

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/02/2021.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**USO DE MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR
“IN NATURA” E HIDROLISADO NO CULTIVO
DA MICROALGA *ANKISTRODESMUS
GRACILIS* (REINSCH) KORSHIKOV EM
MEIOS ALTERNATIVOS**

Mayara Galatti Tedesque

Jaboticabal, São Paulo
-2019-

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**USO DE MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR
“IN NATURA” E HIDROLISADO NO CULTIVO
DA MICROALGA *ANKISTRODESMUS
GRACILIS* (REINSCH) KORSHIKOV EM
MEIOS ALTERNATIVOS**

Mayara Galatti Tedesque

**Orientadora: Professora Dra. Lúcia Helena Sipaúba-
Tavares**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, São Paulo

-2019-

Tedesque, Mayara Galatti
T256u Uso de melaço de cana-de-açúcar “in natura” e hidrolisado no cultivo da microalga *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsh) Korshikov em meios alternativos / Mayara Galatti Tedesque. – – Jaboticabal, 2019
vi, 82 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2019
Orientadora: Lúcia Helena Sipaúba-Tavares
Banca examinadora: Rodrigo Ney Millan, Gianmarco Silva David
Bibliografia

1. Microalga. 2. Melaço de cana-de-açúcar. 3. *Ankistrodesmus gracilis*. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.64



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Unidade Complementar - Jaboticabal


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

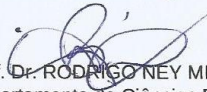
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: USO DE MELAÇO DE CANA DE AÇÚCAR "IN NATURA" E HIDROLISADO NO CULTIVO DA MICROALGA ANKISTRODESMUS GRACILIS (REINSCH) KORSHIKOV EM MEIOS ALTERNATIVOS

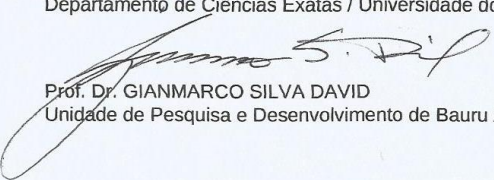
AUTORA: MAYARA GALATTI TEDESQUE

ORIENTADORA: LÚCIA HELENA SIPAÚBA TAVARES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em AQUICULTURA, área: Biologia Aquática pela Comissão Examinadora:


Prof. Dra. LÚCIA HELENA SIPAÚBA TAVARES
Laboratório de Limnologia / Centro de Aquicultura - CAUNESP


Prof. Dr. RODRIGO NEY MILLAN
Departamento de Ciências Exatas / Universidade do Estado de Minas Gerais, UEMG, Frutal-MG


Prof. Dr. GIANMARCO SILVA DAVID
Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Bauru / Agencia Paulista de Tecnologia do Agronegócio

Jaboticabal, 28 de fevereiro de 2019

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Olorum, a todos os orixás e entidades que me ajudaram e me guiaram para que eu chegasse até aqui.

Quero agradecer muito, e não é pouco a minha orientadora, que acreditou em mim, confiou em mim e quis conhecer-me de verdade, me dando a maior oportunidade da minha vida, sempre me apoiando, me orientando e me ensinando a ser uma acadêmica melhor, muito obrigada por ser essa pessoa maravilhosa em minha vida, muito obrigada mesmo Professora Lúcia!

Ao Bruno, meu colega de laboratório e um grande irmão que a vida me deu, obrigada pela paciência e pelos ensinamentos, sem você este trabalho não teria saído, muito obrigada!

Aos meus pais, José e Hosana que sempre me apoiaram, me dando muito amor e carinho, e que sempre me deram forças para continuar e nunca desistir dos meus sonhos, muito obrigada!

Ao meu companheiro Ruan, que sempre esteve comigo, aos sábados, domingos e feriados me ajudando nas coletas e encarando tudo isso comigo, muito obrigada por ser essa pessoa maravilhosa em minha vida, amo muito você!

As minhas colegas de laboratório Juliane e Mayara, pelo apoio e amizade que temos em nossos dias, muito obrigada!

A minha família Buscapé, que me apoiou até o final deste trabalho, sempre me incentivando, e me amando e me ajudando com sabedoria e todo carinho nas dificuldades do dia a dia, amo muito vocês!

