Brazilian Journal of Development**, Paraíba, v. 7, n. 4, p. 37734–37777, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.34117/bjdv7n4-304>. Acesso em: 8 jun. 2023.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. **Relatório Técnico**, Rome, 2022. DOI: <https://doi.org/10.4060/cc0461en>

GÖKSAN, Tolga; DURMAZ, Yaşar; GÖKPINAR, Şevket. Effects of light path lengths and initial culture density on the cultivation of *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898). **Aquaculture**, v. 217, n. 1–4, p. 431–436, 2003. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00854-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00854-7). Acesso em: 16 maio 2023.

GOSWAMI, Rahul Kumar *et al.* Current perspective on wastewater treatment using photobioreactor for *Tetraselmis* sp.: an emerging and foreseeable sustainable approach. **Environ Sci Pollut Res**, 61905–61937, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-021-16860-5>. Acesso em: 8 maio 2023.

HEMAISWARYA, S. *et al.* Microalgae: A sustainable feed source for aquaculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 1737–1746, 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-010-0632-z>. Acesso em: 8 maio 2023.

HOLANDA, Caio Lívio Bezerra. **Cultivo da Microalga *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898) em Efluente de Carcinicultura e seu Efeito na Qualidade de Água, Produção de Lipídeos e Exopolissacarídeos**. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia da Pesca) - UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, Fortaleza, 2017. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/28566>. Acesso em: 12 jun. 2023.

HUANG, Xuxiong *et al.* Effects of nitrogen supplementation of the culture medium on the growth, total lipid content and fatty acid profiles of three microalgae (*Tetraselmis*

subcordiformis, Nannochloropsis oculata and Pavlova viridis). **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 1, p. 129–137, 2013.

KIM, Se Kwon; WIJESEKARA, Isuru. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 1, p. 1–9, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2010.01.003>. Acesso em: 14 maio 2023.

JACINAVICIUS, Fernanda Rios *et al.* **Manual Para Cultivo de Cianobactérias**. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo: Núcleo de Ficologia, 2013. *E-book*. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/340223334\\_MANUAL\\_PARA\\_CULTIVO\\_D\\_E\\_CIANOBIOTERIAS](https://www.researchgate.net/publication/340223334_MANUAL_PARA_CULTIVO_D_E_CIANOBIOTERIAS). Acesso em: 31 maio 2023.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de Microalgas Marinhas - Princípios e Aplicações**. São Carlos: Editora RiMa. 606 p. 2006

MA, Xiao Nian *et al.* Lipid production from Nannochloropsis. **Marine Drugs**, v. 14, n. 4, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md14040061>. Acesso 1 jun 2023.

MARIELA A. GONZÁLEZ *et al.* Ultrastructural and molecular characterization of Tetraselmis strains (Chlorodendrophyceae, Chlorophyta) isolated from Chile. **Gayana Bot**, vol.72, n.1, pp.47-57, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-66432015000100007>. Acessado 31 maio 2023.

MARIANO, A. B.; RAMOS, L. P.; VARGAS, J. V. C; PULLIAN, R.; BALMANT, W.; MORAIS, K. C. C.; DZUMAN, M. J.; ARANTES, A. C. C. **Comparação de meios de cultivo autotróficos, mixotróficos e heterotróficos para produção de biomassa de microalga com foco em biocombustíveis e coprodutos**. In: 5º Congresso Internacional de Bioenergia, 2009. 5º Congresso Internacional de Bioenergia; 1º Congresso Brasileiro de Geração Distribuída e Energias Renováveis, Curitiba 2010.

MORAES EUCLIDES, Thais DE. **Seleção e Otimização de Meios de Cultura para o Cultivo de Microalgas**. Dissertação (Magister Scientiae) Programa de Pós-Graduação em Botânica, 2013. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/bitstream/123456789/2554/1/texto%20completo.pdf>. Acesso em: 8 maio 2023.

OHSE, Silvana *et al.* Energia na Agricultura View project Fisiologia do crescimento e desenvolvimento de plantas View project. **Revista Biotemas**, 2008. ISSN: 0103-1643 Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/255665484>. Acesso em: 13 jun. 2023

PATIL, Vishwanath *et al.* Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed. **Aquaculture International**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10499-006-9060-3> Acesso em: 1 jun. 2023.

PROCÓPIO, Zaniel Souto Dantas. **Avaliação da produção de biodiesel de microalga**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Química – PPGEQ, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte -UFRN, 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/15855>. Acesso em: 1 jun. 2023.

SACRISTÁN DE ALVA, Manuel; LUNA PABELLO, Víctor Manuel. Phycoremediation by simulating marine aquaculture effluent using *Tetraselmis* sp. and the potential use of the resulting biomass. **Journal of Water Process Engineering**, v. 41, p. 102071, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102071>. Acesso em: 15 maio 2023.

SALES, Rafael De Oliveira Jaime. **Cultivo de Juvenis de Cavalos-Marinhos *Hippocampus reidi* Usando uma Pasta da Microalga *Nannochloropsis oculata* Produzida por Floculação**. 2015. Mestrado em Oceanografia - UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, Recife, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/13937>. Acesso em: 12 jun. 2023.

