



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COLEGIADO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



**Ciências
Biológicas**
UEL

TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JOSÉ OTÁVIO PAGLIARI DOS SANTOS

PADRÃO DE CRESCIMENTO EM DUAS ESPÉCIES DE DIATOMÁCEAS

Londrina – Paraná
2024

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

JOSÉ OTÁVIO PAGLIARI DOS SANTOS

**PADRÃO DE CRESCIMENTO EM DUAS ESPÉCIES
DE DIATOMÁCEAS**

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Weliton José da Silva
Coorientador: Ma. Vanessa Chagas de Almeida

Londrina – Paraná
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

S237p Santos, José Otávio Pagliari dos.
Padrão de crescimento em duas espécies de diatomáceas / José Otávio Pagliari dos Santos. - Londrina, 2024.
25 f. : il.

Orientador: Weliton José da Silva.
Coorientador: Vanessa Chagas de Almeida.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, 2024.
Inclui bibliografia.

1. Padrão de crescimento - TCC. 2. Diatomáceas - TCC. 3. Cultivo de algas - TCC. 4. Bacillariophyceae - TCC. I. Silva, Weliton José da. II. Almeida, Vanessa Chagas de. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU 574

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Weliton José da Silva

Ma. Vanessa Chagas de Almeida

Prof. Dr. José Eduardo Lahoz Ribeiro

Prof. Dr. Fernando Camargo Jerep

Londrina, 10 de maio de 2024

DEDICATÓRIA

À memória de minha amada vó, Lucia Ribeiro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente meu orientador Prof. Dr. Weliton José da Silva, pelo apoio e incentivo ao longo do curso, sem sua orientação e ajuda esse trabalho não existiria.

Agradeço também a todos os membros da banca, pelos ensinamentos ao longo desses anos de graduação e por dedicarem seu precioso tempo para lerem e corrigirem esse trabalho.

A Universidade Estadual de Londrina, que foi uma segunda casa nesses 5 anos de curso.

A todos os membros do Laboratório de Microalgas Continentais da Universidade Estadual de Londrina (LAMiC-UEL), especialmente a minha coorientadora Ma. Vanessa Chagas de Almeida pelas correções e oxidações, e a Milena Eduarda Ferreira Navarro, pelos momentos de descontração e pelo auxílio nas oxidações.

Expresso também minha gratidão ao Prof. Dr. Marcos Robalinho Lima, por ceder os frascos Erlenmeyer, sem eles esse trabalho não seria possível.

Ao Vitor Hugo Montini, um amigo desses 5 anos de curso, obrigado pelas conversas e auxílio na esterilização dos meios.

Aos amigos que fiz ao longo da graduação, com certeza a amizade de vocês teve impacto em quem sou hoje e em quem vou ser.

A toda minha família que sempre me apoiou e incentivou em toda a minha formação, meu pai, Cícero, a minha querida irmã Giovana e especialmente a minha mãe, Fátima, nesta caminhada final.

Expresso aqui o meu mais profundo agradecimento a minha falecida avó Lucia Ribeiro, que sempre nos incentivou e apoiou nos estudos.

SANTOS, José Otávio Pagliari dos. **Padrão de crescimento em duas espécies de diatomáceas**. 2024. 35 fls. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2024.

RESUMO

A obtenção de curva de padrão de crescimento é uma etapa necessária para o desenvolvimento de pesquisas que envolvem o crescimento de microrganismos em laboratório. O objetivo do presente trabalho foi a caracterização das curvas de crescimento de duas espécies de diatomáceas perifíticas. Para isso, amostras de perifíton foram coletadas no município de Tamarana – Paraná. Os isolados foram obtidos através da metodologia de “pescaria” e lavagem, e plaqueamento em meio de cultura sólido. As diatomáceas foram transferidas para meios de cultura WC sólidos e líquidos, acondicionados em câmara de crescimento com iluminância de 676 a 1.702 lux a 21 °C com fotoperíodo de 12 h de claro:escuro. Matrizes de duas morfoespécies foram mantidas em câmara de DBO Solab SL- 225/364 com iluminância de 3.060 lux, em fotoperíodo de 12 h claro:escuro, em temperatura de 21 °C, a partir dessas foi realizada a montagem de experimento em quintuplicata biológica para a obtenção das curvas de crescimento. A análise foi realizada utilizando Python com bibliotecas especializadas como Pandas para manipulação de dados e Matplotlib para visualização gráfica e Scipy foi usado para o ajuste do modelo logístico. Os táxons foram identificados como *Gomphonema* sp. e *Nitzschia* sp., faltando ainda detalhes que permitam a identificação ao nível de espécie. A taxa de crescimento estimada foi de 1,05 log ind.mL⁻¹ para *Gomphonema* sp. e de 0,85 log ind.mL⁻¹ para *Nitzschia* sp. Diferentemente do observado para as taxas de crescimento, a capacidade de suporte de *Nitzschia* sp. foi 69 vezes maior que de *Gomphonema* sp.

Palavras-chave: Bacillariophyceae. Culturas unialgais. Ecologia.

ABSTRACT

Obtaining a standard growth curve is a necessary step for the development of research involving the growth of microorganisms in the laboratory. The objective of the present study was to characterize the growth curves of two species of periphytic diatoms. For this purpose, periphyton samples were collected in the municipality of Tamarana - Paraná. Isolates were obtained using the cell fishing and washing methodology, and plating on solid culture medium. The diatoms were transferred to solid and liquid WC culture media, placed in a growth chamber with illuminance ranging from 676 to 1,702 lux at 21 °C, with a photoperiod of 12 hours light:dark. Matrices of two morphospecies were maintained in a Solab SL-225/364 BOD chamber with illuminance of 3,060 lux, in a photoperiod of 12 hours light:dark, at a temperature of 21 °C. From these, a biological quintuplicate experiment was set up to obtain the growth curves. The analysis was performed using Python with specialized libraries such as Pandas for data manipulation and Matplotlib for graphical visualization, and Scipy was used for logistic model fitting. The taxa were identified as *Gomphonema* sp. and *Nitzschia* sp., with details still lacking to allow identification at the species level. The estimated growth rate was 1.05 log ind.mL⁻¹ for *Gomphonema* sp. and 0.85 log ind.mL⁻¹ for *Nitzschia* sp. Unlike the observed growth rates, the carrying capacity of *Nitzschia* sp. was 69 times greater than that of *Gomphonema* sp.

Keywords: Cultivation. Bacillariophyceae. Ecology.

SUMÁRIO

| | Pág. |
|---------------------------------|------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 12 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 18 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 22 |
| 5. CONCLUSÕES | 29 |
| REFERÊNCIAS | 30 |

1. INTRODUÇÃO

As diatomáceas são algas unicelulares fotossintetizantes, podendo ser encontradas solitariamente ou formando colônias. Dotadas de clorofilas *a* e *c* e fucoxantina, esses organismos apresentam uma alta eficiência fotossintética. Esse grupo é caracterizado por uma parede celular composta por sílica, denominada frústula. A parede é altamente ornamentada e comporta peças específicas, não encontradas em nenhum outro grupo de algas (ROUND; CRAWFORD; MANN, 1990).

Atualmente são conhecidas cerca de 18.186 espécies de diatomáceas, destas 2.000 fósseis (GUIRY, 2024). Para o Brasil até o presente trabalho foram contabilizadas 1.329 espécies (THE BRAZIL FLORA GROUP, 2024). As estimativas mais ponderadas para o número total de espécies desse grupo são de 30.000 a 100.000, o que sugere que muitas espécies ainda não foram descritas para a ciência (GUIRY, 2024).