Em especial a minha amiga Giovana, que tem um grande braço neste trabalho e me ajudou muitos em minhas coletas!

Ao CAUNESP, ao Programa de Pós-graduação e aos funcionários por disponibilizar ajuda durante realização do experimento.

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

APOIO FINANCEIRO

Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, bolsa de mestrado, Processo nº 17/11001-9 e Suporte Financeiro (14/24697-3).

SUMÁRIO

	Pág.
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE SIMBOLOS E SIGLAS.....	viii
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
INTRODUÇÃO.....	11
REVISÃO DE LITERATURA	13
Importância das Microalgas.....	13
Descrição da Espécie de Microalga Estudada.....	14
Meios de Cultura.....	16
Macrófitas: Aplicações na Aquicultura e Utilização Como Meio de	
Cultura.....	18
Melaço da Cana-de-Açúcar.....	22
Descrição do Local de Cultivo.....	24
Descrição do Preparo dos Meios de Cultura.....	25
OBJETIVOS.....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
CAPÍTULO I – Efeito da Adição de Melaço de Cana-de-Açúcar ao	
Meio de Cultura no Crescimento da Microalga <i>Ankistrodesmus</i>	
<i>gracilis</i> (Reinsch) Korshikov.....	41
RESUMO.....	42
ABSTRACT.....	43
INTRODUÇÃO.....	44
MATERIAL E MÉTODOS.....	45
Cultivo e meios de cultura.....	45
Melaço da Cana-de-Acúcar.....	45
Crescimento.....	46
Parâmetros dos Meios de Cultura.....	46
Composição dos Nutrientes na Plantas Aquáticas.....	47
Análise Estatísticas dos Dados.....	47

RESULTADOS.....	47
DISCUSSÃO.....	50
CONCLUSÃO.....	52
AGRADECIMENTOS.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
CAPÍTULO II – Comparação Entre Sistema Autotrófico e Mixotrófico no Cultivo de <i>Ankistrodesmus gracilis</i> (Reinsch) Korshikov em diferentes meios de cultura.....	62
RESUMO.....	63
ABSTRACT.....	64
INTRODUÇÃO.....	65
MATERIAL E MÉTODOS.....	66
Microalga e Meios de Cultura.....	66
Cultivo Autotrófico.....	66
Cultivo Mixotrófico.....	66
Crescimento.....	67
Parâmetros dos Meios de Cultura.....	67
Composição Bioquímica.....	67
Análise Estatísticas dos Dados.....	67
RESULTADOS.....	68
DISCUSSÃO.....	70
CONCLUSÃO.....	72
AGRADECIMENTOS.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 - Microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i> observada na objetiva de 10x em sistema de cultivo a qual se encontra solitária (A) e como é encontrada no meio ambiente (B).....	16
Figura 2 - Macrófita <i>Eichhornia crassipes</i>	19
Figura 3 - Macrófita <i>Eichhornia azurea</i>	20
Figura 4 - Macrófita <i>Salvinia auriculata</i>	20
Figura 5 - Macrófita <i>Lemna minor</i>	21
Figura 6 - Macrófita <i>Azolla filiculoides</i>	22
Figura 7 - Sala de assepsia (A) e cultivo de microalgas (B).....	24
Figura 8 - Preparo do meio de cultura CHU ₁₂ em cultivo mixotrófico.....	26
Figura 9 - Preparo do meio de fertilizante inorgânico NPK em cultivo mixotrófico.....	26
Figura 10 - Metodologia do preparo dos meios de macrófitas A= plantas utilizadas (plantas secando ao ar livre); B= macrófita triturada; C= macrófita sendo fervido em água destilada; D= filtração do meio; E= meio pronto para uso.	27
Figura 11 - Preparo do experimento com extratos de macrófitas em cultivo mixotrófico.....	28
Figura 12 - Imagem panorâmica do cultivo da microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i> em diferentes meios de cultura na sala denominada de cepário, local onde fica armazenadas as cepas das microalgas.....	28
Figura 13 - Esquema do preparo da solução de melaço “in natura” e hidrolisado utilizado nos cultivos mixotrófico.....	29
Figura 14 - Curva de crescimento da microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i> contendo melaço “in natura” (IN); e o hidrolisado (H), cultivada em meio: CHU ₁₂ , fertilizante inorgânico NPK e as macrófitas <i>Eichhornia crassipes</i> , <i>Eichhornia azurea</i> , <i>Lemna minor</i> , <i>Azolla filiculoides</i> e <i>Salvinia auriculata</i>	56
Figura 15 - Avaliação dos nutrientes (mg L ⁻¹), condutividade (mS cm ⁻¹) e pH no cultivo mixotrófico “in natura” utilizando os meios de cultura CHU ₁₂ , fertilizante inorgânico (NPK), e meios de macrófita: <i>Eichhornia crassipes</i> (Ec), <i>Eichhornia azurea</i> (Ea), <i>Lemna minor</i> (Lm), <i>Azolla filiculoides</i> (Af) e <i>Salvinia auriculata</i> (Sa).....	57