SILVA, Maria João Santos Dias da Mota. **Análise Económica da Produção de Óleo a Partir de Microalgas**. Porto: Dissertação (Mestrado em Engenharia Sustentável) Instituto Superior de Engenharia do Porto Departamento de Engenharia Mecânica, 2015. Disponível em: [https://recipp.ipp.pt/bitstream/10400.22/8049/1/DM\\_MariaSilva\\_2015\\_MES.pdf](https://recipp.ipp.pt/bitstream/10400.22/8049/1/DM_MariaSilva_2015_MES.pdf). Acesso em: 15 maio de 2023.

SIMÕES, Mirela Assunção *et al.* **Algas Cultiváveis e sua Aplicação Biotecnológica 1ª edição Instituto Federal**. Sergipe: Instituto Federal de Sergipe, 2016. E-book, disponível em: [https://repositorio.ifs.edu.br/biblioteca/bitstream/123456789/952/1/E-book\\_Algas\\_cultivaveis.pdf](https://repositorio.ifs.edu.br/biblioteca/bitstream/123456789/952/1/E-book_Algas_cultivaveis.pdf). Acesso em: 7 abr. 2023.

SINGH, Poonam *et al.* **Microalgae Isolation and Basic Culturing Techniques**. Elsevier Inc., 2015. p. 43–54.

SUN, Zheng; WANG, Xiaofei; LIU, Jin. Screening of Isochrysis strains for simultaneous production of docosahexaenoic acid and fucoxanthin. **Algal Research**, v. 41, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101545>. Acessado em: 8 jun 2023.

TEIXEIRA, Danielle Altomari *et al.* Otimização de Meio de Cultura Para Microalgas com Aplicações Energéticas: Bom Para Economia e Bom Para o Meio Ambiente. In: VI Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental, Porto Alegre, **Anais**, 2015. Disponível em: <https://www.ibeas.org.br/congresso/Trabalhos2015/X-006.pdf>. Acesso em: 4 jun. 2023.

TROBAJO, Rosa; COX, Eileen J.; QUINTANA, Xavier D. The effects of some environmental variables on the morphology of *Nitzschia frustulum* (Bacillariophyta), in relation its use as a bioindicator. **Nova Hedwigia**, v. 79, n. 3–4, p. 433–445, 2004. DOI: 10.1127/0029-5035/2004/0079-0433

WANG, Xin Wei *et al.* Biomass, total lipid production, and fatty acid composition of the marine diatom *Chaetoceros muelleri* in response to different CO<sub>2</sub> levels. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 124–130, 2014. Disponível em: Acesso em: 16 maio 2023.

WOJCIECHOWSKI, Juliana *et al.* **Isolamento e cultivo de microalgas**. Relatório Técnico, 2013. DOI:[10.13140/2.1.3353.3767](https://doi.org/10.13140/2.1.3353.3767)

ZANELLA, Lorenzo; VIANELLO, Fabio. Microalgae of the genus *Nannochloropsis*: Chemical composition and functional implications for human nutrition. **Journal of Functional Foods**, V- 68, 103919, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103919>. Acesso em: 12 abr. 2023

**ANEXO 1 – Tabela de Dados da área de crescimento da placa**

ESPÉCIE	CONCENTRAÇÃO	PLACA n=4	ÁREA DA PLACA			AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO			
			Início	Final	F - I	cresceu	%área	Média n=4	σ
nano	1	1	0,598	2,038	1,44	1	10%	10%	0,06
		2	0,175	1,907	1,732	1	10%		
		3	0,107	0,442	0,335	1	2%		
		4	1,241	4,445	3,204	1	22%		
	2	1	1,591	3,053	1,462	1	15%	13%	0,10
		2	0,62	2,337	1,717	1	12%		
		3	1,697	0,778	-0,919	0	4%		
		4	1,772	7,504	5,732	1	38%		
	3	1	0,264	5,002	4,738	1	25%	13%	0,17
		2	0,256	0,214	-0,042	0	1%		
		3	0,151	0,294	0,143	1	1%		
		4	0,25	8,814	8,564	1	44%		
CM	1	1	1,031	2,846	1,815	1	14%	39%	0,24
		2	1,625	4,128	2,503	1	21%		
		3	1,088	15,012	13,924	1	75%		
		4	3,642	11,46	7,818	1	57%		
	2	1	0,721	2,119	1,398	1	11%	8%	0,19
		2	1,722	0,224	-1,498	0	1%		
		3	2,61	1,065	-1,545	0	5%		
		4	5,121	11,128	6,007	1	56%		
	3	1	1,557	2	0,787	1	12%	10%	0,03
		2	1,063	0,611	-0,452	0	3%		
		3	2,092	1,755	-0,337	0	9%		
		4	0,427	2,262	1,835	1	11%		
TETRA	1	1	0,213	19,057	18,844	1	95%	92%	0,05
		2	0,637	16,684	16,047	1	83%		
		3	0,228	18,43	18,202	1	92%		
		4	0,689	6,407	5,718	1	32%		