As diatomáceas são um grupo abundante e amplamente distribuído, habitando oceanos, lagos, rios, ambientes terrestres e formações de gelo polares. Representantes das diatomáceas podem ser encontradas em locais com baixa luminosidade, aderidas em substratos, à deriva no plâncton ou associadas com fungos, formando líquens (LAKATOS; LANGE-BERTALOT; BÜDEL, 2004). Além de contribuírem nas teias tróficas destes ambientes, também são responsáveis por 20-40 % da produção primária total do planeta (B-BÉRES et al., 2023; GRAHAM et al., 2016).

Conforme B-Béres e colaboradores (2023), seguindo a classificação da *Millennium Ecosystem Assessment* (MEA), há 23 serviços ecossistêmicos relacionados às diatomáceas. Dentre estes, estão incluídos a fotossíntese, produção primária, formação de sedimento, ciclo de nutrientes, provisão de habitat e fonte de alimento para muitos organismos, serviços de regulação, a produção de oxigênio, controle do clima e estabilização do sedimento, compostos bioativos e tecnologias criadas para produção de fármacos, biocombustíveis, tratamento de água, micro e nanotecnologia, a inspiração artística e oportunidades educacionais.

No Brasil, ao longo de 177 anos, a maioria das publicações científicas relacionadas às diatomáceas se concentraram nas descrições da flora e da ecologia. Contudo, são escassos os trabalhos relacionados a genética, biotecnologia, fisiologia e pesquisa aplicada (ZORZAL-ALMEIDA et al., 2022). Para isso, as culturas de

diatomáceas são importantes ferramentas para atividades de pesquisa relacionadas a estas e outras áreas como ecologia e biologia molecular (VAULOT et al., 2023; ZAKHAROVA et al., 2022). Em uma análise preliminar, Komaristaya e colaboradores (2015), afirmam que até 2014 eram registradas 61 espécies de diatomáceas em cultura entre as 2.307 espécies de algas registradas nas 12 principais coleções de culturas no World Data Center for Microorganisms – Culture Collections Information Worldwide (WDCM CCINFO).

Atualmente o WDCM CCINFO possui 850 coleções registradas, sendo 24.044 espécies/subespécies de microalgas (WDCM, 2024), onde foram contabilizadas mais de 6.400 cepas de diatomáceas em 27 coleções, pertencentes a 828 espécies e outras 300 cepas não identificadas (VAULOT et al., 2023). Isso mostra que a biodiversidade de diatomáceas é sub-representada em cultivos, e enfrenta desafios como o estabelecimento de culturas e a identificação dos táxons (KOMARISTAYA et al., 2015; ZAKHAROVA et al., 2022).

As curvas de crescimento fornecem informações comparativas, principalmente como parâmetros laboratoriais com cultivos, traduzindo as características dos organismos a diferentes condições ambientais e genéticas, entre espécies ou cepas (KOURTCHENKO et al., 2023). Assim, além da baixa representação da diversidade de diatomáceas em cultivo, pouco se conhece sobre os comportamentos de crescimento desses organismos.

O objetivo geral do presente trabalho é a determinação da curva de crescimento de espécimes de diatomácea em condições controladas de cultivo em laboratório. Para isso, os objetivos específicos são o isolamento de espécies de diatomácea, o estabelecimento de cultura unialgal, determinação da espécie utilizando bibliografia de referência e manutenção de cultura viável em laboratório.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Curvas de crescimento e padrões de crescimento

Os estudos sobre o crescimento populacional têm despertado o interesse ao longo da história, um exemplo é o caso de Fibonacci, que no século 12 pensou sobre o potencial crescimento populacional em coelhos (COLE, 1954; EDELSTEIN-KESHET, 2005).

Mas foi o modelo de crescimento populacional de Thomas R. Malthus em 1798, o primeiro a estabelecer as bases para os estudos populacionais quantitativos (PANIK, 2014). Em sua obra *An Essay on the Principle of Population*, Malthus trouxe a principal ideia pela qual é lembrado até os dias atuais, ou seja, a de que as populações humanas tendem a crescer exponencialmente, enquanto a produção de alimentos cresce apenas aritmeticamente (MALTHUS, 1798).

Dessa forma, a base matemática para o crescimento exponencial foi entendida por Malthus pelo princípio de que em cada geração, se cada indivíduo na população produzir mais do que um descendente que sobreviva até a idade reprodutiva, o tamanho da população aumentaria geometricamente. O modelo exponencial de crescimento populacional assume que a taxa de crescimento é constante e que não há restrições de recursos ou outros limites ambientais. Matematicamente, isso é representado pela equação:

$$N(t) = N_0 \cdot e^{rt}$$

onde $N(t)$ é a população no tempo, N_0 é a população inicial, r é a taxa de crescimento relativa, t é tempo e e é a base dos logaritmos naturais. Esta equação descreve uma curva que aumenta rapidamente à medida que o tempo avança, caracterizando o crescimento exponencial (EDELSTEIN-KESHET, 2005).

Os estudos de Malthus influenciaram diretamente trabalhos em outras áreas, inclusive na área de ecologia. Um exemplo disso, foi o modelo logístico, desenvolvido por Pierre François Verhulst, o qual expandiu o modelo de Malthus ao introduzir a noção de capacidade de suporte, que modera o crescimento exponencial e reflete mais realisticamente as condições ambientais que limitam o crescimento populacional (SMITH; KEYFITZ, 1977).

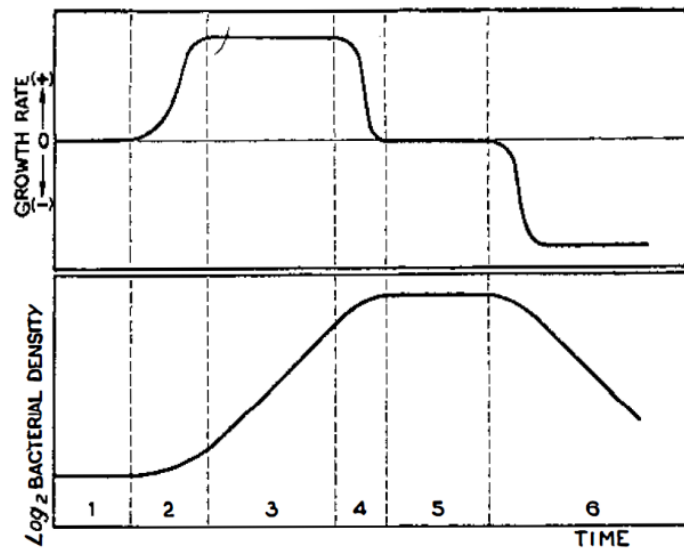
Os estudos desenvolvidos Verhulst (1838, 1845) resultaram na equação:

$$\frac{dP}{dt} = r \cdot P \cdot \left(1 - \frac{P}{K}\right)$$

onde P é o tamanho da população no tempo t , $\frac{dP}{dt}$ é a taxa de mudança da população ao longo do tempo, r é a taxa intrínseca de crescimento da população e K é a capacidade de suporte do ambiente, que é o tamanho máximo da população que o ambiente pode sustentar de forma sustentável. Segundo essa equação, quando P é pequena comparada a K , o termo $\left(1 - \frac{P}{K}\right)$ é próximo de 1, o que significa que a população cresce quase exponencialmente. De outra forma, à medida que P se aproxima de K , o termo $\left(1 - \frac{P}{K}\right)$ se aproxima de zero, o que reduz a taxa de crescimento até que está se estabilize, impedindo que P exceda K (KOT, 2001).