Figura 16 - Avaliação dos nutrientes (mg L^{-1}), condutividade (mS cm^{-1}) e pH no cultivo mixotrófico hidrolisado utilizando os meios de cultura CHU_{12} , fertilizante inorgânico (NPK), e meios de macrófita: <i>Eichhornia crassipes</i> (Ec), <i>Eichhornia azurea</i> (Ea), <i>Lemna minor</i> (Lm), <i>Azolla filiculoides</i> (Af) e <i>Salvinia auriculata</i> (Sa).....	58
Figura 17 - Consumo dos compostos nitrogenados (NT) e fósforo total (PT) no cultivo mixotrófico “in natura” e hidrolisado nos meios de cultura CHU_{12} , fertilizante inorgânico NPK, e meios de macrófita: <i>Eichhornia crassipes</i> (Ec), <i>Eichhornia azurea</i> (Ea), <i>Lemna minor</i> (Lm), <i>Azolla filiculoides</i> (Af) e <i>Salvinia auriculata</i> (Sa), no período inicial (1º dia) e final (28º dia) do experimento.....	59
Figura 18 – Curva de crescimento da microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i> em cultivo autotrófico, mixotrófico (“in natura” e hidrolisado), nos diferentes meios de cultura.....	75
Figura 19 – Teores de lipídio e proteína (% de biomassa seca) na fase inicial (1º dia) e final (28º dia) do experimento nos cultivos autotrófico, mixotrófico “in natura” e hidrolisado nos diferentes meios de cultura.....	76

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 - Parâmetros de produção da microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i> em cultivo mixotrófico “in natura” e hidrolisado, nos meios: comercial CHU ₁₂ , fertilizante inorgânico NPK, e meios de macrófita <i>Eichhornia crassipes</i> (Ec), <i>Eichhornia azurea</i> (Ea), <i>Lemna minor</i> (Lm), <i>Azolla filiculoides</i> (Af) e <i>Salvinia auriculata</i> (Sa).....	60
Tabela 2 – Composição dos nutrientes (mg L ⁻¹) em diferentes meios de cultura utilizado, onde: Ec= <i>Eichhornia crassipes</i> , Ea= <i>Eichhornia azurea</i> , Lm= <i>Lemna minor</i> , Af= <i>Azolla filiculoides</i> e Sa= <i>Salvinia auriculata</i> (Sa) (SIPAÚBA-TAVARES et al. 2018a, 2018b).....	61
Tabela 3 – Parâmetros biológicos da microalga <i>Ankistrodesmus gracilis</i> em cultivo autotrófico e mixotrófico (“in natura” e hidrolisado) nos diferentes meios de cultura.....	77
Tabela 4 – Avaliação do nitrogênio total – TIN (mg L ⁻¹), fósforo total – TP (mg L ⁻¹), condutividade elétrica - COND (mS cm ⁻¹) e pH dos meios de cultura em cultivo autotrófico e mixotrófico (“in natura” e hidrolisado).....	78