		1	2,847	12,053	9,206	1	60%		
	2	2	0,189	6,922	6,733	1	35%	64%	0,15
		3	3,14	17,39	14,25	1	87%		
		4	3,609	13,709	10,1	1	69%		
		1	1,962	15,204	13,242	1	76%		
	3	2	1,076	14,418	13,342	1	72%	74%	0,08
		3	0,799	17,37	16,571	1	87%		
		4	2,234	11,631	9,397	1	58%		
		1	6,353	6,313	-0,04	0	32%		
	1	2	6,857	6,209	-0,648	0	31%	31%	0,13
		3	0,512	0,51	-0,002	0	3%		
		4	3,23	9,116	5,886	1	46%		
		1	4,952	16,43	11,478	1	82%		
ISO	2	2	0,211	0,109	-0,102	0	1%	23%	0,25
		3	0,187	3,28	3,093	1	16%		
		4	3,23	5,866	2,636	1	29%		
		1	0,625	3,279	2,654	1	16%		
	3	2	0,882	0,408	-0,474	0	2%	8%	0,04
		3	0,307	1,773	1,466	1	9%		
		4	2,7	1,35	-1,35	0	7%		

## ANEXO 2 – Procedimento Operacional Padrão

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ CAMPUS PONTAL DO PARANÁ – CENTRO DE ESTUDOS DO MAR	
<b>Elaborado por:</b> ANA KARINE KOPPE PORTELLA	<b>Data:</b> 01/07/2023
<b>Aprovado por:</b>	<b>Data:</b>
<b>Responsável(is) pela Execução do POP:</b> ANA KARINE KOPPE PORTELLA	

### Qual o Objetivo do Procedimento?

O objetivo desse procedimento é estabelecer um protocolo para inoculação de microalgas em meio sólido, para ser utilizado por toda a equipe acadêmica do Centro de Estudos do Mar.

### O que é Necessário Ter/Saber para Executar o Procedimento?

Para a realização desse procedimento a pessoa deve ter noção básica de como trabalhar em laboratório e manusear equipamentos.

Lista de Materiais a serem utilizados para o procedimento:

#### ❖ **Preparação das Placas de Ágar:**

- Frascos de vidro autoclavável;
- Placas de Petri (vidro ou plástico);
- Autoclave (Horizontal ou vertical);
- Lamparina;
- Meio de cultivo de microalgas;
- Ágar bacteriológico.

#### ❖ **Inoculação das microalgas:**

- Centrifuga de bancada;
- Tubos tipo falcon;
- Pipetas e ponteiras;
- Lamparina;
- Placas com meio sólido.

## **Quais são os Riscos Envolvidos Caso o POP NÃO Seja Executado Corretamente?**

---

**Impacto:** O não seguimento desse POP pode acarretar a perda de material e retrabalho.

### **Descrição do Procedimento**

---

#### **1.1 PREPARAÇÃO DAS PLACAS DE ÁGAR:**

Adiciona 1,5% de ágar no meio de cultivo líquido, leva essa mistura para autoclave e realiza o ciclo da autoclave. Com a mistura autoclavada e morna, em uma bancada limpa e uma lamparina no centro (Pode ser feito no fluxo laminar sem a lamparina), dispersa as placas de petri ao redor da lamparina e adiciona a mistura (meio de cultivo+ágar) até metade da placa, tampa e deixa esfriar.

#### **1.2 INOCULAÇÃO DAS PLACAS:**

##### **1.2.1 PREPARAÇÃO DAS MICROALGAS:**

Com o cultivo da espécie escolhida retira-se 15 mL desse cultivo em um tubo falcon, leva-o até uma centrífuga de bancada e programa a velocidade e o tempo para 1300 G por 10 minutos (Lembre-se sempre de balancear a centrífuga). Passado o tempo da centrífuga, cuidadosamente retira o tubo falcon, leva-o na bancada perto da lamparina e retira todo o sobrenadante com ajuda de uma pipeta com ponteiros estéreis (Pode-se retirar todo o líquido e adicionar 1mL de meio novo ou descartar parte do sobrenadante deixando 1mL para ressuspensão).

Ressuspende as células precipitadas com o auxílio de um vórtex (o vórtex auxilia a não deixar nenhuma partícula no fundo). Retira uma alíquota e conta o número de células usando uma base de  $1 \times 10^5$  cel.mL<sup>-1</sup> para células maiores de 10  $\mu$ m e  $1 \times 10^7$  cel.mL<sup>-1</sup> para células menores de 10  $\mu$ m.

##### **1.2.2. INOCULAÇÃO DAS PLACAS:**

Com a amostra concentrada adiciona uma alíquota pequena o suficiente para espalhar pela placa sem sobrar muito líquido, em média 200  $\mu$ L para placas de até 60 mm e 500  $\mu$ L para placas de 120 mm. Com auxílio da alça bacteriológica estéril (pode ser alça de platina ou Drigalski estéreis na chama) estria a alíquota por toda a placa. Lacre a placa com parafilme evitando a entrada de ar e deixa a placa em incubadora a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  com fotoperíodo de 12 horas claro 12 horas escuro.