Os estudos sobre crescimento populacional são importantes para a descrição dos padrões de crescimento de diferentes organismos, tanto na natureza quanto cultivados *in vitro*. No campo microbiológico, a matemática do crescimento populacional e dos padrões de crescimento, também conhecido como cinética de crescimento, evoluiu consideravelmente, especialmente com os estudos de Jaques Monod (1910 – 1976) e seus contemporâneos a respeito das taxas de crescimento e produtividade de metabólitos de bactérias. Monod (1949) dividiu as fases sucessivas de crescimento das bactérias como: fase lag, quando há taxa de crescimento nulo; fase de aceleração, quando a taxa de crescimento aumenta; fase exponencial, quando a taxa de crescimento se torna constante; fase de retardação, quando a taxa de crescimento diminui; fase estacionária, quando a taxa de crescimento volta a se tornar nula; e a fase de declínio, quando a taxa de crescimento se torna negativa (Figura 1). Mais recentemente os termos e discussões mais utilizados tem se restringido às fases lag, fase exponencial, também conhecida como fase log, fase estacionária e fase de declínio ou morte (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Figura 1 - Fases do crescimento bacteriano, conforme Monod (1949). A curva superior se refere as taxas de crescimento, enquanto a curva inferior a densidade de bactérias em log. As linhas tracejadas marcam as fazes de crescimento e os números se referem a cada fase, sendo 1- Fase Lag, 2- Fase de aceleração, 3- Fase exponencial, 4- Fase de retardação, 5- Fase estacionária e 6- Fase de declínio.



Fonte: Monod (1949).

Os padrões de crescimento ou cinéticas podem variar de espécie para espécie e de acordo com as condições ambientais (SARDARI, 2023). Essas variações poderão ser observadas através de diferenças nas taxas intrínsecas de crescimento, nas taxas de crescimento ao longo do tempo e da capacidade de suporte. Com isso, uma espécie, em determinadas condições, poderá se manter em uma fase lag mais demorada, apresentar crescimento mais rápido, atingindo assim, a fase estacionária antecipadamente, manter-se mais tempo na fase estacionária ou chegar na fase de declínio mais rapidamente do que outra espécie. Além disso, alterações nas condições do ambiente em que esses organismos crescem podem alterar completamente esse padrão, servindo como indicadores da qualidade do ambiente (GONZALEZ; ARANDA, 2023).

Cultivo de microrganismos

O cultivo de microrganismos em laboratório é uma importante ferramenta de estudo, tanto para a pesquisa aplicada, como a extração de compostos de interesse, quanto para estudos biológicos em geral (KAPINUSOVA et al., 2023)

O começo da microbiologia é creditado às observações iniciais de Anton van Leeuwenhoek (1632-1723) e Robert Hooke (1635-1703). Leeuwenhoek observou diferentes materiais em microscópio e enviava cartas detalhadas sobre suas observações para *The Royal Society* em Londres (SCHMIDT, 2019). Mas foi na segunda metade do século XIX que a microbiologia se estabeleceu como ciência,

principalmente pelos trabalhos de Louis Pasteur (1822-1895) e Robert Koch (1843-1910) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Testes de cultivo de microrganismos foram fundamentais para o desenvolvimento de teorias sobre origem dos seres vivos, incluindo a refutação da hipótese da geração espontânea, por Louis Pasteur (JAGIELSKI, 2023). Koch, contribuiu com diversas técnicas na microbiologia, incluindo no cultivo de bactérias, introduzindo a utilização de meios sólidos de gelatina. Contudo pelas desvantagens do uso da gelatina, esta foi substituída por ágar, sugestão de Fannie Eilshemius Hesse, esposa de um de seus assistentes, Walther Hesse, com contribuição de Julius Richard Petri (BONNET et al., 2020; HITCHENS; LEIKIND, 1938).

Histórico do cultivo de algas

A primeira vez a ter sido utilizado o termo “cultura” em relação a algas, foi pelo microbiologista Ferdinand Cohn em 1850 com *Haematococcus*. Contudo não foi estabelecida uma cultura por tempo indefinido e não foi utilizado meio de cultura e nem o isolamento do organismo. O fisiologista vegetal Famintzin, em 1871, teria sido o primeiro a utilizar um meio de cultura com apenas sais inorgânicos, e o microbiologista Martinus Willem Beijerinck, no ano de 1890, a obter culturas puras de algas verdes, utilizando a técnica de Robert Koch, adicionando água da amostra ou meio de cultura à gelatina (PREISIG; ANDERSEN, 2005).

As primeiras culturas axênicas de diatomáceas marinhas e dulciaquícolas estabelecidas foram as de Pierre Miquel em 1890 e 1892. Seu trabalho pioneiro contribuiu para o desenvolvimento de novas técnicas de isolamento e meio de cultura (KUFFERATH, 1930). Pierre Miquel, em suas pesquisas sobre cultivo de diatomáceas, estabeleceu formulações de sais minerais usadas para enriquecer a água do mar, promovendo o crescimento adequado de diatomáceas e outros tipos de algas. Essas soluções foram precursoras dos meios de cultivo modernos que agora incluem uma variedade de nutrientes essenciais. A solução "A" continha nitrato, que é uma fonte de nitrogênio essencial para o crescimento das algas, enquanto a Solução "B" incluía fosfato (PREISIG; ANDERSEN, 2005).

Apesar do reconhecimento da importância dos trabalhos de Beijerinck e Miquel quanto aos cultivos de algas (KUFFERATH, 1930; PREISIG; ANDERSEN, 2005), alguns autores, como Klebs (1896) e Pringsheim (1946), questionam se eles de fato

obtiveram culturas puras de algas. Pringsheim (1946) credita as primeiras culturas puras de diatomáceas a Richter (1903) e Chodat (1913). Culturas puras ou axênicas, são definidas como aquelas que são formadas apenas pelo organismo de interesse, e culturas unialgais aquelas compostas por uma única espécie de alga com a ocorrência de outros microrganismos (BOLD, 1942; POKORNY et al., 2022).

Klebs (1896) argumenta sobre a dificuldade de se trabalhar utilizando meio de gelatina, além de que, o consumo dos componentes orgânicos presentes no meio põe em dúvida a pureza da cultura.

Outros trabalhos também contribuíram para o desenvolvimento do cultivo de algas, incluindo as diatomáceas. Klebs (1896), Tischutkin (1897), Beijerinck (1898) e Ward (1899) teriam sido alguns dos pioneiros na utilização de meios de cultivo sólido utilizando ágar para algas (BOLD, 1942; PREISIG; ANDERSEN, 2005; PRINGSHEIM, 1946). Richter (1903) deu continuidade aos trabalhos de Miquel, e utilizou meio sólido com ágar para isolar as espécies de diatomáceas *Nitzschia palea* (Kütz.) W. Sm. e *Navicula minuscula* Grun.

Allen e Nelson (1910) adaptaram as soluções “A” e “B” do meio de cultivo de Miquel para o isolamento e cultivo de diatomáceas marinhas, obtendo culturas de *Skeletonema*, *Thalassiosira* e *Chaetoceros*. Ernst Georg Pringsheim (1881 – 1970) publicou alguns estudos detalhando métodos para cultivo de algas, como a melhoria da técnica de isolamento por capilar em pipeta, a utilização de acetato no meio de cultura e de extratos do solo. Além disso utilizou água destilada em vidro para a produção de seus meios de cultivo, ao invés da água de torneira com cloro, o que afetava o crescimento das algas (PREISIG; ANDERSEN, 2005).

Os meios de cultivo foram consideravelmente aperfeiçoados por estudos de E. Schreiber (datas não encontradas), Shu Ping Chu (1907 – 1976) e Luigi Provasoli (1908 – 1992). Provasoli e seus colaboradores teriam incluído vitaminas e outros compostos orgânicos e o uso de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) como quelante. Houve também a necessidade de adicionar outros metais-traço devido o maior grau de purificação dos sais, e a primeira aplicação de antibióticos com a finalidade de se obter culturas puras (PREISIG; ANDERSEN, 2005; RODHE, 1978).

Técnicas de Isolamento

Andersen (2005) divide as técnicas em clássicas e automatizadas, as primeiras são caracterizadas pela utilização de equipamentos mais simples, enquanto as automatizadas possuem maior precisão e capacidade de separar o organismo de interesse de contaminantes, como bactérias, a aplicação dessas técnicas dependem dos objetivos do trabalho e a disponibilidade de equipamentos. De qualquer forma, ambas as técnicas possuem exigências, como experiência do isolador, mão de obra qualificada para operação de equipamentos e custo financeiro de equipamentos (SILVA; SCHERER; ANDRADE, 2014).