LISTA DE SIMBOLOS E SIGLAS

N - Nitrogênio
P - Fósforo
K - Potássio
% - Porcentagem
CO₂ - Dióxido de Carbono
K⁺ - Potássio ionizado
Asp - *Azolla* sp.
Ea - *Eichhornia azurea*
Ec - *Eichhornia crassipes*
Lm - *Lemna minor*
Sa - *Salvinia auriculata*
ATP - Trifosfato de adenosina
mm - Micromol
HCO₃ - Bicarbonato
CO₃²⁻ - Carbonato
g L⁻¹ - Grama por Litro
m² - Metro quadrado
µm - micrometro
°C - Graus Celsius
g - Grama
L - Litro
ml - Mililitro
kg - Quilograma
mg L⁻¹ - Miligrama por Litro
mScm⁻¹ - Milisiemens por centímetro
cels mL⁻¹ - Células por mililitro
p/p - Peso por peso
TD - Tempo de Duplicação
TIN - Nitrogênio Total Inorgânico
PT - Fósforo Total Inorgânico
pg cel⁻¹ - Pico grama por Células
µm³ - Micrometro cúbico
µg L⁻¹ - Micrograma por Litro
µL - Microlitro
g Kg⁻¹ - Grama por Quilograma
Ca - Cálcio
Mg - Magnésio
NT - Nitrogênio Total

RESUMO

O trabalho objetiva avaliar a importância do uso do melão de cana de açúcar como fonte de carbono e plantas aquáticas (macrófitas) como meio de cultura no crescimento, aspectos biológicos e bioquímicos da microalga Chlorophyceae *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korshikov cultivada em sistema “indoor”. Para avaliação do desenvolvimento de *A. gracilis* foram utilizados sete diferentes meios de cultura, um comercial (CHU₁₂), outro com fertilizante inorgânico (NPK, 20:5:20) e cinco meios de cultura de macrófitas são elas: *Eichhornia crassipes*, *Eichhornia azurea*, *Lemna minor*, *Salvinia auriculata* e *Azolla filiculoides*. Foi obtido para *A. gracilis* nos meios de macrófitas parâmetros de crescimento similares ou superiores ao meio comercial e de fertilizante inorgânico sendo que no meio de cultura *A. filiculoides* foi observado o melhor desempenho. No entanto, em termos de densidade celular o meio de cultura *L. minor* apresentou valores mais elevados dentre os meios de macrófitas. Comparando as duas formas de melão utilizadas, exceto no meio de fertilizante inorgânicos (NPK), na forma “in natura” foi obtido os melhores resultados para crescimento de *A. gracilis* nas condições utilizadas. Os teores macro e micronutrientes nas plantas apresentaram efeitos diretos no desempenho da microalga principalmente, em relação ao N, P e K que foram mais elevados nos meios de macrófitas *L. minor* e *A. filiculoides*. Comparando o cultivo autotrófico com mixotrófico foi observado que a densidade celular da microalga *A. gracilis* foi mais elevada para o cultivo autotrófico, porém o meio CHU₁₂ apresentou a maior densidade celular em cultivo mixotrófico “in natura”. Os teores de proteína foram mais elevados para o cultivo autotrófico em meio NPK, os teores de lipídios foram mais elevados no cultivo mixotrófico “in natura” em meio de *Azolla sp.* O meio NPK apresentou altas concentrações de fósforo total nos dois cultivos tanto autotrófico quanto mixotrófico (“in natura” e hidrolisado), o meio CHU₁₂ apresenta aumento de fósforo no cultivo mixotrófico. O nitrogênio inorgânico total tendeu a ser mais elevado no cultivo mixotrófico. Os resultados demonstram que a microalga *A. gracilis* apresentou bons biomassa de qualidade quando cultivada no cultivo mixotrófico, a variedades dos meios de culturas apresentam diferentes resultados nos parâmetros da microalga, sendo que a utilização da biomassa algal deve ser predestinada, pois cada cultivo e cada meio de cultura apresentou um composto elevado diferente.

Palavra-chave: NPK, CHU₁₂, macrófitas, crescimento, condições bioquímicas e biológicas.

