

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Otimização do cultivo da microalga
Haematococcus pluvialis em sistema
mixotrófico e potencial uso na alimentação
do camarão *Macrobrachium amazonicum***

Msc. Bruno Scardoeli Truzzi

Jaboticabal, SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

**Otimização do cultivo da microalga
Haematococcus pluvialis em sistema
mixotrófico e potencial uso na alimentação
do camarão *Macrobrachium amazonicum***

Msc. Bruno Scardoeli Truzzi

Orientadora: Profa Dra. Lúcia Helena Sipaúba Tavares

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP – CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Jaboticabal, SP

2019

S285o	Scardoeli-Truzzi, Bruno Otimização do cultivo da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> em sistema mixotrófico e potencial uso na alimentação do camarão <i>Macrobrachium amazonicum</i> / Bruno Scardoeli-Truzzi. -- Jaboticabal, 2019 127 p. : il., tabs., fotos Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientadora: Lúcia Helena Sipaúba-Tavares 1. Cultivo microalga. 2. <i>Haematococcus pluvialis</i> . 3. <i>Macrobrachium amazonicum</i> . 4. Dieta alimentar. 5. Aquicultura. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Unidade Complementar - Jaboticabal

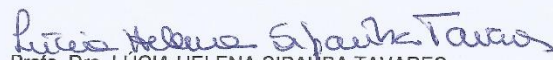
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Otimização do cultivo da microalga *Haematococcus pluvialis* em sistema mixotrófico e potencial uso na alimentação do camarão *Macrobrachium amazonicum*

AUTOR: BRUNO SCARDOELI TRUZZI

ORIENTADORA: LÚCIA HELENA SIPAÚBA TAVARES

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


Prof. Dra. LÚCIA HELENA SIPAÚBA TAVARES
Laboratório de Limnologia / Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal-SP


Prof. Dr. DALTON JOSÉ CARNEIRO
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. EDUARDO CUSTODIO GASPARINO
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dra. MARIA BENINCASA VIDOTTI
Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza / FATEC - Jaboticabal/SP


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

Jaboticabal, 20 de agosto de 2019

AGRADECIMENTOS

Assim como em muitos momentos da vida, durante esses anos de desafios, construção e amadurecimento, aprendemos a aproveitar as oportunidades, absorver os conselhos e ensinamentos e obter o máximo de conhecimento. Durante esta etapa, nada disso seria possível sem a participação de muitas pessoas que contribuíram para realização deste trabalho, assim gostaria de agradecer:

A minha orientadora Profa. Dra. Lúcia H. Sipaúba Tavares, que durante todos esses anos sempre esteve presente sendo muito mais que uma orientadora, contribuindo para meu amadurecimento, tanto pessoal quanto profissional, por todo apoio, amizade e incentivo. Agradeço também pela confiança, ensinamentos, e oportunidades que tornaram possível a conclusão deste trabalho;

Aos amigos de laboratório, Débora, Juliane, Mayara (Molusca) e Mayara por toda ajuda em laboratório, realizações de análises e amizade durante esses anos e todos que estiveram durante esta etapa e que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho. Agradeço também a Flavia por toda ajuda e ensinamentos e durante o início da minha formação;

Ao Juliano, Rudney, Rafael, Roberto e Micheli por toda ajuda na formulação de rações, preparo e montagem do experimento com camarões. Ao professor Wagner Valenti, pela disponibilidade do seu laboratório e parceria na realização da etapa de alimentação do camarão;

Agradeço aos meus amigos e familiares pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao Centro de Aquicultura da UNESP e ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura que disponibilizaram o espaço físico para realização deste projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que contribuíram neste trabalho.

Lista de Figuras

Capítulo I

Figura 1. Esquema dos tipos de metabolismo das microalgas.....	21
Figura 2. Ilustração do cultivo em sistema aberto onde: (A) cultivo em lagoas do tipo raceway e (B) cultivo em tanque circular.....	23
Figura 3. Ilustração do cultivo em sistema fechado onde: (A) cultivo em fotobiorreatores do tipo Painel e (B) cultivo em fotobiorreator tubular.....	22
Figura 4. Imagem de microscopia de luz das células da microalga <i>H. pluvialis</i> durante seu ciclo de vida onde (A) são células flageladas ricas em clorofila (B) célula vegetativa; (C) início da fase de síntese de astaxantina; (D) célula rica em astaxantina.....	31
Figura 5. Ciclo de vida da microalga <i>Haematococcus pluvialis</i>	31
Figura 6. Imagem do camarão-da-Amazônia <i>Macrobrachium amazonicum</i>	34
Figura 7. Setores onde foram desenvolvidos a pesquisa onde (A) Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton e (B) Setor de Carcinicultura.....	39
Figura 8. Processos de produção do meio de cultura de macrófita aquática <i>Eichhornia crassipes</i> onde: (A) planta aquática, (B) pó obtido após a secagem e moagem da planta aquática, (C) extrato líquido do pó após fervura do material e (D) processo de filtração do extrato.....	44
Figura 9. Meios de cultura preparados onde: (A) meio comercial WC, (B) meio de fertilizante inorgânico NPK 10-10-10 e (C) meio a base de macrófita aquática <i>Eichhornia crassipes</i>	44
Figura 10. Processo de hidrólise ácida do melaço de cana de açúcar onde: (A) melaço <i>in natura</i> , (B) processo de hidrólise, (C) processo de remoção de impurezas e (D) solução de melaço hidrolisado.....	46
Figura 11. Montagem do experimento em ambiente “indoor” destacando as caixas de cultivo e sistema de recirculação de água.....	47
Figura 12. Ingredientes das dietas alimentares onde: (A) dieta controle, (B) T25%, (C) T50%, (D) T100%.....	48
Figura 13. Mistura e homogeneização das dietas alimentares (A) e processo mecânico de peletização (B)	49

Figura 14. Dietas alimentares peletizadas após secagem evidenciando as colorações, onde: (A) dieta controle, (B) T25%, (C) T50% e (D) T100%.....	49
Figura 14 Dietas alimentares processadas na granulometria de 0,5-1,0 mm onde: (A) dieta controle, (B) T25%, (C) T50% e (D) T100%.....	49

Capítulo II

Fig. 1. Growth of <i>H. pluvialis</i> and Chlorophyll-a concentration during 28 days cultivation in (A) Inorganic medium and (B) Organic medium in molasses “in natura” and Hydrolyzed	84
Fig. 2. Concentration of nutrients during cultivation of <i>H. pluvialis</i> - Black box means initial concentrations of nutrients (mg L^{-1}), white box means final concentration (mg L^{-1})	85
Fig. 3. Chemical composition during cultivation of <i>H. pluvialis</i> - Black box means initial concentrations (%), white box means final concentration (%)	86

Capítulo III

Fig. 1. Growth performance of <i>Haematococcus pluvialis</i> in different light/dark cycles and culture media	102
Fig. 2. Chemical composition of <i>Haematococcus pluvialis</i> in different light/dark cycles and culture media	103

Capítulo IV

Fig. 1. Biomass concentration of <i>Haematococcus pluvialis</i> in inorganic medium (NPK 10-10-10), biochemical composition (protein/lipid contents) and gross energy obtained after 28 days Cultivation	121
---	-----

Lista de tabelas

Capítulo I

Tabela 1. Variações do metabolismo algal em relação as condições de cultivo ...	20
Tabela 2. Principais características dos cultivos de microalgas em sistemas abertos e fechados	24
Tabela 3. Composição das soluções para preparo do meio de cultura WC (Guillard e Lorenzen, 1972)	42
Tabela 4. Preparo do meio de cultura WC	42
Tabela 5. Composição e concentrações do melaço de cana de açúcar bruto	45