Dentre as técnicas clássicas utilizadas para o isolamento de diatomáceas podemos apontar o isolamento de uma única célula por micropipeta. Esta consiste na tentativa de captura (ou pescaria) de uma só célula com o auxílio de uma micropipeta e na lavagem do isolado em meio esterilizado repetidas vezes, com o objetivo de se obter culturas puras (PRINGSHEIM, 1946).

Placas de ágar podem ser usadas de diferentes formas, como pelo estriamento, adição de gota ou borrifo e inoculação por mistura em ágar (SILVA; SCHERER; ANDRADE, 2014). Diluição seriada, centrifugação e o uso de meios de cultura enriquecidos que favoreçam o crescimento de determinados grupos, também podem ser usadas, além disso a combinação de técnicas pode facilitar a obtenção de culturas puras (SINGH, 2015).

Entre as técnicas automatizadas há a citometria de fluxo, podendo ser isoladas células de diferentes tamanhos, incluindo organismos muito pequenos, o equipamento é capaz de contar e analisar células em uma amostra, e selecioná-las, pela deposição de gotas as células são depositadas em placas ou tubos de ensaio contendo meio de cultura (ANDERSEN, 2005).

Para a obtenção de culturas puras podem ser utilizados métodos adicionais, como a adição de antibióticos em meio de cultivo, filtração a vácuo, exposição à radiação UV, tratamento enzimático e com outros agentes antimicrobianos (SHEN; LEE, 2004; FERNANDEZ-VALENZUELA, 2021).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material

Amostras perifíticas foram coletadas na Estância Barão do Rio Branco, localizada no município de Tamarana, Paraná (23°52'51,15" S; 51°8'6,26" W), a partir de substratos vegetais e rochosos, em 30 de setembro de 2023. Os materiais foram levados ao Laboratório de Microalgas Continentais (LAMiC-UEL) onde os substratos foram raspados com auxílio de escovas de dente e os materiais raspados foram acondicionados em frascos transparentes e refrigerados a 5 °C para maior durabilidade das amostras.

Isolamento das espécies de diatomáceas

Duas culturas de espécies diferentes foram isoladas, uma identificada como G e outra como Z/D. O isolamento e a obtenção de culturas monoclonais de diatomáceas foi realizado utilizando o método de pescaria e lavagem (PRINGSHEIM, 1946). Para isso, capilares foram produzidos a partir de pipeta Pasteur de vidro aquecida em chama e alongada com o auxílio de uma pinça de ponta fina. Os capilares foram conectados a tubos de silicone, contendo pequeno filtro de algodão (Figura 2).

Figura 2 - Pipeta Pasteur de vidro com fino tubo capilar, tubos de silicone com filtro de algodão.



Fonte: o próprio autor.

Todo o ambiente de manuseio foi limpo e esterilizado utilizando álcool 70%, os materiais de vidro também foram flambados. Sobre uma lâmina de vidro foi disposta uma gota da amostra periférica. As algas na gota foram observadas em Microscópio Óptico Motic nos aumentos de 100x e 400x.

O capilar de vidro foi preenchido com meio de cultura WC (GUILLARD; LORENZEN 1972). Ao encontrar um indivíduo que aparentasse estar viável, apresentando por exemplo, motilidade ou cloroplasto, a ponta do capilar era posicionada em direção ao espécime. O indivíduo era sugado através da pipetagem com objetivo de se obter um único isolado. Em um outro local da lâmina, o espécime, sugado anteriormente, era depositado em uma nova gota com meio, separando-o de detritos e outros organismos que podem ter sido aspirados no capilar. O processo foi repetido até a obtenção de uma gota onde se observasse apenas a presença do indivíduo de interesse. Posteriormente, este era disposto em um poço de uma placa de micropoços, contendo meio de cultivo WC.

O crescimento dos organismos nos micropoços foi observado em microscópio óptico Wetzlar, modelo Wilovert. O crescimento do isolado também era notado pela formação de incrustações marrons no fundo dos micropoços, mudando a coloração do meio. Quando esse estado foi observado, o material foi retirado e colocado em meio líquido em placa de Petri para aumento da densidade celular. Após duas semanas ou até que o fundo da placa contivesse um tapete ou grânulos marrons, a amostra foi homogeneizada e, com o auxílio de uma alça de platina, uma alíquota foi semeada em uma placa de Petri contendo meio WC solidificado em ágar (1,5% - 2,0%). O conteúdo foi espalhado em forma de estrias.

Posteriormente, as colônias desenvolvidas foram extraídas utilizando uma pipeta, sendo que cada uma foi disposta em nova placa de Petri contendo meio líquido. Esse procedimento de alternância entre meio sólido e líquido foi repetido até a obtenção de culturas unialgais monoclonais em meio líquido.

Os isolados foram avaliados em lâminas frescas em microscopia óptica, verificando possíveis contaminações e crescimento de outras algas, inclusive diatomáceas de espécies diferentes. Confirmados os isolamentos, os conteúdos das placas de Petri com meio líquido foram transferidos para frascos de 200 mL de meio líquido para crescimento da matriz da cultura. A matriz da cultura G foi montada em 19/03/2024 e a de Z/D foi montada em 21/03/2024 em cultivo estacionário.

Todos os cultivos da fase de isolamento foram mantidos em câmara com iluminação de 676 a 1.702 lux, em fotoperíodo de 12 h de claro por 12 h de escuro, com temperatura de 21 °C. Já a matriz foi mantida em câmara de DBO Solab SL-225/364 com iluminação de 3.060 lux, em fotoperíodo de 12 h de claro por 12 h de escuro, com temperatura de 21 °C.

Caracterização e identificação dos táxons

Para identificação dos táxons, materiais de cada uma das matrizes G e Z/D foram oxidados conforme CEN (2003). Para isso, uma alíquota de 1 mL foi tomada e colocada em tubo de ensaio de 10 mL.

Todo o material oxidado foi colocado sobre lamínula e, em seguida, levado em placa aquecedora a 50 °C para evaporação da água. O material seco foi incluído entre lâmina e lamínula utilizando verniz vitral, para produção de lâminas semipermanentes.

Posteriormente, o material foi microfotografado em microscópio óptico Motic e medidos através do *software* Zeiss Axiovision Rel. Os espécimes fotografados foram identificados utilizando bibliografia de referência (e.g., HUSTEDT, 1965; KRAMMER; LANGE-BERTALOT, 1986; METZELTIN; LANGE-BERTALOT, 1998).

Delineamento experimental

Dois ensaios foram conduzidos em quintuplicata em cultivo estacionário. Para isso, 1 mL de cada uma das matrizes G e Z/D foram pipetados e acrescentados em frascos Erlenmeyer com 250 mL de meio WC. Os frascos foram acondicionados à 21 °C e fotoperíodo 12:12 claro:escuro, em Câmara de DBO Solab SL- 225/364, com iluminação de 3.060 lux. Os experimentos foram montados 31/03/2024.

No dia de montagem dos ensaios, 1 mL de cada uma das matrizes foi amostrado e armazenado em tubos Eppendorf e preservados com Lugol, a fim de se verificar a densidade celular das matrizes e a densidade celular inicial de cada réplica. Posteriormente, alíquotas de 1 mL de cada réplica foram retiradas a cada três dias durante 16 dias com o intuito de estimar a densidade celular ao longo do tempo e construir as curvas de crescimento para as duas espécies.

As contagens foram realizadas em microscópio invertido Will, com câmara de Utermöhl, para a obtenção de densidade celular (indivíduos por mL, ind. mL⁻¹). As curvas de crescimento foram obtidas no *software* Microsoft Excel.