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the growth, biological and biochemical aspects of the microalgae *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korshikov in culture medium composed of organic waste through autotrophic and mixotrophic culture. Seven culture medium were tested: a commercial one (CHU₁₂) and another composed of an inorganic fertilizer (NPK 20:5:20); and other five medium composed of the following macrophyte species: *Eichhornia crassipes*, *Eichhornia azurea*, *Lemna minor*, *Salvinia auriculata* and *Azolla filiculoides*. The macrophyte were chosen based on their availability in the region, and among them just *S. auriculata* was not already employed as culture medium. Cane molasse (*in natura* and hydrolyzed) was added to the macrophyte medium in order to increase the carbon content. *A. gracilis* growth on the macrophyte medium was similar or even superior than observed on the commercial medium and the NPK. The best performance was achieved with the *A. filiculoides* medium. However, regarding to cell density, *L. minor* has achieved the best performance. In regard to cane molasse, the *in natura* form displayed the best performance, except when added to the NPK medium. The macro and micronutrient content in the macrophytes were also analyzed. The main feature observed was a higher content of nitrogen, phosphorous and potassium in the macrophyte *L. minor* and *A. filiculoides*, which presented direct effects on the development of the microalgae. Through comparison between autotrophic and mixotrophic culture was observed that the autotrophic culture presented higher *A. gracilis* cell density. However, the highest cell density was obtained with CHU₁₂ in mixotrophic culture. The higher protein level was obtained with the autotrophic culture on NPK medium. The *Azolla sp.* medium with mixotrophic *in natura* culture presented the higher lipids content. The NPK medium presented higher phosphorous concentration on both autotrophic and mixotrophic cultures (*in natura* and hidroyzed), while CHU₁₂ medium presented an increase in phosphorous on the mixotrophic culture. The total inorganic nitrogen was higher on the mixotrophic culture. Through the results interpretation, the cane molasse use in *A. gracilis* culture can be added to the culture medium as carbon source. Since this substrate presents a variability in results depending the chosen culture, the purpose of algae biomass use must be planned accordingly, based on evidence that each culture presented distinct features.

Keywords: NPK, CHU₁₂, macrophytes, growth, biochemical and biological conditions.

INTRODUÇÃO

Os meios de cultura são substratos responsáveis pela produtividade e crescimento das microalgas em sistema de cultivo. Os nutrientes presentes no meio de cultura, podem estimular ou inibir o crescimento das microalgas (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2011), além de alterar a composição química das células e propiciar síntese de outros produtos (IMAMOGLU et al., 2007).

A maior dificuldade relacionada a produção de biomassa algal é o preço dos meios de cultura comerciais que elevam o custo de produção. Assim, meios alternativos têm sido propostos como forma de substituir os reagentes utilizados na formulação destes meios de cultura (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009).

Além do fertilizante inorgânico NPK, o uso da biomassa de macrófitas para cultivo de microalgas vem se tornando uma ferramenta que apresenta bons resultados de crescimento para a *Chlorophyceae Ankistrodesmus gracilis* (SIPAÚBA-TAVARES et al., 2009, 2018a). Desta forma, os meios de cultura alternativos como o fertilizante inorgânico (NPK) e plantas aquáticas são utilizados no sentido de adaptar as necessidades nutricionais das microalgas para obtenção de elevada biomassa e elevado valor nutricional, sendo economicamente viável (SIPAÚBA-TAVARES e ROCHA, 2001). As elevadas concentrações de N, P e K nestes meios alternativos associados às vitaminas do complexo B que são acrescentadas para incrementar o crescimento da microalga, podem promover o aumento nas concentrações de proteínas, carotenoides e clorofila (LOURENÇO, 2006; ORDOG et al., 2012).

As condições laboratoriais como temperatura, pH, luz e nutrientes contidos no meio de cultura afetam o crescimento, como também a atividade metabólica e composição celular das microalgas (HUANG et al., 2010).

A escolha do meio de cultura dependerá dos elementos necessários para elevar a biomassa com a utilização de um meio de cultura definido cuja adição de outros elementos, contribuirá para o crescimento e valor nutricional das microalgas. A disponibilidade de água e nutrientes são grandes desafios no cultivo de microalgas, além de fontes de carbono orgânico tais como glicose e acetado (MITRA et al., 2012).

Várias microalgas podem combinar fotossíntese autotrófica e assimilação heterotrófica em um processo conhecido como mixotrófico, cuja disponibilidade de carbono orgânico para a assimilação de carbono inorgânico é fixado pela fotossíntese (ANDRADE e COSTA, 2007).

