

Cultivo da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* em escala de bancada utilizando meio contaminado com metais pesados

Cultivation of microalgae Pseudokirchneriella subcapitata in bench scale using medium contaminated with heavy metals

Mônica Ansilago¹, Francieli Ottonelli¹, Emerson Machado de Carvalho²

RESUMO

Neste trabalho foi avaliado o crescimento da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* em meio de cultivo alternativo NPK (20:05:20) contaminado com metais pesados. O primeiro tratamento consiste do controle sem a adição de contaminante, enquanto os demais foram contaminados com AlCl_3 , FeSO_4 e ZnSO_4 e os três metais. Nos resultados obtidos, o controle foi o único que apresentou crescimento positivo contínuo, enquanto o tratamento contendo todos os metais obteve maior densidade e maior taxa de crescimento exponencial. O tratamento contaminado com ZnSO_4 obteve o menor potencial de produção. Apesar dos valores apresentados, todos os tratamentos apresentaram crescimento positivo no final do ensaio, sendo possível atribuir à microalga um elevado potencial de produção em água contaminado por metais.

Palavras-chave: água residual; biorremediação; Chlorophyceae; crescimento exponencial; densidade algal.

ABSTRACT

This study evaluated the growth of microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* amid growing alternative NPK (20:05:20) contaminated with heavy metals. The first treatment consists of the control without addition of dopant, while others were infected with AlCl_3 , FeSO_4 and ZnSO_4 and the three metals. Of the results obtained, the control was the only one that showed continued positive growth, while all metal-containing treatment had a higher density and a higher rate of exponential growth. Treatment contaminated with ZnSO_4 had the lowest production potential. Despite the figures, all treatments showed positive growth at the end of the test, so it is possible to assign a high potential for microalgae production in water contaminated by metals.

Keywords: wastewater; bioremediation; Chlorophyceae; exponential growth; algal density.

INTRODUÇÃO

As microalgas são organismos unicelulares fotossintetizantes, com pouca ou nenhuma diferenciação celular. Elas podem ser predominantemente aquáticas, geralmente microscópicas, sendo um grupo muito heterogêneo de organismos. Por meio da extração de seus óleos, são comercialmente utilizadas para produção de biocombustíveis nas indústrias farmacêuticas e alimentícias. As microalgas são muito eficientes no armazenamento de energia solar, apresentando um rápido crescimento e, conseqüentemente, um aumento de biomassa considerável (OHSE *et al.*, 2008).

Muitas microalgas mostram elevada eficiência em retirar nutrientes ou outros elementos químicos do meio aquoso, apresentando potencial

para sua aplicação em ensaios de recuperação de ambientes aquáticos (MIASHIRO, 2008). Com essa propriedade, elas podem ser utilizadas na recuperação de águas residuais e, posteriormente, a sua biomassa pode ser utilizada para outras aplicações industriais e agrícolas. Silva (2007) utilizou a microalga *Chlorella vulgaris* imobilizada com alginato de sódio para a remoção de fosfatos de água residual de uma clínica hospitalar, em que foram observadas reduções significativas do contaminante da água.

Como a água é um bem essencial à vida, torna-se necessário dispor dela em condições potáveis e balneáveis. Em razão do grande crescimento populacional e do aumento das atividades industriais perto de rios e nascentes, a

¹Biotecnóloga pela Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) - Dourados (MS), Brasil.

²Mestre e Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) Docente da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA) da UFGD - Dourados (MS), Brasil.

Endereço para correspondência: Emerson Machado de Carvalho - Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA), Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) - Rodovia Dourados/Itahum, Km 12, CP 364, Cidade Universitária - 79825-070 - Dourados (MS), Brasil - E-mail: carvalho.em@gmail.com

Recebido: 26/09/13 - **Aceito:** 12/02/16 - **Reg. ABES:** 124295

qualidade das águas vem sendo afetada. Um grande problema na qualidade da água é a contaminação por metais pesados, que, além do seu elevado potencial tóxico, são bioacumulativos, mesmo em concentrações-traço (LIMA, 2010).

As águas residuais precisam passar primeiramente por tratamento químico para serem lançadas nos corpos d'água. Esses tratamentos podem trazer muitos prejuízos para a biota aquática, sendo necessária a construção de novas metodologias para a realização de tratamento dessas águas (SILVA, 2007). As microalgas podem atuar sobre as águas residuais retirando os nutrientes, removendo metais pesados e ainda diminuindo a quantidade de patógenos pelo incremento de oxigênio ao meio, tornando-se, assim, uma medida sustentável, pois pode ser considerada uma tecnologia limpa, visto que é uma fonte de energia alternativa, além de fixar carbono, diminuindo, assim, a quantidade deste no meio ambiente.