A análise da dinâmica de crescimento das populações dos táxons isolados utilizou o modelo de crescimento logístico, o qual é amplamente empregado para descrever como a densidade populacional de táxons se aproxima de um limite superior, conhecido como capacidade de suporte, conforme os recursos disponíveis tornam-se limitados.

Os dados foram ajustados por logaritimização e agrupados por tempo, calculando-se a média dos valores para cada ponto temporal. Esses valores médios foram usados para ajustar o modelo logístico.

Para o cálculo, a população inicial (P_0) foi considerada a concentração inicial da cultura e a capacidade de suporte (K) foi tratada como a maior densidade celular observada nas culturas.

Para o ajuste do modelo, foram utilizadas as funções `curve_fit` do módulo `scipy.optimize`, que implementa o método dos mínimos quadrados não-lineares para estimar os parâmetros do modelo. A análise foi realizada utilizando Python com bibliotecas especializadas como Pandas para manipulação de dados e Matplotlib para visualização gráfica. Scipy foi usado para o ajuste do modelo logístico.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

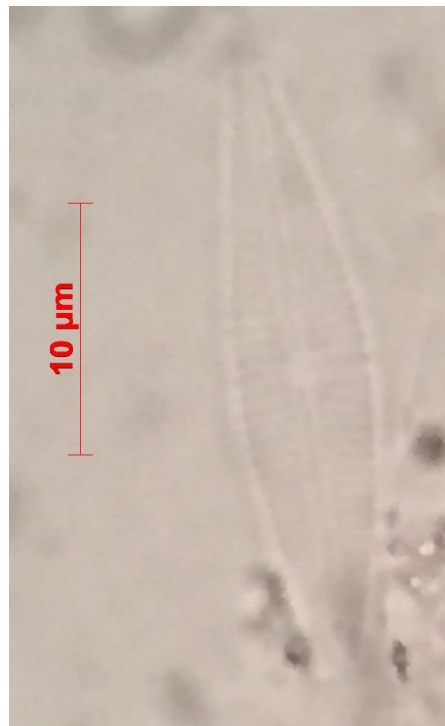
Foram obtidas, a partir dos isolamentos, duas culturas unialgais de duas espécies distintas, identificadas ao nível de gênero como *Nitzschia* sp. e *Gomphonema* sp. (Figura 4 e 5).

Figura 4 - Vista valvar de *Nitzschia* sp. em microscopia óptica.



Fonte: o próprio autor.

Figura 5 - Vista valvar de *Gomphonema* sp. em microscopia óptica

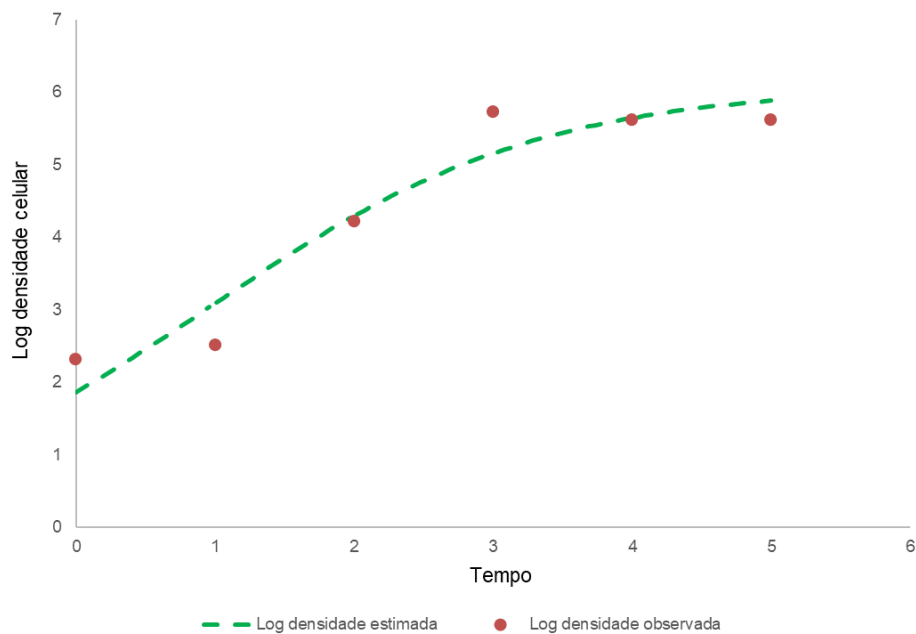


Fonte: o próprio autor.

A concentração inicial utilizada para *Nitzschia* sp. foi de 203,99 ind.mL⁻¹. O modelo logístico conforme Figura 6, estimou P^0 de aproximadamente 74,13 ind.mL⁻¹ e K igual a 1.202.264,43 ind.mL⁻¹. A taxa de crescimento estimada foi de 0,85 d⁻¹ resultando na equação a seguir, lembrando que os valores obtidos para $P(t)$ estão log transformados:

$$P(t) = \frac{6,08}{1 + \left(\frac{6,08 - 1,87}{1,87}\right) \cdot e^{-0,85t}}$$

Figura 6 - Densidade celular esperada e observada para *Nitzschia* sp.

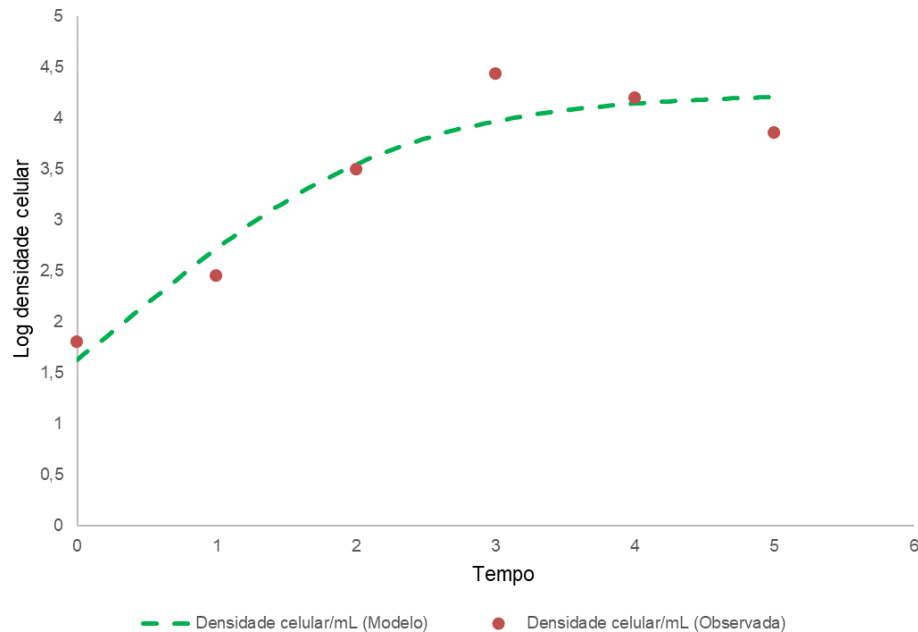


Fonte: o próprio autor.

A concentração inicial utilizada para *Gomphonema* sp. foi de 62,15 ind.mL⁻¹. O modelo logístico (Figura 7) estimou P^0 de aproximadamente 42,66 ind.mL⁻¹ e K igual a 17.378,01 ind.mL⁻¹. A taxa de crescimento estimada foi de 1,05 d⁻¹ resultando na equação a seguir, lembrando que os valores obtidos para $P(t)$ estão log transformados:

$$P(t) = \frac{4,24}{1 + \left(\frac{4,24 - 1,63}{1,63}\right) \cdot e^{-1,05t}}$$

Figura 7 - Densidade celular esperada e observada para *Gomphonema* sp.



Fonte: o próprio autor.

Para a obtenção de culturas puras é preciso utilizar diferentes técnicas de isolamento e purificação, que podem ser divididas em métodos de separação física, como o método de pescaria e lavagem, quanto de eliminação dos contaminantes, como a utilização de antibióticos para eliminação de bactérias (VU et al., 2018). Além disso, são necessários ensaios de confirmação, como por exemplo técnicas tradicionais como a preparação de meio sólido ou líquido para detecção de bactérias e análises de microscopia, ou a utilização de técnicas como PCR para a detecção de contaminantes residuais (POKORNY et al., 2022).