As microalgas em condições mixotróficas metabolizam o carbono inorgânico através de um mecanismo combinado de características autotróficas e heterotróficas (KIM et al., 2013).

Quando cultivadas em condições mixotróficas, as microalgas apresentam um custo de cultivo mais elevado, devido aos valores das fontes de carbonos utilizadas. Uma alternativa é a utilização de matéria prima de baixo custo de produção, como o melaço da cana-de-açúcar, cuja composição apresenta elevado teor de carbono. O melaço da cana-de-açúcar tem sido usado em cultivo heterotrófico e/ou mixotrófico, contendo 29,6% de sacarose, 24,2% de glicose e 24,2% de frutose. O nitrogênio total contido no melaço varia de 0,82% a 2,2%, além de outras substâncias encontradas como: proteínas, aminoácidos, amidos, sais de amônio, nitratos e nitritos (BECKER e VENKATARAMAN, 1971).

A microalga *Ankistrodesmus gracilis* é cultivada em laboratório para fins de alimentação de zooplâncton, larvas de peixes e juvenis de peixes ornamentais. No entanto, pesquisas voltadas à adição do melaço como fonte alternativa de carbono, seu efeito no crescimento e composição desta microalga ainda não foram discutidos.

O objetivo deste estudo foi avaliar a biomassa da microalga *Ankistrodesmus gracilis* em diferentes meios de cultura sob condições mixotróficas utilizando o melaço da cana-de-açúcar como fonte de carbono orgânico, comparando este cultivo com o autotrófico avaliando a biomassa algal em resposta às condições de cultivo.

Para tanto a dissertação foi dividida em dois capítulos: o primeiro trata da influência da adição do melaço de cana-de-açúcar em meio de cultura no crescimento de *A. gracilis*, o segundo faz uma comparação dos sistemas autotrófico e mixotróficos no crescimento da microalga.

CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou o melaço de cana-de-açúcar pode ser utilizado no cultivo mixotrófico de *A. gracilis* como fonte de carbono orgânico, no entanto, este tipo de cultivo não elevou a biomassa algal quando comparado ao cultivo autotrófico. O crescimento e os parâmetros da microalga *A. gracilis* variaram em relação ao cultivo e meios de cultura utilizados na produção da biomassa, com teores de proteínas mais elevados em cultivo autotrófico e os teores de lipídios mais elevados no cultivo mixotrófico. Os teores de lipídios e proteínas também variam dentre os cultivos, sendo que o autotrófico apresentou maiores teores de proteínas e o mixotrófico de lipídios, sendo mais elevado em cultivo mixotrófico “in natura”. Estudos devem ser realizados para avaliar qual cultivo e qual meio de cultura apresentam os compostos adequados em função da variabilidade de respostas em relação ao meio de cultura utilizado, a forma de cultivo adotado e a condição específica de cultivo.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela bolsa de mestrado (17/11001-9) e suporte financeiro (14/24697-3).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.O.A.C. (1990). Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, *The Association: Arlington, VA*, Vol. II, 15th ed. Sec.985.29.
- BHATNAGAR, A.; CHINNASAMY, S.; SINGH, M. and DAS, K.C. (2011). Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy*, 88, 3425 - 3431. doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12. 064.
- CECCHIN, M.; BENFATTO, S.; GRIGGIO, F.; MORI, A.; CAZZANIGA, S.; VITULO, N. and BALLOTTARI, M. (2018). Molecular basis of autotrophic vs mixotrophic growth in *Chlorella sorokiniana*. *Scientific reports*, 8 (1), 6465. doi.org/10.1038/s41598-018-24979-8.
- CHEAH, W.Y.; SHOW, P.L.; JUAN, J. C.; CHANG, J.S. and LING, T. C. (2018). Enhancing biomass and lipid productions of microalgae in palm oil mill effluent using carbon and nutrient supplementation. *Energy Conversion and Management*, 164, 188-197. doi.org/10.1016/j.enconman.2018.02.094.

DHULL, N.P.; SONI, R.; RAHI, D.K. and SONI, S.K. (2014). Evaluation of autotrophic and mixotrophic regimen *Chlorella pyrenoidosa* cells in various wastes water for its biochemical composition and biomass production. *PeerJ PrePrints*, 1 (2), 68. doi.org/10.7287/peerj.preprints.681v1.