Para que as microalgas alcancem seu potencial máximo de desenvolvimento é necessário compreender as condições de temperatura, nutrientes e potencial hidrogeniônico (pH) como fatores determinantes para sua produtividade e, conseqüentemente, para atingir as concentrações ótimas na aplicação em ensaios para remoção de metais das águas. Também se necessário o controle de certas variáveis, como luminosidade e aeração, já que estas se mostram limitantes ao crescimento das microalgas (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2003; SIPAÚBA-TAVARES *et al.*, 2009). Segundo os autores, o meio de cultivo é de suma importância, já que este é quem vai garantir o crescimento rápido e adequado das microalgas.

No presente ensaio foi utilizada a clorofícea *Pseudokirchneriella subcapitata*, pois apresenta crescimento rápido, baixo custo de manutenção, fácil obtenção, alto poder fotossintético, contendo clorofilas *a* e *b*, e um aumento de biomassa relativamente alto (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2003; SIPAÚBA-TAVARES *et al.*, 2009; ARANTES, 2010). Seus fatores limitantes são luminosidade e aeração; apesar de ser uma microalga de água doce, tem elevada resistência à salinidade (ARANTES, 2010). Ainda segundo Carvalho *et al.* (2012), essa microalga apresenta elevada plasticidade em relação ao pH, apresentando capacidade de produção em águas naturais, mesmo existindo competição com outras espécies autóctones. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção da microalga *P. subcapitata* em meio de cultivo alternativo NPK contaminado por metais pesados, como cloreto de alumínio, sulfato ferroso e sulfato de zinco.

METODOLOGIA

O inóculo inicial da microalga *P. subcapitata* (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) foi obtido no Laboratório de Limnologia do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva, da Universidade Federal de São Carlos, isolada da Represa do Broa (São Carlos, São Paulo, Brasil). A microalga foi posteriormente cultivada em meio

padrão CHU₁₂ no Laboratório do Centro de Pesquisa em Biodiversidade (CPBio). O sistema de cultivo foi estático não axênico (não estéril), com aeração constante, temperatura ambiente e fotoperíodo controlado (12 h luz/12 h escuro).

Como meio de cultivo das microalgas nos ensaios, optou-se por utilizar uma solução com NPK (20-5-20 g.L⁻¹), por se tratar de um meio alternativo mais barato e tão eficiente quanto o CHU₁₂ (SIPAÚBA-TAVARES *et al.*, 1999). O meio NPK foi preparado com a adição de 1,0 mL de solução estoque NPK adicionado a 1 L de água destilada e autoclavada a 121°C por 20 minutos. Para o preparo da solução estoque NPK foi adicionado 0,70 g de adubo químico NPK (20-5-20 g/L⁻¹) em 1.000 mL de água destilada autoclavada a 121°C durante 20 minutos (SIPAÚBA-TAVARES & ROCHA, 2003).

Conforme apresentado na Tabela 1, os ensaios foram elaborados da seguinte forma: (1) o tratamento controle (T1), com 400 mL de água destilada autoclavada e 50 mL de meio NPK e 50 mL de meio de cultura com *P. subcapitata*; (2) o segundo teste (T2), com 400 mL de água destilada autoclavada contendo 0,2 mg.L⁻¹ de cloreto de alumínio (AlCl₃), 50 mL de meio NPK e 50 mL de meio de cultura com *P. subcapitata*; (3) o terceiro teste (T3), com 50 mL de meio de cultura com *P. subcapitata* e 400 mL de água destilada com 0,32 mg.L⁻¹ de sulfato ferroso (FeSO₄) e 50 mL de NPK; (4) o quarto tratamento (T4), com 50 mL de meio de cultura com *P. subcapitata*, 400 mL de água destilada com 0,6 mg.L⁻¹ de sulfato de zinco (ZnSO₄) e 50 mL de NPK; (5) o quinto tratamento (T5), com 50 mL de meio de cultura contendo *P. subcapitata*, 400 mL de água destilada com 0,2 mg.L⁻¹ de cloreto de alumínio, 0,32 mg.L⁻¹ de sulfato ferroso e 0,6 mg.L⁻¹ de sulfato de zinco, e 50 mL de NPK.