Capítulo II

Table 1. The nutrient concentrations and chemical composition of the culture media	87
Table 2. Parameters of microalgae <i>H. pluvialis</i> cultivated in sucra cane molasses (“in natura” and hydrolyzed) and culture media conditions	88

Capítulo III

Table 1. Growth parameters and culture conditions of <i>Haematococcus pluvialis</i> in different ligh/dark cycles and culture media.....	103
---	-----

Capítulo IV

Table 1. Ingredients and proximate composition (% as feed basis) of experimental diets replacement of fishmeal for <i>Haematococcus pluvialis</i> biomass (T25%, T50% and T100%) and control.....	122
Table 2. Water parameters for different diet treatments of post-larvae <i>Macrobrachium amazonicum</i> , replacement of fishmeal for <i>Haematococcus pluvialis</i> biomass (T25%, T50% and T100%) and control.....	123
Table 3. Growth performance of post-larval <i>Macrobrachium amazonicum</i> fed the experimental diets with different replacement of fishmeal for <i>Haematococcus pluvialis</i> biomass (T25%, T50% and T100%) and control.	124

Sumário

Resumo.....	9
Abstract	10
Introdução geral	11
Capítulo I.....	12
Revisão de Literatura	13
Microalgas: contextualização	13
Utilizações e potenciais de uso das microalgas	16
Potencial das microalgas na aquicultura e alimentação de organismos aquáticos	19
Cultivo de microalgas e principais influências de cultivo	21
Metabolismos e sistemas de cultivo	21
Temperatura, oxigênio e pH.....	28
Meios de cultura	30
Intensidade luminosa e ciclos de luz	32
Descrição das espécies estudadas	33
<i>Haematococcus pluvialis</i>	33
<i>Macrobrachium amazonicum</i>	36
Hipóteses.....	39
Objetivos Gerais.....	40
Objetivos Específicos	40
Justificativa	41
Material e Métodos Gerais	42
Referencias.....	55
Capítulo II.....	72
Abstract.....	73
1. Introduction.....	74
2. Materials and Methods	75
3. Results and discussion	77
4. Conclusion.....	81
References	81
Capítulo III.....	92
Abstract.....	93
1. Introduction.....	94
2. Materials and Methods	95
3. Results and discussion	97
4. Conclusion	100
References	101
Capítulo IV	108
Abstract	109
1. Introduction	109
2. Materials and methods.....	111
3. Results and Discussion	114
4. Conclusions.....	117
References.....	118

Resumo

A microalga *Haematococcus pluvialis* apresenta elevado interesse biotecnológico e comercial devido sua capacidade de síntese de compostos de alto valor e composição nutricional rica em proteínas, aminoácidos e outros compostos. Dentre os entraves em sua produção comercial, a obtenção de elevada biomassa tem sido o foco de diversas pesquisas que buscam otimizar o cultivo desta espécie. O cultivo mixotrófico é uma ferramenta que pode auxiliar na obtenção de elevadas produtividades, no entanto a fonte de carbono utilizada nestes cultivos deve ser adequada e disponibilizada de forma correta para completa absorção. O melaço de cana de açúcar é uma fonte de carbono rica em sacarose e nutrientes podendo ser empregado no cultivo de *H. pluvialis*, no entanto, requer pré-tratamento antes de seu uso. A hidrólise auxilia na redução das moléculas de sacarose em glicose e frutose, aumentando a disponibilidade de carbono e facilitando sua assimilação. Comparado ao melaço *in natura*, a hidrólise do melaço demonstrou melhores resultados aumentando a produtividade e alta composição bioquímica. Outra ferramenta importante utilizada na otimização dos cultivos algais em condições mixotróficas é o uso de ciclos de luz, uma vez que a luminosidade está relacionada diretamente ao metabolismo algal auxiliando na assimilação dos nutrientes e do carbono. O período de iluminação fornecida varia de espécie para espécie, podendo ou não ser necessário. Neste estudo e para estas condições de cultivo, foram observados o aumento de biomassa e aumento na composição bioquímica quando a microalga *H. pluvialis* foi exposta a ciclos de luz e os melhores resultados obtidos foram em ciclo de 20:4 horas (claro/escuro). Quando cultivada em “green stage” a microalga *H. pluvialis* acumula elevados teores de proteínas e aminoácidos, sendo estes compostos fundamentais na alimentação de diversos organismos aquáticos. O camarão *Macrobrachium amazonicum* é uma espécie nativa brasileira que apresenta elevado valor social e potencial de produção, no entanto, estudos sobre suas exigências nutricionais ainda são escassos. Em sistemas de produções aquícolas, são fornecidas rações com elevado teor proteico e grande percentagem desta proteína é de origem animal principalmente obtida através da inclusão de farinha de peixe, porém o uso de farinha de peixe eleva o custo de produção destas dietas além de ser uma fonte limitada. Uma alternativa para solução desta problemática seria o uso de proteína de origem vegetal. O uso da biomassa da microalga *H. pluvialis* na substituição da farinha de peixe em dietas para pós-larvas do camarão *M. amazonicum*, demonstrou ser uma alternativa eficaz e de palatabilidade uma vez que tais dietas formuladas aumentaram o desempenho zootécnico desta espécie, devido ao alto teor proteico e aminoácidos essenciais para o desenvolvimento do camarão, podendo a farinha de peixe ser substituída totalmente da dieta pela biomassa de *H. pluvialis*.

Palavras-chave: Cultivo, composição bioquímica, biomassa algal, dietas alimentares, crustáceos.

Abstract

The *Haematococcus pluvialis* microalgae displays high biotechnological and commercial interest due to its capacity to synthesize high nutritional value in protein, amino acids and other compounds. Besides the difficulties in commercial production, the obtaining of high biomass amounts has been the objective of several researches which seek to optimize the production of this species. The mixotrophic culture is a tool which may improve the obtention of higher productivity. However, the carbon source for the cultures have to be adequate and has to be in an available form in order to be completely absorbed. The cane molasse is a carbon source rich in saccharose and nutrients and might be employed in *H. pluvialis* culture. Nevertheless, it requires a pre-treatment for its use. The hydrolysis promotes the reduction of saccharose molecules into glyucose and fructose, improving the carbon availability and assimilation. In comparison to *in natura* molasses, the hydrolysis improved the results by increasing productivity. Light cycle is another important tool for algae culture in mixotrophic conditions, since light is directly related to the algae metabolism, which improves the carbon and nutrients assimilation. The light interval varies according to species and may or may not be necessary to be employed. In this study, an increase in biomass and biochemical composition was observed when *H. pluvialis* was exposed to light cycles. The best results were obtained with a 20:4 hours cycle (light/dark). When in green stage culture, the microalgae accumulate higher protein and amino acid contents, which are fundamental for the diet of a wide range of aquatic organisms. The *Macrobrachium amazonicum* shrimp is a Brazilian native species, which presents high social value and production potential. However, research about its nutritional demands are scarce. The feed employed in aquaculture presents high protein values, usually from animal source. Fishmeal is the most employed source; however, it increases the production cost and is a limited source. The employment of a vegetal-origin protein source may be an alternative to this matter. The use of *H. pluvialis* biomass as replacement for fishmeal in *M. amazonicum* post-larvae diet resulted in an effective alternative, both in nutrition and palatability. It improved the zootechnical performance, due to high protein and essential amino acids contents for shrimp growth. Thus, the fishmeal may be completely replaced with *H. pluvialis* biomass.

Keywords: Culture, biochemical composition, algae biomass, diet, crustacean.

Introdução geral

As microalgas são organismos fotossintéticos capazes de sintetizarem diversos compostos de alto valor comercial e com ampla utilização em segmentos alimentícios, fármaco, químico, nutraceuto entre outros. Devido a esta diversificada composição e aplicações, o interesse nos diversos compostos obtidos a partir destes organismos vem se destacando e incentivando novas pesquisas. Um dos maiores entraves no cultivo em larga escala das microalgas, é a obtenção de produção com elevada biomassa em um curto espaço de tempo mantendo a alta produção de compostos de interesse.