FAN, C.; WANG, P.; ZHOU, W.; WU, S.; HE, S.; HUANG, J. and CAO, L. (2018). The influence of phosphorus on the autotrophic and mixotrophic denitrification. *Science of The Total Environment*, 643, 127-133. doi.org/10.1016/j.scitoteny.2018.06.185.

GOLTERMAN H.L.; CLYMO R.S. and OHNSTAD, M.A.M. (1978). Methods for physical and chemical analysis of fresh water. *Blackwell Scientific Publication*, 1 Ltd. 60 - 62.

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

KADKHODAEI, S.; ABBASILIASI, S.; SHUN, T.J.; MASOUMI, H.F.; MOHAMED, M.S.; MOVAHEDI, A. and ARIFF, A.B. (2015). Enhancement of protein production by microalgae *Dunaliella salina* under mixotrophic conditions using response surface methodology. *RSC Advances*, 5 (48), 38141-38151. doi.org/10.1039/c5ra04546k

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

LI, Y.R.; TSAI, W.T.; HSU, Y.C.; XIE, M.Z. and CHEN, J.J. (2014). Comparison of autotrophic and mixotrophic cultivation of green microalgal for biodiesel production. *Energy Procedia*, 52, 371-376. doi.org/

LIU, B.; and BENNING, C. (2013). Lipid metabolism microalgae distingue she itself. *Curr Opin Biotechnol*, 24, .300 - 309. doi.org/10.1016/j.copbio.2012.08.008.

MONDAL, M.; GOSWAMI, S.; GHOSH, A.; OINAM, G.; TIWARI, O.N.; DAS, P. end HALDER, G.N. (2017). Production of biodiesel from microalgae through biological carbon capture: a review. *Biotech*, 7 (2), 99. doi.org/10.1007/s13205-017-0727-4.

NUSCH, E.A. (1980). Of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. *Archiv für Hydrobiologie*, 14 (1), 14 – 36.

PEREZ-GARCIA, O.; DE-BASHAN, L.E.; HERNANDEZ, J.P. and BASHAN, Y. (2010). Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic cultivation of chlorella vulgaris immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Journal of phycology*, 46 (4), 800-812. doi.org/10.1111/j.529-8817.2010.00862.x

ROCHA, O. and DUNCAN, A. (1985). The relationship between cell carbon and cell volume in freshwater algal species used in zooplanktonic studies. *Journal of Plankton Research*, 7 (2), 279 – 294. doi.org/10.1093/plankt/7.2.279

SIPAÚBA-TAVARES, L.H. and ROCHA, O. (1993). Cultivo em larga escala de organismos planctônicos para alimentação de larvas e alevinos de peixes: I-algas clorofíceas. *Biotemas*, 6 (1), 93 – 106. doi.org/10.5007/%25x

SIPAÚBA-TAVARES, L.H. and PEREIRA, A.M.L. (2008). Large scale laboratory cultures of *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) and *Diaphanosoma biergei* Korinek, 1981 (Cladocera). *Brazilian Journal of Biology*, 68 (4), 875 - 883. doi.org/10.1590/S1519-69842008000400025

SIPAÚBA-TAVARES, L.H.; IBARRA, L.C. and FIORESI, T.B. (2009). Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (REINSCH) Korshikov (Chlorophyceae) em laboratório utilizando meio CHU₁₂ e de macrófita com NPK. *Boletim do Instituto de Pesca*, 35 (1), 111 – 118.

STATSOFT, INC. Statistical (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com. 2007.

VAN WAGENEN, J.; DE FRANCISCI, D. and ANGELIDAKI, I. (2015). Comparison of mixotrophic to cyclic autotrophic/heterotrophic growth strategies to optimize productivity of *Chlorella sorokiniana*. *Journal of applied phycology*, 27 (5), 1775-1782. doi.org/10.1007/s10811-014-0457-1

WILKEN, S.; SCHUURMANS, J.M. and MATTHIJS, H.C. (2014). Do mixotrophs grow as photoheterotrophs? Photophysiological acclimation of the chrysophyte *Ochromonas danica* after feeding. *New Phytologist*, 204 (4), 882-889. doi.org/10.1111/nph.12975