O valor utilizado de cada contaminante foi estabelecido tendo como base o dobro do limite permitido pela Resolução 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (BRASIL, 2005), sendo esse limite de 0,1 mg.L⁻¹ para o alumínio, de 0,3 mg.L⁻¹ para o ferro e de 0,18 mg.L⁻¹ para o zinco.

Tabela 1 - Características e componentes em cada tratamento.

Tratamento	Água destilada	Meio	<i>P. subcapitata</i>	Contaminante		
		NPK		AlCl ₃	FeSO ₄	ZnSO ₄
T1	X	X	X	-	-	-
T2	X	X	X	X	-	-
T3	X	X	X	-	X	-
T4	X	X	X	-	-	X
T5	X	X	X	X	X	X

(X) presentes, (-) ausentes em cada tratamento; NPK (meio sintético); AlCl₃ (cloreto de alumínio); FeSO₄ (sulfato ferroso); ZnSO₄ (sulfato de zinco).

T1: controle - sem contaminantes; T2: tratamento contaminado com cloreto de alumínio; T3: tratamento contaminado com sulfato ferroso; T4: tratamento contaminado com sulfato de zinco; T5: tratamento contaminado com cloreto de alumínio+sulfato ferroso+sulfato de zinco.

Os ensaios foram desenvolvidos em triplicatas durante 21 dias e foram retiradas 3 amostras a cada 3 dias de intervalo. Nesses intervalos também foram mensurados os valores de pH do meio. Os ensaios foram realizados em Erlenmeyer de 500 mL e foram mantidos em incubadora BOD com controle de fotoperíodo de 2.500 lux provido por lâmpadas fluorescentes brancas (12 h luz/12 h escuro), temperatura ($22\pm 2,0^\circ\text{C}$) e aeração constante. As células das microalgas foram contadas sob microscópio óptico com o auxílio de hemocitômetro (Câmara de Neubauer).

Para avaliar a diferença nas curvas de crescimento algal foi utilizada uma análise de covariância (ANCOVA) (ZAR, 1999) e aplicada uma análise de regressão (r^2) para obtenção da taxa de crescimento exponencial (k). Para verificar a correlação entre a densidade algal e o pH do meio foi utilizado o teste de correlação de Spearman. Para análise de variância e comparação múltipla entre médias de experimentos foi utilizado o teste de Tukey. As taxas de duplicação diária foram obtidas pela diferença entre os valores da densidade algal do último e do primeiro dia de ensaio, dividido pelo tempo decorrido em dias. Os valores da taxa de crescimento diário foram transformados em arco seno da proporção (ZAR, 1999) apenas para testar possível diferença entre os dias de amostragem pela análise de variância (ANOVA). O programa utilizado para análise dos dados foi o Statistica 7.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A microalga *P. subcapitata* apresentou um aumento na densidade algal até o 21º dia de ensaio, com períodos de oscilação, principalmente nos 3º e 9º dias (Figura 1). Assim, foi possível inferir a ocorrência de um período de ajustamento da microalga do meio original de cultivo CHU₁₂ para o meio NPK e, provavelmente, para os contaminantes introduzidos no meio. O tratamento contaminado com cloreto de alumínio+sulfato ferroso+sulfato de zinco apresentou maior densidade algácea, enquanto os tratamentos contaminados isoladamente com sulfato de zinco e sulfato ferroso apresentaram menor densidade (Figura 1). Tais observações foram corroboradas pela análise de covariância (ANCOVA), que apresentou diferença significativa ($F_{4,110}=14,19$; $p<0,001$) nas curvas de densidade de *P. subcapitata* entre os tratamentos. As diferenças foram resultantes dos valores significativamente mais elevados no tratamento contaminado com todos os metais, se comparado com os demais tratamentos, exceto o controle (teste de Tukey).