Apesar de terem sido utilizadas técnicas de plaqueamento e análises microscópicas para a detecção de contaminantes, não é possível a afirmação de que essas culturas sejam puras, ou seja, livres de bactérias, isso se deve pela ausência da aplicação de ensaios específicos, como plaqueamento em meios de cultura bacteriológicos. Embora a axenicidade possa limitar muitos estudos, a depender de seus objetivos onde a pureza e precisão são necessárias, as culturas não axênicas são suficientes e/ou para testes que demandam aumento de biomassa. As culturas não axênicas podem refletir mais de perto as condições naturais, facilitando estudos ecológicos e evolutivos. Essas culturas podem oferecer insights sobre as interações microbianas, o que é crucial para aplicações como

biorremediação, onde a simbiose entre microalgas e bactérias pode ser utilizada para tratar efetivamente águas residuais e outros poluentes (CORREA-REYES et al., 2001).

Conforme o desenvolvimento da cultura, é possível observar o desenvolvimento de um biofilme, aglomerados (Figura 8) e incrustações marrons no fundo dos frascos (Figura 9), resultados do crescimento da cultura e da produção de mucilagem.

Figuras 8 e 9 - Frascos com as culturas de *Nitzschia* sp. e *Gomphonema* sp, respectivamente, formação de aglomerados, biofilme e incrustações no fundo dos frascos.



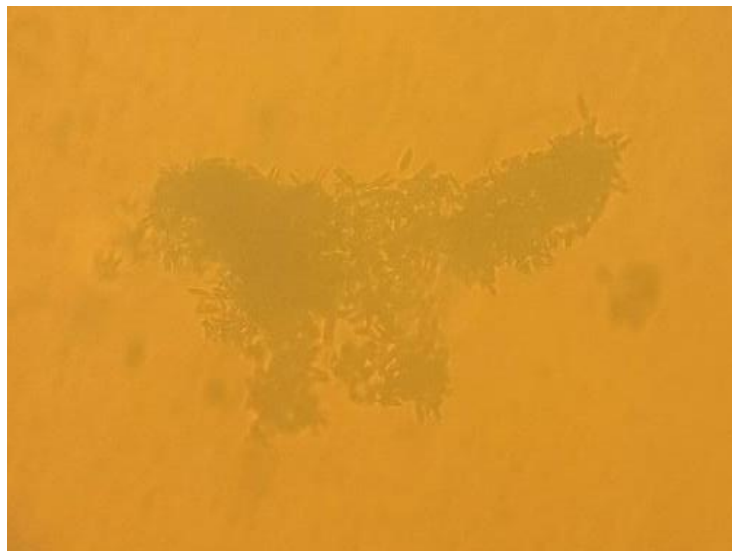
Fonte: o próprio autor.

Uma importante característica adaptativa das diatomáceas, a mucilagem, é uma matriz complexa de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), formada por mono e polissacarídeos, e proteínas (CHIOVITTI; DUGDALE; WETHERBEE, 2006). Existem diversas funções atribuídas à mucilagem das diatomáceas, tais como motilidade, adesão, formação de colônias, resistência mecânica e formação de biofilmes (HOAGLAND et al., 1993).

Apesar de vantajosa para os organismos, a mucilagem resultou em dificuldades para a amostragem. As células aderidas ao frasco não estariam disponíveis na

suspensão do meio na retirada da amostra, caso não fossem removidas das paredes do frasco, o que poderia afetar as contagens. Uma das formas possíveis de se obter as algas aderidas é por meio de raspagem, contudo isso causa a perda da cultura (GUILLARD; SIERACKI, 2005). Para minimizar este problema, a cada amostragem os frascos foram agitados de forma padrão, mas mesmo nessas condições as células podem não se desprender. De outra forma, grumos de mucilagem recobertos por algas aderidas podem se soltar. Quando isso ocorre, aglomerados podem estar presentes, conforme aqueles que foram observados nas amostras (Figura 10).

Figura 10 - Aglomerado em campo de contagem na câmara de Utermöhl, microfotografia em microscópio invertido.



Fonte: o próprio autor.

A capacidade de suporte de *Nitzschia* sp. indica uma robustez significativa deste táxon e foi calculada como 69 vezes maior que a de *Gomphonema* sp., não havendo registros para outras algas. Espécies de *Nitzschia* são costumeiramente cosmopolitas, sendo algumas dominantes em ambientes alcalinos e eutróficos enquanto outras apresentam preferências por ambientes mais ácidos e oligotróficos (GUASCH et al., 2009; KELLY et al., 2015; LANGE-BERTALOT, 1979; NOGA et al., 2013; TLILI et al., 2011). Bagmet et al. (2022) registra que *Nitzschia acidoclinata* Lange-Bert., por exemplo, foi documentada em uma gama de habitats, predominantemente em incluindo água doce, em sedimentos do fundo de corpos d'água, solos e turfeiras, apresentando uma grande adaptação a diferentes condições de qualidade da água. Assim, a alta adaptabilidade de espécies desse gênero a uma

ampla gama de condições ambientais pode justificar a capacidade de suporte elevada observada em *Nitzschia* sp. (LEE, 2002).

Outra explicação para a alta capacidade de suporte de *Nitzschia* sp. pode ter assento na influência direta de sua eficiência reprodutiva, que permite às espécies sustentarem populações grandes e densas, mesmo quando inicialmente apresentada em densidades mais baixas (LEWIN; GUILLARD, 1963). A eficiência reprodutiva pode também estar relacionada com a habilidade de restaurar eficazmente o tamanho celular e manter a viabilidade populacional sob condições favoráveis. Isso é consistente com a descrição de que *Nitzschia* sp. atinge densidades populacionais elevadas, potencialmente beneficiando-se de um ciclo de vida que favorece a restauração do tamanho celular e a continuação do crescimento populacional mesmo após divisões celulares repetidas (CHEPURNOV et al., 2008). Táxons com essas características podem ser úteis em cenários de biorremediação, onde a adaptabilidade a condições variáveis é crucial (LEE, 2002).

Apesar de apresentar uma capacidade de suporte menor do que *Nitzschia* sp., *Gomphonema* sp. apresentou uma maior taxa de crescimento sob as mesmas condições de cultivo. As taxas de crescimento de *Nitzschia* sp. e *Gomphonema* sp. foram as menores encontradas para diatomáceas de água doce, inclusive comparadas a *Nitzschia holsatica* Hustedt [= *Nitzschia actinastroides* (Lemmermann) Goor] (EPPLEY, 1977). O número de trabalhos incluindo taxas de crescimento para diatomáceas de água doce são escassos na literatura, variando de 1,10 a 2,55 (EPPLEY, 1977; SUZUKI; TAKAHASHI, 1995). Para outros ambientes, tais como marinhos, as taxas de crescimentos de alguma diatomáceas podem variar de 0,6 a 2,6, podendo chegar a valores ainda menores quando submetidas a depreciação de Fe (EPPLEY, 1977; TIMMERMANS; VAN DER WAGT, 2010). Isso pode indicar que as condições de crescimento podem não ter sido as consideradas ótimas para os táxons. Apesar disso, as análises mostram que as respostas de *Nitzschia* sp. e *Gomphonema* sp. seriam diferentes entre si quando em um mesmo ambiente sob as mesmas condições ambientais.

A capacidade de *Gomphonema* sp. atingir mais rapidamente seu limite populacional pode ser um traço vantajoso para aplicações em cultivos aquáticos, onde a biomassa é periodicamente colhida (LEE, 2002).