Algumas técnicas e metodologias de cultivo podem ser empregadas no cultivo algal afim de reduzir o tempo de cultivo e manter uma alta densidade celular. O uso de meios de cultura alternativos além de reduzir os custos de produção pode fornecer os nutrientes necessários para o desenvolvimento algal e auxiliar na máxima produtividade algal. A escolha do regime de cultivo (Fototrófico, heterotrófico ou mixotrófico) adequado também é uma ferramenta que pode auxiliar estes resultados. A iluminação e o uso de ciclos de luz, também são fatores que podem acelerar ou reduzir as taxas de crescimento e alterar a composição bioquímica da microalga cultivada. No entanto, o tipo de meio de cultura, o regime de cultivo e o uso de ciclos de luz são fatores dependentes e variam para cada espécie de microalga cultivada.

A microalga *Haematococcus pluvialis* é uma espécie de grande potencial biotecnológico devido a capacidade de sintetizar compostos de alto valor comercial e diversos outros compostos com elevado valor nutricional. Um dos grandes problemas em seu cultivo, é a sua baixa taxa de crescimento em ‘green stage”, sendo esta fase a mais importante no cultivo desta espécie devido ocorrer a maior divisão celular e maior acúmulo de biomassa.

Além do cultivo desta espécie para obtenção de compostos de alto valor comercial, também é possível o seu uso em formulações de rações para organismos aquáticos, uma vez que esta espécie é capaz de acumular elevados teores de proteína intracelular e é de grande importância no metabolismo de diversos organismos aquáticos

Capítulo I

Apresentação Geral

Revisão de Literatura

Microalgas: contextualização

As microalgas são denominadas como organismos unicelulares, microscópicos e fotossintéticos podendo desenvolver-se tanto em ambientes aquáticos de água doce quanto de água salgada (Velasquez-Orta et al., 2013). Algumas espécies também podem ser encontradas em solos e rochas podendo ou não apresentar motilidade; são organismos de vida livre e possuem características diversificadas; podem ser unicelulares, coloniais e filamentosas; tolerantes a uma ampla faixa de pH, temperatura, turbidez e concentrações de O₂ e CO₂. Embora as microalgas sejam seres de vida livre, algumas espécies apresentam simbiose com outros organismos (Gupta et al., 2013).

Em habitat natural, comumente é encontrada a simbiose de microalgas com as bactérias e este mutualismo exerce influência direta no crescimento algal (Cho et al., 2015). Em diversos casos, este mutualismo é dado através do fornecimento de nutrientes pelas bactérias, principalmente pela liberação de nitrogênio e micronutrientes como vitaminas e ferro (Cooper e Smith, 2015).

De acordo com Reviers (2006), existem 10 grupos de algas eucarióticas divididas em: Chlorophyta (algas verdes); Rhodoplantae (algas vermelhas); Glaucophyta (algas unicelulares com plastídios verde-azulados); Cryptophyta (unicelulares flagelados com plastídios de cores variadas); Picobiliphyta (algas unicelulares picoplantônicas, descobertas em 2007 e ainda pouco conhecidas); Euglenophyta (unicelulares flagelados, incolores ou com plastídios verdes); Chlorarachniophyta (amebas ou ameboflagelados com plastídios verdes); Haptophyta (com plastídios castanho-dourados, principalmente unicelulares e tem grande importância dentre os plânctons marinhos); Ochrophyta (14 classes de algas com plastídios castanho-dourados, como, por exemplo, as diatomáceas ou as algas pardas) e as Dinophyta (algas incolores ou plastídios de cores variadas, principalmente planctônicas, unicelulares e flageladas).

As Cyanobacterias no passado eram consideradas algas azuis (Cyanophyta = Chloroxybacteria) (Lourenço, 2006) e com o desenvolvimento da genética molecular, identificou-se que sua estrutura celular é similar a de bactérias (Margulis

e Schwartz, 2001). Dentre a distribuição de classes, são consideradas como mais abundantes as diatomáceas (Bacillariophyceae), as algas douradas (Chrysophyceae) e as algas verdes (classe Chlorophyceae) (Demirbas e Demirbas, 2010).

A maioria das espécies de algas realizam o processo de fotossíntese assim como as plantas superiores e, estes organismos são capazes de armazenar diversas substâncias, porém não possuem tecidos especializados ou órgãos como folhas, caules e raízes, e o seu sistema de reprodução é diferenciado (Kwietniewska et al., 2012). Mesmo sendo organismos fototróficos, as microalgas demonstram grande versatilidade metabólica como forma evolutiva de manutenção das espécies. Algumas pesquisas taxonômicas e bioquímicas demonstraram que por possuírem esta diversificada atividade metabólica existem algumas espécies estritamente heterotróficas, ou seja, são incapazes de realizar processos fotossintéticos (Bumbak et al., 2011).

Em ambientes naturais, as algas desempenham importantes funções atuando na ciclagem de nutrientes, controlando o balanço do pH, na remoção de dióxido de carbono, promovendo oxigênio para o ecossistema e melhorias na qualidade da água (Pérez-Garcia et al., 2011). Além disso, atuam na remoção e absorção de contaminantes orgânicos, metais pesados e combatendo diversos organismos patogênicos (Munoz e Guieysse, 2006, Richards e Mullins, 2013).

Do ponto de vista evolutivo, as algas são consideradas as principais responsáveis pelo processo de transição onde a Terra apresentava altas concentrações de dióxido de carbono, para uma atmosfera com altas concentrações de oxigênio, sendo estes organismos responsáveis por cerca de 50% da produção de oxigênio do planeta (Chapman, 2013). Devido a esta característica, as microalgas contribuem para a redução do dióxido de carbono atmosférico, uma vez que a cada tonelada produzida de biomassa algal, é consumido cerca de 1,83 toneladas de dióxido de carbono utilizados para o próprio desenvolvimento e convertidos em oxigênio (Cheah et al., 2015).

As microalgas são consideradas como o maior grupo de organismos vivos e são comumente classificadas de acordo com suas características morfológicas, cloroplastos e tipos de pigmentos, composição bioquímica, estrutura celular, ciclo

de vida e sua sequência genômica (Andersen, 2004). Dentre os grupos, as microalgas chlorophytas são organismos eucariontes distribuídos em todos os tipos de ambientes (Reviere, 2010), são representadas por um grupo de organismos diversificados filogeneticamente, devido não descenderem de um único ancestral (Barsanti et al., 2008) Segundo Salam et al., (2016) aproximadamente 10% da célula da microalga é constituída pelo material presente em sua parede celular, e esta composição varia de acordo com espécie e sua estrutura celular. Nas chlorophytas a parede celular é composta por celulose e diversos polímeros (Reviere, 2010).

Devido as características específicas de cada grupo algal, as células desses microrganismos apresentam composição bioquímica diversificada e tal composição, está relacionada à natureza de cada espécie além de diversos fatores ambientais como a distribuição geográfica (Zamalloa et al., 2011). Mesmo apresentando influência direta dos fatores ambientais como luminosidade, temperatura, disponibilidade de nutrientes entre outros fatores, as células das microalgas apresentam em sua composição carboidratos, proteínas, pigmentos, lipídios, ácidos nucleicos e outros compostos que desempenham funções essenciais para o seu desenvolvimento (Lee, 2016).

Os carboidratos são os principais compostos derivados da atividade fotossintética e do metabolismo fixador de carbono. Seu acúmulo é dado nos plastídios como materiais de reserva (amido), porém podem estar biodisponíveis na parede celular como: celulose, pectina e polissacarídeos sulfatados (Chen et al., 2013). As proteínas desempenham papel fundamental na composição química das microalgas, sendo relacionada as taxas de crescimento, recuperação celular, atividades reguladoras e de proteção a célula algal (Jiang e Kalodimos, 2017).