Os valores de pH do meio de cultivo apresentaram uma queda no terceiro dia de tratamento nas amostras contendo sulfato de zinco e sulfato ferroso, indicando para esses metais maior instabilidade ao meio de cultivo e reforçando a ideia anterior de ajustamento das microalgas ao meio e aos contaminantes. Apesar da oscilação do pH durante o período do ensaio, foram observados valores muito próximos — entre 8,0 e 8,2 — no último dia de

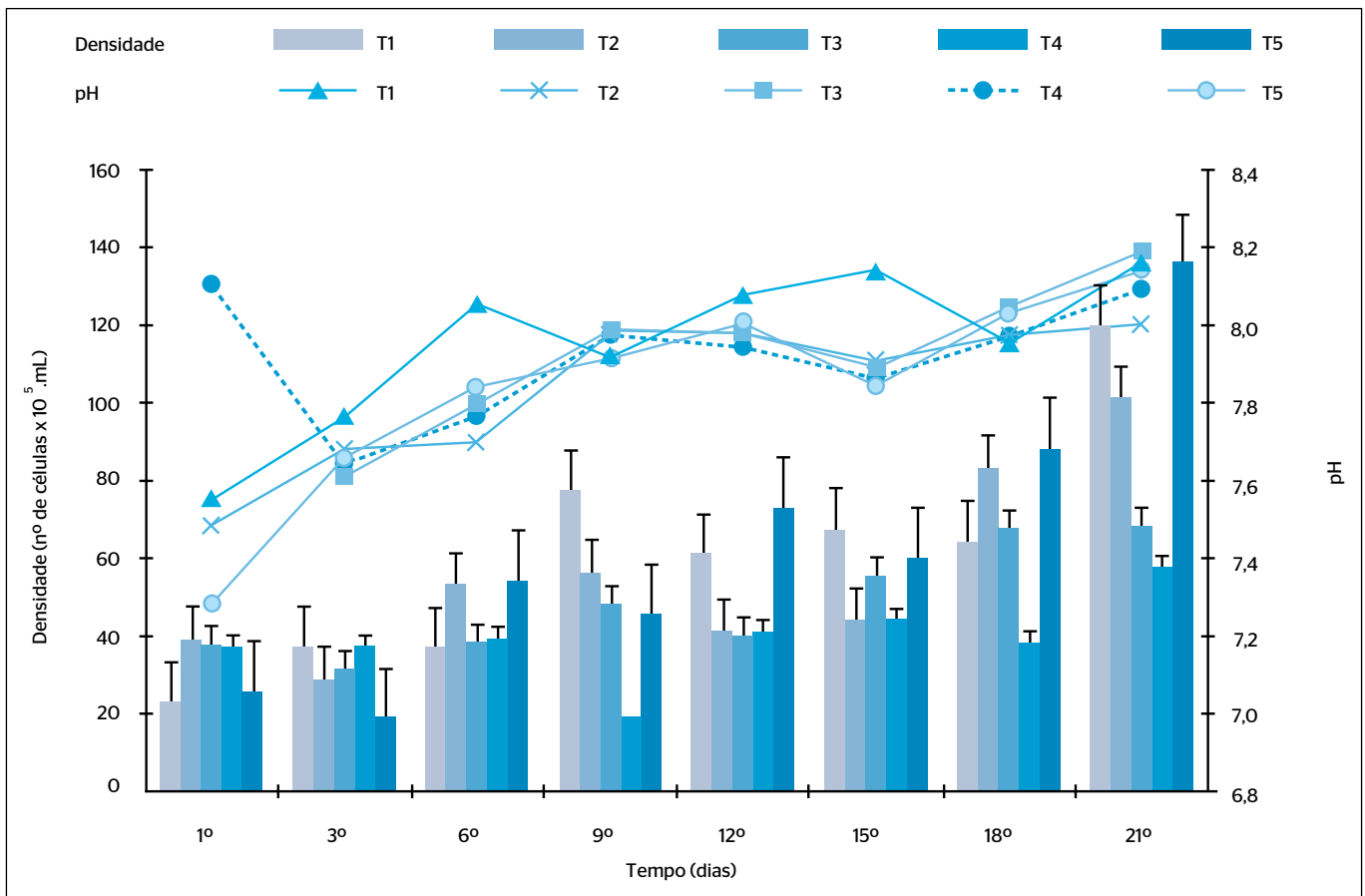


Figura 1 - Densidade algácea (média \pm erro padrão) e pH (média) mensurados nos tratamentos.

ensaio para todos os tratamentos (Figura 1). No entanto, o teste de Spearman demonstrou existir uma forte correlação entre densidade algal e pH no tratamento contaminado por todos os metais ($R=0,89$), possivelmente, em função do aumento contínuo ao longo do período experimental. Os tratamentos contaminados por sulfato ferroso e por cloreto de alumínio e o tratamento controle apresentaram baixa correlação ($R=0,57; 0,56; 0,54$, respectivamente), provavelmente, em função da instabilidade ao meio de cultivo. O tratamento contaminado somente com sulfato de zinco não apresentou correlação significativa ($R=0,13$), reforçando a ideia de instabilidade de certos metais isoladamente ao meio de cultivo.