A maior produção de biofilme coincide com a transição entre o crescimento exponencial e a fase estacionária de crescimento e varia conforme a disponibilidade

de nutrientes, o que foi observado para *Nitzschia* sp., característica que varia com cada táxon e sua condição de cultivo (HOAGLAND et al., 1993; POULSEN; DAVUTOGLU; SUCHANOVA, 2022).

5. CONCLUSÕES

A utilização das técnicas tradicionais de isolamento ainda são uma alternativa eficaz na obtenção de diferentes táxons de diatomáceas para cultivo.

Apesar das culturas obtidas não poderem ser consideradas culturas axênicas, foi possível a manutenção desses isolados em condições adequadas de cultivo e pureza em relação a outras algas.

A presença de mucilagem pode se tornar um desafio a ser contornado no cultivo experimental de diatomáceas, a depender dos objetivos do trabalho. Para estudos futuros se faz necessária a busca de metodologias que visem contornar essa problemática de forma que não afete o desenvolvimento das culturas, tendo em vista que é uma característica intrínseca as diatomáceas, principalmente aquelas que compõem o perifíton, podendo afetar amostragens para diferentes objetivos, inclusive na determinação de curvas de crescimento.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, E. J.; NELSON, E. W. On the Artificial Culture of Marine Plankton Organisms. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 8, n. 5, p. 421–474, 1910.
- ANDERSEN, R. A. **Algal culturing techniques**. Amsterdam Etc.: Elsevier, Cop, 2015.
- BAGMET, V. B. et al. **Biology, Genetic Diversity, and Ecology of *Nitzschia acidoclinata* Lange-Bertalot (Bacillariophyta)**. *Diversity*, [s.l.], v. 14, n° 12, 2022. ISSN: 14242818, DOI: 10.3390/d14121133.
- B-BÉRES, V. et al. Ecosystem services provided by freshwater and marine diatoms. **Hydrobiologia**, v. 850, n. 12–13, p. 2707–2733, jul. 2023.
- BEIJERINCK, M. W. Notiz über *Pleurococcus vulgaris*. **Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, Zweite Abteilung**, v. 4, p. 785-787, 1898.
- BOLD, H.C. The cultivation of algae. **The Botanical Review**, v. 8, n. 2, p. 69–138, 1942. Disponível em: <10.1007/bf02879474>. Acesso em: 17 abr. 2024.
- BONNET, M.; LAGIER, J.C.; RAOULT, D.; *et al.* Bacterial Culture through Selective and non-selective conditions: the Evolution of Culture Media in Clinical Microbiology. **New Microbes and New Infections**, v. 34, n. 34, p. 100622, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6961714/>>.
- CHIOVITTI, A.; DUGDALE, T. M.; WETHERBEE, R. Diatom Adhesives: Molecular and Mechanical Properties. In: SMITH, A. M.; CALLOW, J. A. (Orgs.). **Biological Adhesives**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006.
- CHODAT, R. **Monographie d'algues en culture pure**. *Beiträge zur Kryptogamenflora der Schweiz*, [s.l.], v. 4, n° 2, p. 1–266, 1913.
- COLE, L. C. The Population Consequences of Life History Phenomena. In: **Mathematical Demography**. [s.l.]: Springer Nature, 1977, p. 183–192.
- COMITE EUROPEEN DE NORMALISATION (CEN) 2003. *Water quality – guidance standard for the routine sampling and pre-treatment of benthic diatoms from rivers*. European Standard. EN 13946:2003.
- CORREA-REYES, J. G. et al. **Isolation and growth of eight strains of benthic diatoms, cultured under two light conditions**. *Journal of Shellfish Research*, [s.l.], v. 20, n° 2, p. 603–610, 2001.
- EDELSTEIN-KESHET, L. **Mathematical Models in Biology**. Philadelphia: Society for Industrial and Applied Mathematics, 2005.
- EPPLEY, R. W. **The growth and culture of diatoms**. Em: WERNER, D. (Org.). *The biology of diatoms*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1977. p. 24–64.

FERNANDEZ-VALENZUELA, S.; CHÁVEZ-RUVALCABA, F.; BELTRAN-ROCHA, J. C.; *et al.* Isolation and Culturing Axenic Microalgae: Mini-Review. **The Open Microbiology Journal**, v. 15, n. 1, p. 111–119, 2021.

GONZALEZ, J. M.; ARANDA, B. Microbial Growth under Limiting Conditions-Future Perspectives. **Microorganisms**, v. 11, n. 7, p. 1641, 2023. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2607/11/7/1641>>.

GRAHAM, L. E. *et al.* **Algae**. 3^o ed. Madison: LJLM Press, 2016.

GUASCH, H. *et al.* **Use of multivariate analyses to investigate the contribution of metal pollution to diatom species composition: Search for the most appropriate cases and explanatory variables.** *Hydrobiologia*, [s.l.], v. 627, n^o 1, p. 143–158, 2009. ISSN: 00188158, DOI: 10.1007/s10750-009-9721-0.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. YELLOW-GREEN ALGAE WITH CHLOROPHYLLIDE C_{1,2}. **Journal of Phycology**, v. 8, n. 1, p. 10–14, 1972.

GUILLARD, R. R. L.; SIERACKI, M. S. Counting Cells in Cultures with the Light Microscope. In: ANDERSEN, R. A. (Org.). **Algal Culturing Techniques**. Amsterdam: Elsevier, Cop, 2015.

GUIRY, M. D. How many species of algae are there? A reprise. Four kingdoms, 14 phyla, 63 classes and still growing. **Journal of Phycology**, p. jpy.13431, 21 jan. 2024.

HITCHENS, A. P.; LEIKIND, M. C. The Introduction of Agar-agar into Bacteriology. **Journal of Bacteriology**, v. 37, n. 5, p. 485–493, 1939. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC374482/pdf/jbacter00753-0012.pdf>>.

HOAGLAND, Kyle D.; ROSOWSKI, James R.; GRETZ, Michael R.; *et al.* Diatom Extracellular Polymeric Substances: Function, Fine Structure, Chemistry, and Physiology. **Journal of Phycology**, v. 29, n. 5, p. 537–566, 1993.

HUSTEDT, F. 1965. Neue und wenig bekannte Diatomeen. IX. Süßwasserdiatomeen aus Brasilien, insbesondere des Amazonasgebietes. *International Revue Ges. Hydrobiol* 50: 391–410.

JAGIELSKI, T. A man with a prepared mind – in commemoration of the bicentenary of the birth of Louis Pasteur 1822 - 2022. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 29, n. 2, p. 138–140, 2023.

KAPINUSOVA, G.; LOPEZ MARIN, M. A.; UHLIK, O. Reaching unreachables: Obstacles and successes of microbial cultivation and their reasons. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023.

KELLY, M. G. *et al.* **Characterizing the niches of two very similar Nitzschia species and implications for ecological assessment.** *Diatom Research*, [s.l.], v. 30, n^o 1, p. 27–33, 2015. ISSN: 21598347, DOI: 10.1080/0269249X.2014.951398.

KLEBS, Georg. **Die Bedingungen der Fortpflanzung bei einigen Algen und Pilzen.** [s.l.]: G. Fischer, 1896.

KOMARISTAYA, V.P.; GORBULIN, O.S.; DOGADINA, T.V. Vodorosli v baze dannyh mirovyh kollektzij kul'tur WDCM CCINFO. Visnik Harkivs'kogo natsional'nogo universitetu imeni V.N. Karazina. **Seriya Biologiya**, v. 25, p. 57-63, 2015.

KOT, M. **Elements of Mathematical Ecology.** Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2001.

KOURTCHENKO, O.; LOHBECK, K. T.; ANDERSSON, B.; et al. Diatom Growth: How to Improve the Analysis of Noisy Data. In: PAPPAS, J. L. (Org.). **The Mathematical Biology of Diatoms.** [s.l.]: Wiley, 2023.