Dentre os pigmentos, os carotenoides atuam no sistema fotossintético como forma de proteção a célula, uma vez que essas moléculas são capazes de proteger contra danos oxidativos e excesso de iluminação (Masojídek et al., 2004), são compostos lipofílicos apresentando coloração amarela, alaranjada ou vermelha (Gong e Bassi, 2016). Esses compostos atuam como pigmentos acessórios que absorvem a luz, junto a clorofila (pigmento primário) (Koller et al., 2014). Já os lipídios das células algais tem como função biológica no metabolismo atuar no

fornecimento de energia devido a formação de componentes estruturais nas membranas celulares, colaborar no armazenamento de componentes celulares e atuar diretamente nas vias metabólicas (Fahy et al., 2011).

A versatilidade das microalgas em produzir diferentes compostos e adaptar a diversas condições de cultivo é devido as propriedades similares a das plantas vasculares (fotossíntese e exigências nutricionais) e similares propriedades biotecnológicas de células microbianas (rápidas taxas de crescimento e capacidade de sintetizar ou excretar diversos metabólitos) (Benavente-Valdés et al., 2016). Sendo assim, o interesse em pesquisas de microrganismos como microalgas, espécies de fungos (leveduras, por exemplo) e bactérias, deve-se à essencial importância destes microrganismos nas bases das cadeias tróficas e, por apresentarem potenciais fontes de compostos com aplicabilidades em diversos setores e alta demanda de mercado (Kuppusamy, 2017).

Utilizações e potenciais de uso das microalgas

A biomassa das microalgas apresenta ampla utilização e mercado, desde áreas da saúde, nutrição humana e animal, química, farmacológica e ambiental (Mazard et al. 2016, Viegas et al. 2015). Algumas espécies de microalgas são indicadas para o uso no tratamento de efluentes reduzindo a quantidade de matéria orgânica, compostos nitrogenados e fosfatados que são os principais causadores da eutrofização nos sistemas aquáticos (Evans et al., 2017).

A fitoremediação utilizando microalgas é uma ferramenta bastante promissora no tratamento de águas residuais, devido além de melhorar a qualidade da água, também reaproveitar a biomassa obtida para diversas aplicações (Nasir et al., 2015). Além do uso das microalgas no tratamento de efluentes, outras pesquisas sugerem o uso de microalgas em processos de biossorção, este processo é uma tecnologia de baixo custo e eficácia onde as microalgas utilizam sua capacidade de retenção e imobilização de metais através de processos biológicos (Schmitz et al., 2012).

Segundo Arbib et al. (2014) em relação aos tratamentos biológicos mais convencionais o uso de microalgas oferece como vantagens:

- ❖ Os nutrientes removidos dos efluentes (nitrogênio e fósforo), são convertidos em biomassa sem a necessidade de uma fonte externa de carbono;
- ❖ O efluente tratado é devolvido aos corpos d'água receptores com maior oxigenação;
- ❖ É possível obter compostos de alto valor comercial a partir da extração da biomassa colhida.

Algumas espécies, podem ser cultivadas em sistemas desenvolvidos para fixação de CO₂ excedentes de processos industriais, estes gases são responsáveis por 80% da queima de combustíveis no mundo. Além disso, as plantas de cultivo também podem ser projetadas próximas a plantas produtoras de energia elétrica onde estas queimam grandes quantidades de carvão e emitem CO₂ contribuindo para o aquecimento global (Wojciechowski et al, 2013). Estes microrganismos além de assimilarem vários compostos, também são capazes de sintetizar alguns compostos, como ácidos graxos e lipídios, dentre os ácidos graxos é possível obter o ômega 3 e o ômega 6, composto de interesse e alto valor comercial, enquanto os lipídios das microalgas são constituídos por glicerol ou bases esterificadas de ácidos graxos (saturados ou insaturados) (Neofotis et al., 2016).

Devido à alta produção de lipídios, as microalgas apresentam grande potencial na produção de biocombustíveis, uma vez que, pesquisas demonstram que estes microrganismos se desenvolvem melhor do que as culturas convencionais terrestres obtendo rápido crescimento e elevada produção de óleos e outros compostos que podem ser utilizados para produção dos biocombustíveis (Sankar et al., 2011, Abdul et al., 2015). Os óleos sintetizados no interior das células algais ao serem extraídos podem ser utilizados em processos de transesterificação e obtenção de biodiesel (Gong e Jiang, 2011). A biomassa residual que é gerada deste processo, através de processos de digestão pode ser convertida em biogás ou bioetanol (Mussnug et al., 2010) e por fim, os carboidratos presentes na estrutura celular das microalgas, pode ser convertido em bioetanol após processo de hidrólise enzimática (Hernández et al., 2015).

O uso de microalgas para produção de biocombustíveis apresenta grande vantagem comparado as culturas convencionais, devido não competir por áreas

agrícolas utilizadas comumente para o plantio de culturas alimentares como soja e milho. Além disso apresentam elevado rendimento por hectare onde chegam a converter de 3 a 8% da energia solar em biomassa, enquanto as culturas convencionais convertem em média 0,5% (Liu et al., 2017).

Embora as tecnologias para produção de biocombustíveis obtidos a partir da biomassa algal esteja em constante desenvolvimento, ainda são consideradas tecnologias recentes, muitas espécies de microalgas já são produzidas comercialmente para obtenção de diversos compostos como vitaminas do complexo E e B, ácidos essenciais, ácido fólico, antioxidantes como astaxantina e pigmentos como beta caroteno, sendo estes compostos de interesse fármaco, nutricional, medicinal e produção de cosméticos (Shannon e Abu-Ghannam, 2016).

Estudos voltados para o potencial do uso de clorofilas algais vem recebendo grande enfoque, não apenas pelo seu valor biológico em ambientes naturais, mas pelo seu uso como fonte de pigmento natural e diversas aplicações, tanto para consumo humano ou consumo animal (Aburai et al., 2013). As espécies de microalgas são capazes de sintetizarem diversos tipos de clorofilas como *a*, *b*, *c*, *d* e *e* (Bechtold e Mussak, 2009). No entanto, pesquisas reportaram a descoberta de um novo tipo de clorofila obtida através da purificação de uma cyanobacteria, a clorofila *f* (Willows et al., 2013). A clorofila após ser extraída pode ser utilizada como corante alimentício e em formulações de produtos de higiene pessoal como sabonetes, desodorantes, entre outros (Koller et al., 2014). Outras pesquisas relataram uma possível atividade anticancerígena de derivados da clorofila (clorofilina) no combate de células de câncer de colón, ao fornecer este composto como suplemento alimentar (Díaz et al., 2003).

Devido ao alto teor proteico e tamanho reduzido, algumas espécies de microalgas são adequadas para produção de polímeros biodegradáveis, convertendo a biomassa rica em proteína em polímeros biodegradáveis, o que torna esta produção mais sustentável e econômica comparado aos métodos convencionais de obtenção de polímeros (Zeller et al., 2013).

Outra importante utilização da biomassa de microalgas é o seu uso na alimentação humana, seu consumo ocorre desde a idade antiga onde principalmente povos do continente asiático utilizavam a biomassa de microalgas

como principal alimento para suprir suas necessidades proteicas (Shimamatsu, 2004). Com o passar dos anos, as indústrias alimentícias começaram a inovar neste segmento com a aplicação de novas técnicas e desenvolvimento de novos produtos atendendo a demanda do mercado consumidor. Sendo assim, a diversidade de nutrientes e compostos de alto valor biológico presentes nas células algais fizeram com que esta biomassa se tornasse cada vez mais atrativa sendo incluídas em formulações de alimentos funcionais, barras proteicas, biscoitos, massas, entre outros produtos alimentícios (Figueira et al., 2011; Lemes et al., 2012, Rodríguez et al., 2014).