Em ensaios com a microalga *P. subcapitata* sem presença de contaminantes, Carvalho *et al.* (2012) observaram correlação negativa entre o pH e a densidade algal, sugerindo que o aumento da densidade algal esteve associado à queda do pH, mostrando, assim, alta plasticidade dessa microalga em variações do pH.

Conforme ocorreu no presente ensaio, Berenguel *et al.* (2004) enfatizam que o efeito do pH no cultivo de microalgas é complexo, existindo dificuldade em dissociar os efeitos diretos do crescimento microbiano dos efeitos colaterais expressos em termos de modificações no sistema $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ (dióxido de carbono/bicarbonato/carbonato), bem como no equilíbrio $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ (amônia/íon amônio). Além disso, o pH pode ser elevado quando há o consumo de formas inorgânicas de carbono, pelo fato de os íons hidroxila serem transportados para o exterior das células (LOPES, 2007).

O ajustamento da microalga ao meio de cultivo e aos contaminantes foi observado por meio da elevada mortalidade da espécie nos primeiros dias de ensaio. Assim, quando analisada a taxa de crescimento diário, verificou-se que somente o controle obteve crescimento positivo em todos os dias de experimento; já os tratamentos contaminados com cloreto de alumínio, sulfato de zinco e os três metais juntos apresentaram elevada mortalidade no terceiro dia de ensaio; o tratamento contaminado com sulfato de zinco apresentou baixo crescimento até o sexto dia de ensaio, seguido de elevada mortalidade no nono dia (Figura 2). Esses valores atribuem ao sulfato de zinco, quando presente isoladamente, um potencial efeito crônico de toxicidade; o contaminante cloreto de alumínio e sulfato ferroso apresenta isoladamente um potencial de efeito agudo sobre as microalgas; a associação entre cloreto de alumínio+sulfato ferroso+sulfato de zinco pode ter resultado em um efeito antagônico, em que os contaminantes, aplicados juntos, interferem um no outro ou interferem com outro contaminante que coexiste no meio (MOZETO & ZAGATTO, 2008), tornando-se benéficos às microalgas. Apesar dos valores de mortalidade apontados, todos os tratamentos apresentaram crescimento positivo no 21º dia de ensaio, sendo possível atribuir à *P. subcapitata* um elevado potencial de produção em água contaminada pelos metais presentes na composição entre cloreto de alumínio+sulfato ferroso+sulfato de zinco.

Os metais pesados são considerados tóxicos para grande parte dos seres vivos (OLIVEIRA, 2007), conforme foi observado para o zinco na produção de biomassa da microalga. Porém, alguns metais pesados podem ser