KRAMMER, K.; LANGE-BERTALOT, H. 1986. Bacillariophyceae. In: *Süßwasserflora von Mitteleuropa* pp. 1–876. Gustav FischerVerlag, Stuttgart, Jena.

KUFFERATH, H. **La Culture des Algues.** [s.l.]: La Revue Algologique, 1930. Disponível em: <gallica.bnf.fr>. Acesso em: 17 abr. 2024.

LAKATOS, M.; LANGE-BERTALOT, H.; BÜDEL, B. **Diatoms living inside the thallus of the green algal lichen *Coenogonium linkii* in Neotropical lowland rain forests.** *Journal of Phycology*, [s.l.], v. 40, p. 70–73, 2004. DOI: 10.1046/j.1529-8817.2004.02205.x.

LANGE-BERTALOT, H. **Pollution tolerance of diatoms as a criterion for water quality estimation.** *Beihefte zur Nova Hedwigia*, [s.l.], v. 64, p. 285–304, 1979.

LEE, J.-B. **Growth Characteristics of Five Microalgal Species Isolated from Jeju Island and Four Microalgal stock Strains in Hatchery.** *Algae*, [s.l.], v. 17, n° 2, p. 117–125, 2002. ISSN: 1226-2617, DOI: 10.4490/algae.2002.17.2.117.

LEE, Yuan-Kun; SHEN, Hui. Basic Culturing Techniques. In: RICHMOND, A. (Org.). **Handbook of microalgal culture: applied phycology and Biotechnology.** Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2004.

LEWIN, J. C.; GUILLARD, R. R. L. **Diatoms.** *Annual Review in Microbiology*, [s.l.], v. 17, p. 373–414, 1963.

MALTHUS, T.R. **An Essay on the Principle of Population.** Cambridge: Cambridge University Press, 1798.

METZELTIN, D.; LANGE-BERTALOT, H. 1998. Tropical diatoms of South America I: About 700 predominantly rarely known or new taxa representative of the neotropical flora. In: *Iconographia Diatomologica. Vol. 5. Diversity-Taxonomy-Geobotany* (Ed. by H. Lange-Bertalot), p. 695. Koeltz Scientific Books, Königstein.

MONOD, J. The Growth of Bacterial Cultures. **Annual Review of Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 371–394, 1949.

- NOGA, T. et al. **Use of diatoms to assess water quality of anthropogenically modified matysówka stream.** *Journal of Ecological Engineering*, [s.l.], v. 14, n° 2, p. 1–11, 2013. ISSN: 2081139X, DOI: 10.5604/2081139X.1043166.
- PANIK, M. J. **Growth Curve Modeling: Theory and Applications.** Hoboken, N.J: Wiley, 2014.
- POKORNY, Leo; HAUSMANN, Bela; PJEVAC, Petra; et al. How to Verify Non-Presence—The Challenge of Axenic Algae Cultivation. **Cells**, v. 11, n. 16, p. 2594, 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9406910/#B4-cells-11-02594>>. Acesso em: 11 nov. 2022.
- POULSEN, Nicole; DAVUTOGLU, Metin Gabriel; SUCHANOVA, Jirina Zackova. Diatom Adhesion and Motility. In: FALCIATORE, Angela; MÖCK, Thomas (Orgs.). **The Molecular Life of Diatoms.** [s.l.]: Springer Cham, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/978-3-030-92499-7>>.
- PREISIG, H. R.; ANDERSEN, R.A. Historical Review of Algal Culturing Techniques. In: ANDERSEN, R. A. (Org.). **Algal Culturing Techniques.** Amsterdam: Elsevier, Cop, 2015.
- PRINGSHEIM, E. G. **Pure Cultures of Algae.** Cambridge: Cambridge University Press, 1946.
- RICHTER, O. Reinkulturen von Diatomeen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v. 21, n. 8, p. 493–506, 1903.
- RODHE, W. Algae in culture and nature. **Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie: Mitteilungen**, v. 21, n. 1, p. 7–20, 1978.
- ROUND, F. E.; CRAWFORD, R. M.; MANN, D. G. **The Diatoms: Biology and Morphology of the Genera.** Cambridge: Cambridge University Press, 1990.
- SARDARI, D. Mathematical Basis for Diatom Growth Modeling. In: PAPPAS, J. L. (Org.). **The Mathematical Biology of Diatoms.** [s.l.]: Wiley, 2023.
- SCHMIDT, T. M. **Encyclopedia of Microbiology.** Amsterdam: Academic Press, 2019.
- SCHRAMM, J.R. Some Pure Culture Methods in the Algae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 1, n. 1, p. 23–45, 1914. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/2990006?seq=1#metadata_info_tab_contents>. Acesso em: 16 abr. 2024.
- SILVA, M. R. L.; SCHERER, A.; ANDRADE, D. S. Formação e Manutenção de Coleção *ex situ* unialgal *in vivo*. In: ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. (EDS.). **Microalgas de águas continentais: Potencialidades e Desafios do Cultivo.** Londrina: Instituto Agronômico do Paraná, 2014.

SINGH, P. et al. Microalgae Isolation and Basic Culturing Techniques. In: **Handbook of Marine Microalgae**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 43–54.

SMITH, D. P.; KEYFITZ, N. **Mathematical Demography**. [s.l.]: Springer Verlag, 1977.

SUZUKI, Y.; TAKAHASHI, M. **Growth responses of several diatom species isolated from various environments to temperature**. *Journal of Phycology*, [s.l.], v. 31, p. 880–888, 1995.

THE BRAZIL FLORA GROUP et al. **Bacillariophyceae**. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB97964>>. Acesso em: 12 fev. 2024.

TIMMERMANS, K. R.; VAN DER WAGT, B. **Variability in cell size, nutrient depletion, and growth rates of the southern ocean diatom *Fragilariopsis kerguelensis* (Bacillariophyceae) after prolonged iron limitation**. *Journal of Phycology*, [s.l.], v. 46, n° 3, p. 497–506, 2010. ISSN: 00223646, DOI: 10.1111/j.1529-8817.2010.00827.x.

TISCHUTKIN, N. **Über Agar-Agarkulturen einiger Algen und Amöben**. *Zentralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde*, [s.l.], v. 2, n° 3, p. 183–188, 1897.

TLILI, A. et al. **In situ spatio-temporal changes in pollution-induced community tolerance to zinc in autotrophic and heterotrophic biofilm communities**. *Ecotoxicology*, [s.l.], v. 20, n° 8, p. 1823–1839, 2011. ISSN: 09639292, DOI: 10.1007/s10646-011-0721-2.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre (RS): Artmed, 2012.

VAULOT, Daniel; BILCKE, Gust; CHAERLE, Peter; et al. Culturing Diatoms. In: GOESSLING, Johannes; LAVAUD, Johann; SERÔDIO, João (Orgs.). **Diatom Photosynthesis: from Primary Production to High-Value Molecules**. [s.l.]: Wiley-Scrivener, 2023. Disponível em: <<https://hal.science/hal-04000031v2>>. Acesso em: 1 maio 2024.

VU, Chau Hai Thai; LEE, Hyung-Gwan; CHANG, Yong Keun; et al. Axenic cultures for microalgal biotechnology: Establishment, assessment, maintenance, and applications. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 2, p. 380–396, 2018.

WARD, H. M. **Some methods for use in the culture of algae**. *Annals of Botany*, [s.l.], v. 13, p. 563–566, 1899.

World Data Centre for Microorganisms (WDCM) CCINFO. Culture Collections Information Worldwide. 2024. Disponível em: <https://ccinfo.wdcm.org/statistics>. Acesso em: 19 fev. 2024.

ZAKHAROVA, YU. R. et al. Collection of living diatom cultures of Limnological Institute: Trends and use potential. **Limnology and Freshwater Biology**, n. 6, p. 1681–1687, 2022.

ZORZAL-ALMEIDA, S. et al. 177 years of diatom studies in Brazil: knowledge, gaps, and perspectives. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, n. 3, p. e20210959, 2022.