Pesquisas desenvolvidas demonstram que a aplicação de biomassa algal em produtos alimentícios podem atribuir diversos efeitos benéficos a saúde humana, como por exemplo, efeitos terapêuticos, efeitos protetores contra obesidade e diabetes, atividades cancerígenas e hiperlipidêmico (Kurd e Samavati, 2015; Ponce et al., 2010). De acordo com Pulz & Gross (2004), este mercado de produtos alimentícios funcionais usando a biomassa algal apresenta grande potencial de desenvolvimento principalmente em países como a China, Estados Unidos, França e Tailândia.

Potencial das microalgas na aquicultura e alimentação de organismos aquáticos

Na aquicultura os gastos com alimentação de organismos aquáticos são elevados, podendo representar 70% dos custos totais de produção, e o principal fator que corresponde ao elevado custo são as fontes proteicas comumente utilizadas nas dietas alimentares, uma vez que este ingrediente complexo em termos nutricionais apresenta elevado custo comercial (Edwards, 2015, Kobayashi et al., 2015). As microalgas como alimento *in natura* são comumente utilizadas na aquicultura para alimentação de organismos aquáticos desde as fases larvais, pós-larvas e juvenis através da produção em escala laboratorial de microalgas selecionadas (Sipaúba-Tavares et al., 2001, Knuckey et al., 2006, Sipaúba-Tavares et al., 2014, Berchielli-Morais et al., 2016). Estes organismos são comumente utilizados na aquicultura devido ao alto valor nutricional, tamanho adequado, rápido

crescimento e por sintetizarem compostos com diversas propriedades essenciais (Roy e Pal, 2015).

Além disso, estes organismos desempenham funções fundamentais na aquicultura, devido fornecerem diversos nutrientes, melhorarem a qualidade da água através da produção de oxigênio, atuarem na absorção de compostos nitrogenados que são tóxicos para muitos organismos aquáticos e por servirem de alimento (Perez-Garcia et al., 2011, Sipaúba-Tavares e Pereira, 2008). Sendo assim, por apresentarem alto conteúdo proteico, vitaminas, carotenoides, pigmentos, ácidos graxos e outros compostos, o seu uso como suplementação em dietas alimentares vem crescendo cada vez mais no setor aquícola, melhorando o desempenho, atividades biológicas e pigmentação de organismos aquáticos como peixes, camarões, moluscos entre outros organismos aquáticos (Ju et al., 2012).

O uso de microalgas em dietas alimentares na aquicultura pode ser aplicado desde enfoques ornamentais como estudo de Gouveia et al. (2003), onde incluíram diferentes espécies de microalgas nas dietas testadas como fonte de carotenoides aumentando significativamente a coloração das espécies estudadas até enfoques produtivos como estudo de Sarker et al. (2016), onde avaliaram níveis de substituição de óleos de peixe por microalgas e constataram melhoras no ganho de peso, conversão alimentar e outros parâmetros zootécnicos.

A inclusão de biomassa algal em dietas alimentares pode ser feita diretamente ou através da substituição de algum ingrediente durante sua formulação, Macias-Sancho et al. (2014) ao substituírem a farinha de peixe por biomassa algal (até 75% de inclusão) em uma dieta formulada para alimentação de camarões, observou sobrevivência e crescimento similar a dieta basal, no entanto houve melhora significativa da resposta imune. Outros autores como Belettini et al. (2011) observaram que o uso das microalgas em dietas alimentares possibilitou maior controle dos parâmetros de qualidade da água mantendo-a em condições adequadas para o cultivo do camarão, além disso, favoreceu o desempenho zootécnico. No entanto, estes estudos utilizando a biomassa das microalgas em nutrição animal ainda é relativamente baixo quando comparado a outras fontes nutricionais utilizadas em dietas alimentares e um dos principais motivos é a baixa

produção de biomassa algal e o alto custo de obtenção dos seus concentrados (Walker, 2009).

Cultivo de microalgas e principais influências de cultivo

Estudos sobre o cultivo das microalgas iniciaram-se em meados do século XIX, no entanto, apenas nos últimos 70 anos que, a partir do aumento de pesquisas focadas nesta temática foi possível avançar na geração de conhecimentos e ferramentas que otimizassem o cultivo das microalgas. Algumas espécies de microalgas já são cultivadas em larga escala para atender a demanda do mercado mundial, como as microalgas do gênero *Chlorella*, *Cryptocodinium*, *Spirulina* e *Haematococcus* que apresentam elevado valor comercial (Borowitzka e Moheimani, 2013). O cultivo de algas no Brasil, é uma temática recente e bastante promissora, uma vez que, considerando a distribuição geográfica e condições climáticas apropriadas, a implantação de sistemas de cultivos demonstra grande potencial socioeconômico em diversas regiões do país (Sydney et al., 2011).

Em ambientes naturais, o crescimento das microalgas é devido a interações entre fatores biológicos, químicos e físicos. Dentre os fatores biológicos pode-se relacionar a taxa metabólica e características intrínsecas do metabolismo de cada espécie, quanto aos fatores físicos e químicos são principalmente relacionados os sistemas de cultivo, temperatura, pH, oxigênio, meio de cultura, fontes de carbono e luminosidade (Zeng et al., 2011, Sipaúba-Tavares et al., 2011, Chen et al., 2011, Lam e Lee, 2012).

Metabolismos e sistemas de cultivo

As microalgas são organismos que se desenvolvem comumente em condições fototróficas de cultivo, no entanto muitas espécies são capazes de se desenvolverem sob condições mixotróficas e heterotróficas (Benavente-Valdés et al., 2016). Os diferentes tipos de metabolismo algal influenciam diretamente o crescimento das microalgas assim como o consumo de nutrientes e tais exigências impactam sob as condições fototróficas, heterotróficas e mixotróficas (Alkhamis e Qin, 2015). Microalgas autotróficas assimilam o carbono inorgânico como principal

metabolito e sintetizam hidroxilas ocasionando o aumento do pH no sistema, enquanto microalgas heterotróficas assimilam carbono orgânico e produzem CO₂, diminuindo o pH. Já microalgas em condições mixotróficas sintetizam simultaneamente fontes inorgânicas e orgânicas de carbono e produzem tanto hidroxilas e CO₂ como metabolitos, mantendo o pH mais equilibrado (Kim et al., 2013).

O cultivo em condições fototróficas tem como principal característica a necessidade de iluminação atuando como uma fonte de energia e CO₂ como fonte de carbono orgânico, ambos elementos através de processos fotossintéticos são convertidos pelas células algais em energia química e utilizada no desenvolvimento algal (Cheirsilp e Torpee, 2012). Esta condição de cultivo é comumente adotada em sistemas de produção em larga escala principalmente em ambientes abertos e aproveitam a incidência natural de luz solar (Yoo et al., 2010).

Em condições de cultivo heterotrófico, as microalgas utilizam compostos orgânicos dissolvidos junto ao meio de cultura como fonte de carbono e energia, sendo assim, o crescimento algal neste regime é realizado sob ausência de iluminação e na presença de fontes de carbono orgânico (Shen et al., 2016). Nesta condição de cultivo é possível reduzir os problemas limitados pelo uso da iluminação e obter altas concentrações de biomassa, no entanto nem todas as espécies de microalgas conseguem tolerar e se desenvolver nesta condição de cultivo (Huang et al., 2010).

As microalgas realizam constantemente o processo de respiração, onde na presença de luz ocorre a perda de biomassa que acaba sendo compensada pelo elevado ganho no processo fotossintético, no entanto na ausência de luz, esta perda fica mais evidente (Raven e Beardall, 2016). Para evitar tais perdas nos cultivos algais, são adicionadas fontes de carbono como fonte de energia durante a ausência de luz. Sendo assim, as microalgas se desenvolvem em condições mixotróficas de cultivo, onde utilizam simultaneamente processos fotossintéticos e fontes de carbono orgânico e inorgânico como fonte de energia (Miao et al., 2016). A Tabela 1 e figura 1 abaixo ilustram os principais tipos de metabolismo algal e suas fontes de energia e carbono.