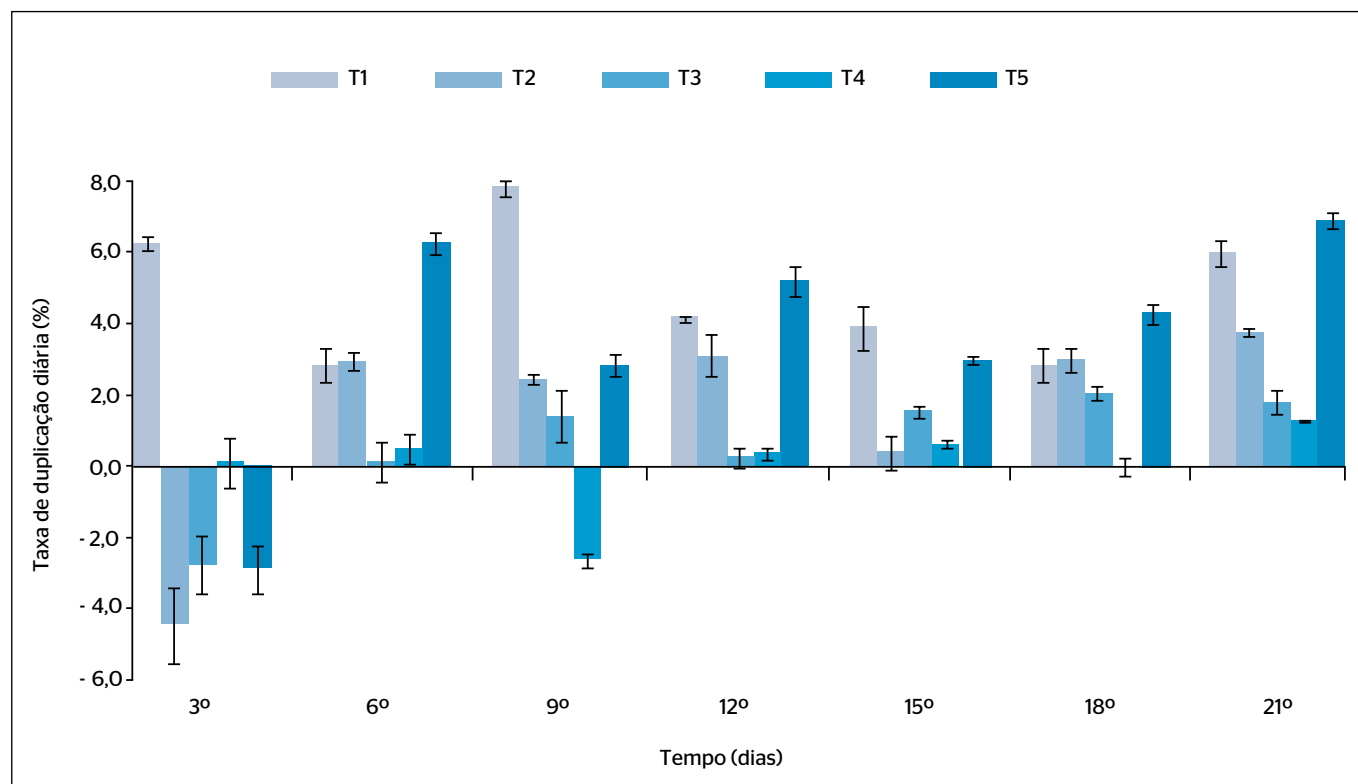


Figura 2 - Taxa de duplicação diária (média±erro padrão) da microalga nos diferentes tratamentos.

necessários para muitos micro-organismos em determinadas concentrações ou associações, sendo assim chamados de elementos-traço (GUILHERME *et al.*, 2005). Essa necessidade dos metais enquanto elementos-traço foi muito bem observada na associação dos metais presentes na composição cloreto de alumínio+sulfato ferroso+sulfato de zinco no meio de cultivo. Além disso, o ferro também pode atuar como cofator enzimático, aumentando o poder degradativo do meio (GAYLARDE *et al.*, 2005; MOZETO & ZAGATTO, 2008) e, conseqüentemente, contribuindo com elevadas taxas de crescimento exponencial.

A eficiência nas taxas de produção de *P. subcapitata* pode ser observada na Figura 3 por meio da análise de crescimento exponencial (k), em que o tratamento contendo todos os metais obteve a maior taxa ($k=0,078$), seguido pelo tratamento controle ($k=0,061$), cloreto de alumínio ($k=0,042$), sulfato ferroso ($k=0,034$) e, novamente, com valor representativamente mais baixo para o sulfato de zinco ($k=0,016$). Estudos verificados na literatura com outras espécies da classe Chlorophyceae apresentaram resultados de crescimento exponencial semelhantes, mesmo na ausência de contaminantes, destacando-se os valores de $k=0,36$ a $0,56$, descritos por Sipaúba-Tavares *et al.* (2009), e $k=0,14$ a $1,46$, descritos por Moreira-Santos *et al.* (2004). Contudo, se faz necessário ressaltar que o fotoperíodo utilizado por estes autores foi de 24 h, enquanto no presente trabalho foi de 12 h. Segundo

Sipaúba-Tavares *et al.* (2011), a fase de maior crescimento em seu estudo esteve associada ao período de 24 horas de luz. Entretanto, é possível inferir que a duplicação algal do presente ensaio poderia ser otimizada com o aumento do fotoperíodo.

CONCLUSÕES

A microalga *P. subcapitata* apresentou elevada produção de biomassa, principalmente na presença de todos os metais juntos no meio de cultura. Tais resultados atribuem à *P. subcapitata* grande potencialidade para sua utilização em processos integrados de biorremediação de águas residuais e produção de biomassa algal. Entretanto, o efeito tóxico do sulfato de zinco sobre a produção algácea sugere a necessidade de incrementar novos estudos, uma vez que o metal não apresentou a mesma toxicidade quando associado ao sulfato ferroso e ao cloreto de alumínio. Assim, a principal iniciativa deste estudo foi desenvolver propostas, mesmo que em escala de bancado, para trabalhos integrados de aproveitamento de águas residuais de indústrias e outras atividades antrópicas na produção de biomassa algal para a nutrição animal, fertilização e/ou produção de biocombustíveis de terceira geração. Tais propostas atendem aos principais requisitos para o desenvolvimento sustentável, promovendo o equilíbrio entre desenvolvimento econômico e preservação ambiental.

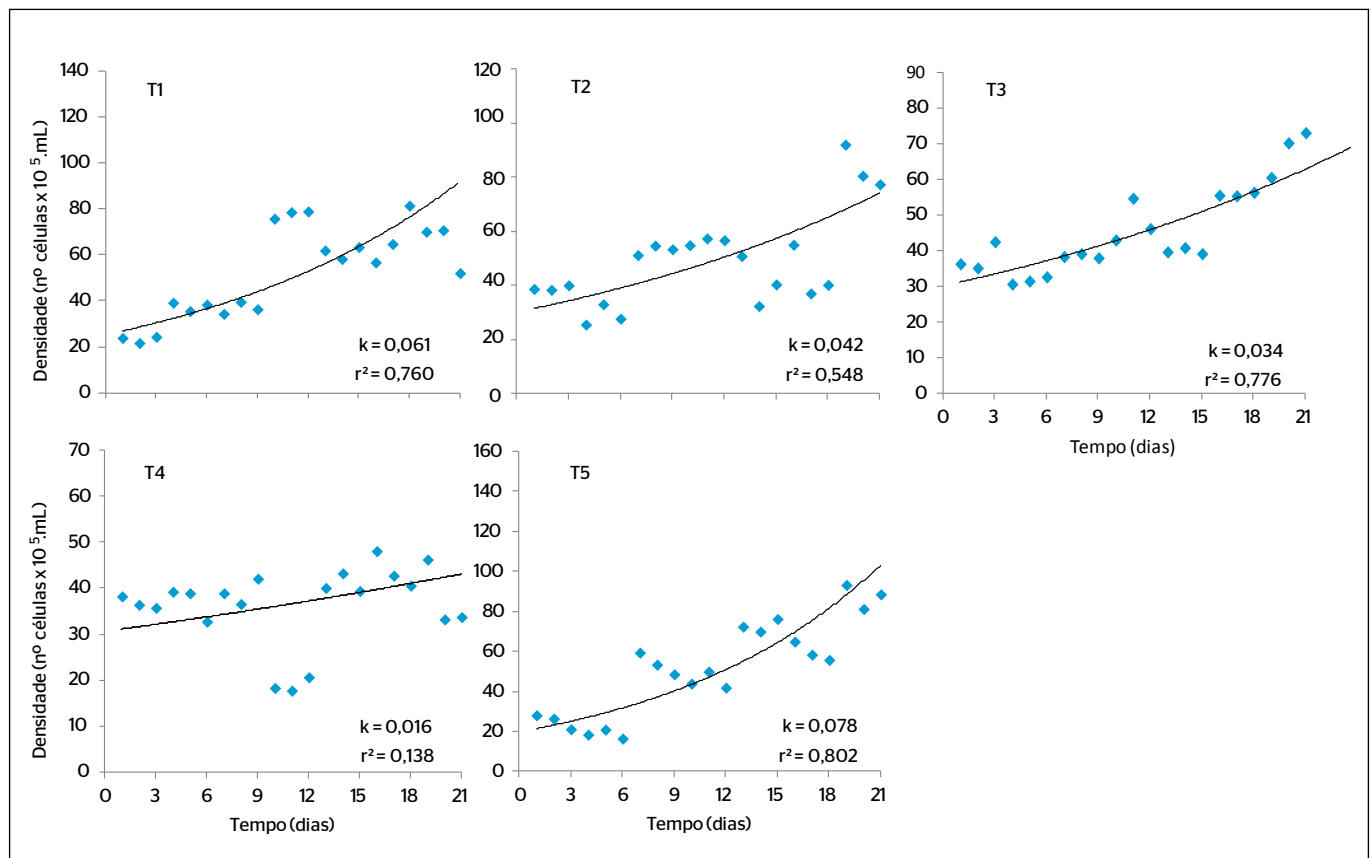


Figura 3 - Análise da regressão (r^2) e crescimento exponencial (k) de *P. subcapitata* nos diferentes tratamentos.