Tabela 1. Variações do metabolismo algal em relação as condições de cultivo.

Condição de cultivo	Fonte de carbono	Fonte de energia	Tipo de cultivo	Vantagens	Limitações
Fototrófico	Inorgânico	Luz	Sistema aberto / fotobioreator	(1) Alta produção de pigmentos (2) Baixo custo	(1) Baixa tolerância a alta luminosidade (2) Requer fotobiorreatores específicos (3) Baixa taxa de crescimento e produtividade (4) alto custo de colheita
Heterotrófico	Orgânico	Orgânico	Fermentadores convencionais	(1) Bioreatores eficientes (2) Alta taxa de crescimento e Produtividade (3) Baixo custo de colheita	(1) Baixa produção de pigmentos (2) Alto custo (3) Maior emissão de CO ₂ (4) Necessita esterilização do meio (5) Grandes quantidades de compostos orgânicos (6) Alto custo de substratos
Mixotrófico	Inorgânico e Orgânico	Luz e compostos orgânicos	Fotobiorreatores fechados	(1) Alta tolerância a luminosidade (2) Alta produção de pigmentos (3) Alta taxa de crescimento e produtividade (4) Menor emissão de CO ₂	(1) Alto custo (2) Necessita esterilização do meio (3) Alto custo de substratos (4) Alto custo de equipamentos

Fonte: Adptado de SundarRajan et al. 2019).

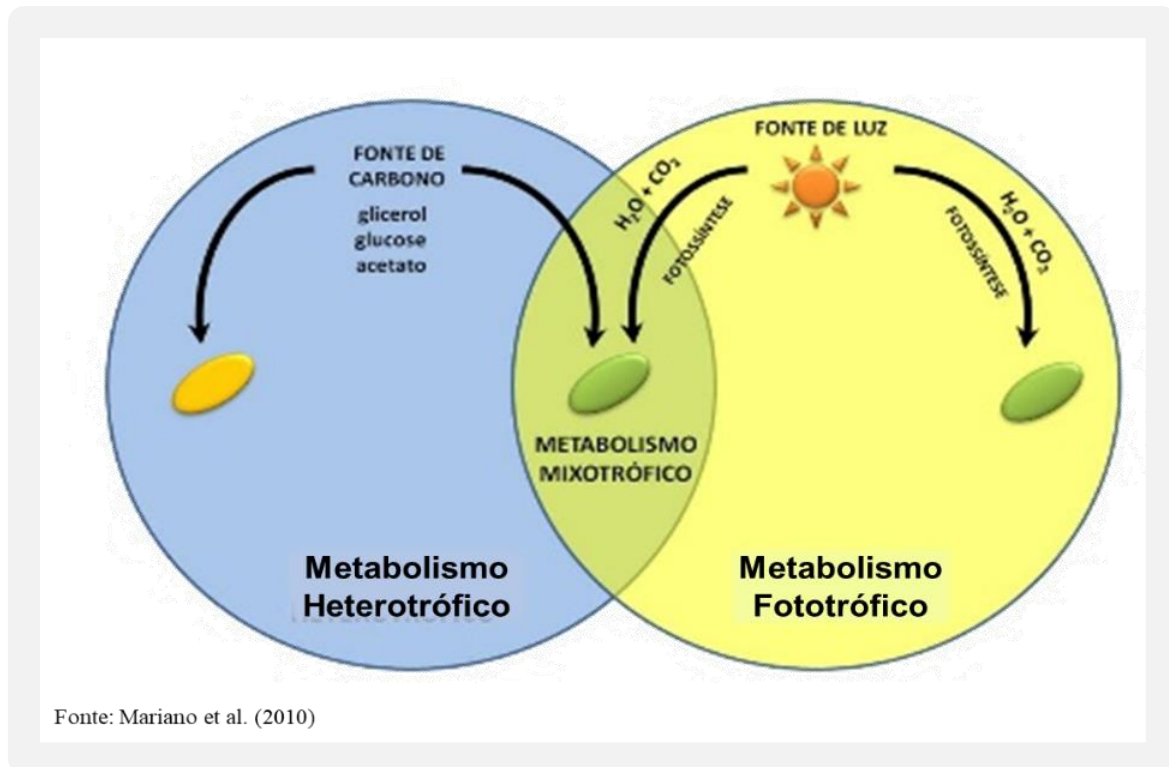


Figura 1. Esquema dos tipos de metabolismo das microalgas.

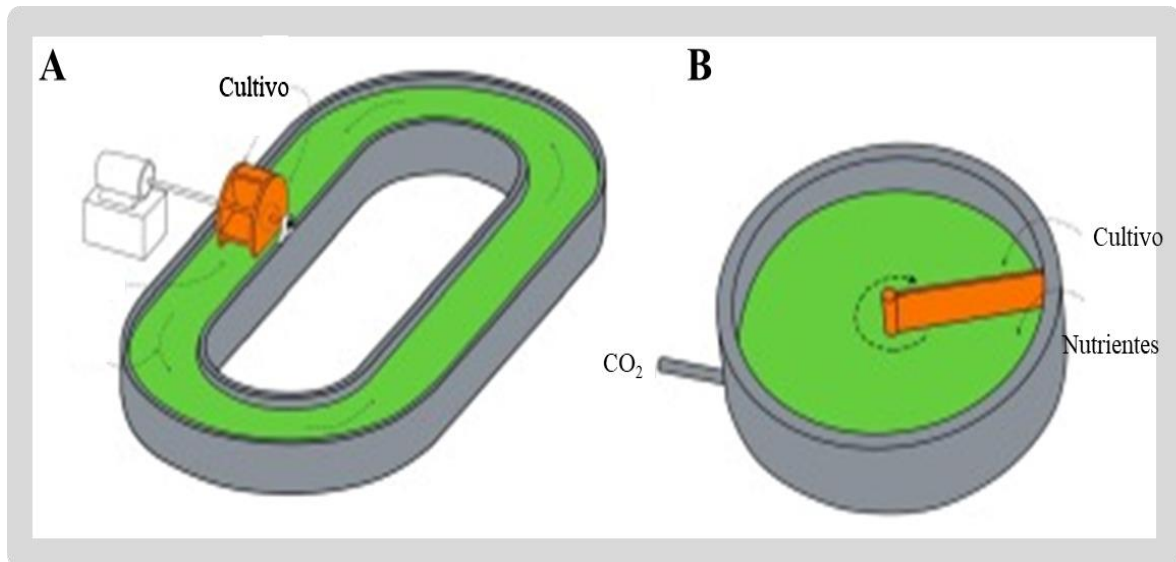
O carbono é uma fonte de grande importância no metabolismo das microalgas e cerca de 46 a 50% da biomassa seca é constituída por este elemento (Grobbelaar, 2004). O seu uso nos sistemas de cultivo pode ser fornecido sob forma gasosa ou orgânica dependendo do tipo de metabolismo algal. Microalgas fototróficas absorvem o carbono sob a forma de dióxido gasoso e convertem em hidrocarbonetos durante o processo de fotossíntese. Microalgas mixotróficas ou heterotróficas absorvem substâncias orgânicas como por exemplo açúcares (sacarose, glicose e frutose), ácidos orgânicos (ácido acético, ácido láctico), álcoois e aminoácidos (Lee, 2004).

A assimilação de fontes de carbono orgânico utilizado pelas células das microalgas para o seu desenvolvimento depende de dois fatores, variando de acordo com a disponibilidade de transporte interno da célula e a presença de enzimas específicas que convertem tais fontes de carbono em precursores adequados para o metabolismo algal (Azma et al., 2011). As espécies de microalgas são capazes de absorverem aproximadamente de 1,65-1,83 g de dióxido de carbono a cada 1 g de biomassa obtida (Doucha et al., 2005).

Mesmo as fontes de carbono sendo importantes para o desenvolvimento algal, outros fatores também influenciam sua assimilação durante o cultivo, tais como, a disponibilidade de oxigênio, pH equilibrado, temperatura e a intensidade de luz (Mata et al., 2010). Nos sistemas de cultivo quando são adicionadas fontes convencionais de carbono orgânico, o custo de produção tende a aumentar podendo representar até 80% dos custos. O uso de fontes alternativas de carbono, é uma ferramenta indispensável na substituição de substratos orgânicos convencionais, desde que esta fonte forneça as exigências nutricionais necessárias para o ótimo funcionamento do metabolismo algal (Mitra et al., 2012).

Nos cultivos de microalgas, é comumente adotado o sistema de cultivo em batelada ou estacionário, mesmo quando o cultivo é realizado em larga escala (Lee, 2016). Dentre os diferentes tipos de cultivo, o autotrófico é uma das técnicas mais viáveis economicamente em sistemas de larga escala, por ser conduzido em tanques abertos aproveitando a incidência luminosa natural (Lam e Lee, 2012). Os sistemas abertos para o cultivo em larga escala de microalgas são estruturas desenvolvidas principalmente em formatos ovais (raceways ponds), onde a cultura fica exposta as condições externas. Estes sistemas são baseados e desenvolvidos levando em consideração três fatores: geometria que possibilite o máximo aproveitamento da luminosidade natural, controle de temperatura e controle da circulação do cultivo.

Devido a esses fatores, os raceways são comumente construídos com baixas profundidades (20-50 cm) permitindo maior aproveitamento da luminosidade, a temperatura é controlada através da evaporação e a circulação é estimulada com o auxílio de pás giratórias que colaboram para a mistura dos nutrientes e suspensão das células algais (Kumar et al., 2015) (Figura 2). Além de promoverem a circulação e suspensão das células algais, as pás giratórias atuam formando zonas de rotação no sistema, onde as células circulam entre áreas com maior incidência luminosa e menor incidência, este ciclo é denominado de ciclo claro/escuro e é fundamental para estimular o crescimento algal (Chen et al., 2016).



Fonte: Adptado de SundarRajan et al. (2019).

Figura 2. Ilustração do cultivo em sistema aberto onde: (A) cultivo em lagoas do tipo raceway e (B) cultivo em tanque circular.

Devido estas características a implementação de sistemas abertos em larga escala para o cultivo de microalgas são as estruturas mais utilizadas, uma vez que, este tipo de sistema é de fácil implementação, consumo de energia reduzido, baixo custo operacional e de implementação quando comparado aos sistemas fechados (He et al., 2016).

Os cultivos algais em sistemas abertos são comumente desenvolvidos em áreas próximas a indústrias para melhor aproveitamento de gás carbônico no sistema de cultivo devido à alta emissão deste gás nestas áreas (Su et al., 2017). No entanto, os cultivos em sistemas abertos apresentam algumas desvantagens, uma vez que estes sistemas necessitam de maior controle operacional para evitar os riscos de contaminações externas, maior controle da temperatura, incidência luminosa e fatores climáticos.

Tais sistemas apesar de terem ótimas vantagens econômicas, apresentam baixa produção de biomassa quando comparado aos sistemas fechados (fotobioreatores), cerca de 10 a 25g de biomassa seca por m² (Jankowska et al., 2017).

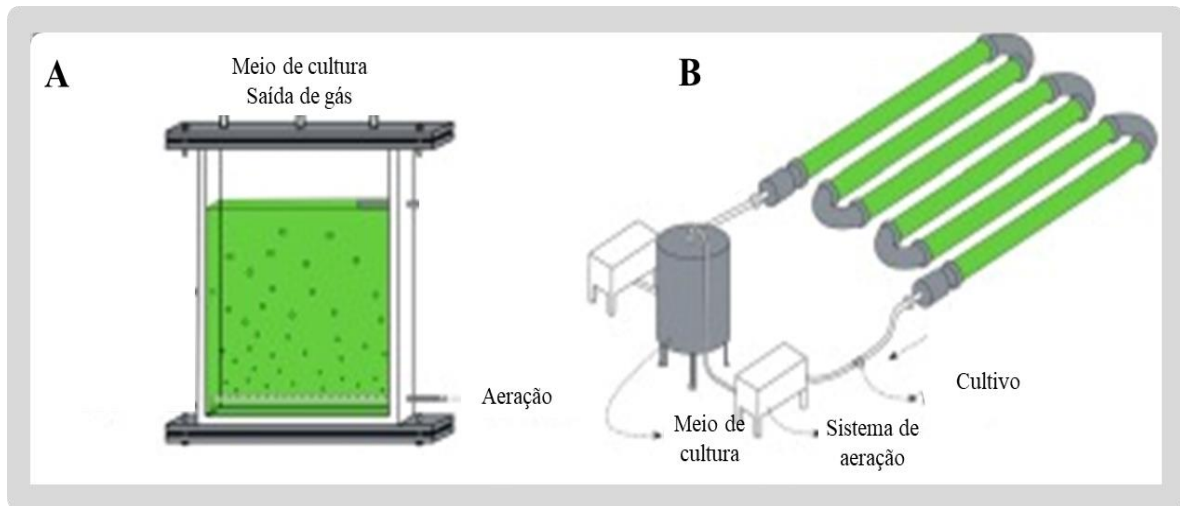
Sistemas de cultivo fechados são comumente chamados de fotobiorreatores, nestes sistemas é possível a otimização do cultivo algal. Os fotobiorreatores possibilitam maior controle de pH, intensidade luminosa, temperatura e gás carbônico e devido esse maior controle operacional é possível obter maiores produtividades algais, cerca de 20 à 100g de biomassa seca por m² (Jankowska et al., 2017). A Tabela 2 ilustra as principais características de cada tipo de sistema (aberto ou fechado).

Tabela 2. Principais características dos cultivos de microalgas em sistemas abertos e fechados.

Características	Sistemas abertos	Sistemas fechados
Área para produção (m ²)	7.828	5.681
Produtividade em volume (Kg m ⁻³ d ⁻¹)	0,117	1,54
Produtividade em biomassa (Kg m ⁻³)	0,14	4
Eficiência de luz	Baixa	Alta
Escalonamento	Difícil	Fácil
Controle de processos	Difícil	Fácil
Controle da cultura	Difícil	Possível
Homogeneização da cultura	Muito baixa	Uniforme
Custos de operação	Baixo	Alto
Evaporação no sistema	Alta	Baixa

Fonte: Adaptado de Abomohra et al. (2016).

De acordo com Rawat et al. (2013), grande parte dos cultivos em larga escala são limitados a produção e obtenção de compostos de alto valor comercial. Pesquisas em todo o mundo vêm focando no desenvolvimento de sistemas e estratégias de produção mais eficazes e que possibilitem o aumento da produção, como o desenvolvimento de sistemas fechados (Varfolomeev e Wasserman, 2011) (Figura 3).



Fonte: Adptado de SundarRajan et al. (2019).

Figura 3. Ilustração do cultivo em sistema fechado onde: (A) cultivo em fotobiorreatores do tipo Painel e (B) cultivo em fotobiorreator tubular.

Nestes tipos de sistemas, a iluminação é fornecida através do uso de lâmpadas fluorescentes ou de led e o gás carbônico é injetado diretamente através de tubos compressores ou bombas de ar. O design pode apresentar formas variadas como cilíndrica, tubular, placa, e normalmente são projetados em material translúcido para facilitar a absorção da luz, no entanto apresentam um alto custo de implementação e de operação (Su et al., 2017). De acordo com Abomohra et al. (2016), o alto custo dos sistemas de cultivo fechado podem ser compensados através da maior produtividade obtida, uma vez que nestes sistemas é possível obter 10 vezes mais biomassa que em sistemas abertos.