REFERÊNCIAS

- ARANTES, P.B. (2010) *Influência do herbicida glifosato (n-(fosfonometil) glicina) na formação de biomassa da alga Pseudokirchneriella subcapitata (Chlorophyceae)*. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro.
- BERENGUEL, M.; RODRIGUEZ, F.; ACIÉN, F.G.; GARCIA, J.L. (2004) Model predictive control of pH in tubular photobioreactors. *Journal of Process Control*, v.14, n.4, p.377-387.
- BRASIL. (2005) Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 375, de 17 de março de 2005. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 18 mar. 2005. Seção 1, p.58-63.
- CARVALHO, E.M.; OTTONELLI, F.; ANSILAGO, M.; GODOY, H.C.; NAKAGAKI, J.M.; RAMIRES, I. (2012) Growth kinetics of the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak (Chlorophyceae) in natural water enriched with NPK fertilizer. *Biochemistry and Biotechnology Report*, v.1, n.2, p.14-18.
- GAYLARDE, C.C.; BELLINASSO, M.L.; MANFIO, G.P. (2005) Biorremediação Aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n.34, p.36-43.
- GUILHERME, L.R.G.; MARQUES, J.J.; PIERANGELI, M.A.P.; ZULIANI, D.Q.; CAMPOS, M.L.; MARCHI, G. (2005) Elementos-traço em solos e sistemas aquáticos. *Tópicos em ciências do solo*, v.4, p.345-390.
- LIMA, P.C.G. (2010) *Estudos dos mecanismos de detoxificação e tolerância aos metais crômio e cobre em Pseudokirchneriella subcapitata e Pistia stratiotes e o uso das macrófitas Tpha sp e Phragmites sp na remoção de nutrientes em wetlands construídos*. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Carlos.
- LOPES, E.J. (2007) *Seqüestro de dióxido de carbono em fotobiorreatores*. Tese (Pós-graduação) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- MIASHIRO, L. (2008) *Avaliação ambiental de um sistema de piscicultura, através do fitoplâncton e de ensaios ecotoxicológicos com a microalga Pseudokirchneriella subcapitata* (Chlorophyceae). Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesca, São Paulo.
- MOREIRA-SANTOS, M.; SOARES, A.M.V.M.; RIBEIRO, R. (2004) An situ bioassay for freshwater environments with the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.59, n.2, p.164-173.
- MOZETO, A.A. & ZAGATTO, P.A. (2008) Introdução de agentes químicos no ambiente. In: ZAGATTO, A.A. & BERTOLETTI, E. (Eds.) *Ecotoxicologia aquática - princípios e aplicações*. 2 ed. São Carlos: RiMa.
- OHSE, S.; DERNER, R.B.; OZÓRIO, R.Á.; BRAGA, M.V. da C.; CUNHA, P.; LAMARCA, C.P.; SANTOS, M.E. (2008) Crescimento de microalgas em sistema autotrófico estacionário. *Revista Biotemas*, v.21, n.2, p.7-18.
- OLIVEIRA, Á.C. (2007) *Toxicidade de elementos-traço para consumidores primários na presença de exopolissacarídeos produzidos por organismos fitoplanctônicos* (Chlorophyceae e Cyanophyceae). Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Carlos.
- SILVA, S.A.P. (2007) *Biorremediação em águas residuais: remoção de fosfatos utilizando microalgas Chlorella vulgaris imobilizadas em meio de alginato de sódio*. Dissertação (Mestrado em Hidrobiologia) - Universidade do Porto, Porto.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; PELICIONI, L.C.; OLIVERA, A. (1999) Use of inorganic (NPK) and the CHU12 medium for cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* in laboratory. *Brazilian Journal of Ecology*, v.1, p.10-15.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H. & ROCHA, O. (2003) *Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos*. 2 ed. São Carlos: RiMa. 122p.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; IBARRA, L.C.C.; FIORESI, T.B. (2009) Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korshikov (Chlorophyta) em laboratório utilizando meio CHU12 e de macrófita com NPK. *Boletim do Instituto de Pesca*, v.35, n.1, p.111-118.
- SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; MILLAN, R.N.; BERCHIELLI, F.A.; BRAGA, F.M.S.B. (2011) Use of alternative media and different types of recipients in a laboratory culture of *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korshikov (Chlorophyceae). *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v.33, n.3, p.247-253.
- ZAR, J.H. (1999) *Biostatistical Analysis*. 4 ed. Rio de Janeiro: Prentice-Hall do Brasil, Ltda. 944p.