Temperatura, oxigênio e pH

Nos cultivos de microalgas, a temperatura é um fator que exerce grande influência na fisiologia e respostas morfológicas das células algais (Zeng et al., 2011). Temperaturas elevadas são responsáveis por acelerar o metabolismo algal e baixas temperaturas são responsáveis por desacelerar o metabolismo, inibindo a taxa de crescimento (Munoz e Guieysse, 2006). As microalgas toleram uma ampla gama de temperatura, podendo tolerar temperaturas de 8 a 15° C a baixo da temperatura ótima para o seu desenvolvimento, no entanto, quando a temperatura é acima do requerido para cada espécie, aproximadamente 4° C

acima, o cultivo algal é afetado drasticamente e pode acarretar a morte de toda a cultura (Mata et al., 2010).

Outro parâmetro de cultivo de grande importância é o oxigênio que é considerado um fator essencial, quando a densidade celular é elevada e as concentrações de oxigênio são reduzidas, ocorre a diminuição da produtividade algal (Wu e Shi, 2007). Conforme a produtividade algal do sistema aumenta, os níveis de oxigênio tendem a ser maior (Zhao et al., 2011). Este fator é ocasionado durante o processo de fotossíntese onde as células após liberarem oxigênio elevam o teor de oxigênio dissolvido no sistema de cultivo, no entanto, altas concentrações podem oxidar ou inibir enzimas responsáveis pelo processo fotossintético algal (Junying et al., 2013). Além disso, quando os níveis de oxigênio se encontram abaixo do requerido pela cultura, a absorção de luz pelas células algais é afetada e o desenvolvimento se torna limitado (Brennan e Owende, 2010).

O pH dos sistemas de cultivo é um fator que também influencia no crescimento e na produtividade algal sendo o pH das células algais citosólico, ou seja, é definido como neutro ou ligeiramente alcalino e as enzimas celulares são bastante sensíveis a variações de pH podendo se tornar inativas quando expostas a condições ácidas de cultivo (Tripathi et al., 2015). Em cultivos onde com adição de CO₂ o controle do pH é fundamental, uma vez que a elevada concentração de CO₂ pode alterar o pH, acidificando o meio e afetando negativamente a fisiologia das células (Kumar et al., 2011).

Diversas espécies de microalgas tem o seu ótimo crescimento em pH neutro, no entanto algumas espécies podem se desenvolver em condições ácidas ou alcalinas (Zeng et al., 2011). Além de influenciar o desempenho celular e metabolismo algal, quando muito elevado, pode interferir na absorção de determinados nutrientes como o ferro o qual acaba se decantando e ocasiona a aglomeração das células algais no sistema (Sipaúba-Tavares e Rocha, 2001).

Meios de cultura

O cultivo algal depende de vários fatores para obtenção do máximo desempenho celular, onde o meio de cultura influencia diretamente neste desempenho. A escolha do meio de cultura a ser adotado no cultivo algal é baseada em formulações através de elementos com concentrações conhecidas além de vitaminas e elementos traços (Barsanti e Gualtieri, 2014). O meio de cultura é o principal fator responsável por aumentar a alta produtividade de biomassa e os nutrientes disponibilizados para as algas podem estimular ou inibir a produtividade em razão da sua disponibilidade (Sipaúba-Tavares et al., 2011).

Nos cultivos algais, fontes de nutrientes devem ser utilizadas nas formulações dos meios de cultura, como fontes de carbono e nitrogênio, micronutrientes, vitaminas e oligoelementos (Singh e Dhar, 2011). Dentre estes elementos disponíveis no meio de cultura, alguns são considerados nutrientes essenciais para o crescimento das microalgas. O fato de determinado elemento estar presente na composição da microalga não indica que este elemento seja essencial para o seu desenvolvimento. Os elementos são considerados essenciais quando sua deficiência afeta diretamente o metabolismo algal, sendo esse elemento insubstituível para o desempenho de determinada função metabólica, e este elemento deve estar diretamente ligado a nutrição algal independente de seus efeitos de otimização de cultivo (Epstein e Bloom, 2006).

Dentre os elementos essenciais pode-se dividir em macronutrientes minerais e orgânicos como o Nitrogênio, Fósforo, Cálcio, Magnésio, Potássio, Enxofre, Hidrogênio e Oxigênio e os micronutrientes como Ferro, Boro, Cobre, Cobalto, Zinco, Vanádio, Molibdênio e Sódio (Sipaúba- Tavares e Rocha, 2001). Além dos elementos essenciais (macro e micronutrientes), a adição de vitaminas principalmente do complexo B são indicadas para proporcionar maior produtividade de biomassa e podem ser essenciais para o desenvolvimento de algumas espécies de microalgas (Sipaúba-Tavares e Bachion, 2002).

O nitrogênio pode estar presente nos cultivos algais sob diferentes formas como amônia, ureia e nitrato, e são comumente utilizados no cultivo em larga escala de microalgas (Lin e Lin, 2011). No entanto dentre as formas de nitrogênio, a amônia é preferencialmente assimilada pela maioria das espécies

de microalgas devido apresentar menor consumo energético para sua assimilação, porém em cultivos prolongados e em larga escala, a ureia é a fonte de nitrogênio mais utilizada por apresentar baixo custo de obtenção e dificultar a contaminação por protozoários ou outras microalgas no cultivo (Xia et al., 2013). O fósforo é um elemento que constitui menos de 1% das microalgas, no entanto o déficit deste elemento em seu cultivo é um fator limitante do crescimento algal (Hernández-Pérez e Labbé, 2014). Devido a estas funções, o fósforo é um elemento essencial requerido pelas microalgas, pois auxilia nos processos metabólicos das células, na conversão de energia e em processos fotossintéticos (Junying et al., 2013, Rashid et al., 2014).

Um dos maiores problemas nos sistemas de cultivo de microalgas é o elevado custo de produção dos meios de cultura utilizados, sendo assim, o uso de meios de cultura alternativo tem sido proposto como forma de reduzir os custos de produção e substituir as formulações comerciais que são produzidas a partir de reagentes, obtendo condições similares em relação ao desenvolvimento, crescimento e valor nutricional algal (Sipaúba-Tavares et al., 2018). Alguns autores evidenciam que o uso de fertilizantes inorgânicos na formulação de meios de cultura é uma fonte viável e de baixo custo, atuando de forma eficiente no desenvolvimento de algumas espécies de Chlorophyceae, uma vez que estes fertilizantes apresentam concentrações conhecidas e elevados teores de nitrogênio, fósforo e potássio (Sipaúba-Tavares et al., 1999, Campaña-Torres et al., 2012, Scardoeli-Truzzi e Sipaúba-Tavares, 2017a, Sipaúba-Tavares et al., 2018).

Outros autores também utilizaram efluentes como meio de cultura reduzindo impactos ambientais associados com seu descarte em corpos d'água (Neckel et al., 2016) e meio a base de plantas aquáticas (Sipaúba-Tavares et al., 2009, 2017). O uso de plantas aquáticas em substituição aos meios de cultura comerciais pode ser uma ferramenta adotada devido as plantas aquáticas conterem elevadas concentrações de nitrogênio, fósforo, magnésio, manganês, cobre, zinco entre outros compostos, disponibilizando diretamente para as células algais e possibilitando o seu uso como meio de cultura (Sahu, 2002; Sipaúba-Tavares e Braga, 2007, Sipaúba-Tavares et al., 2009, 2015, 2017). Sendo assim, pesquisas voltadas na utilização de novos resíduos e subprodutos

para formulação de meios alternativos de cultura são essenciais pois viabilizam a produção e reduzem os custos operacionais principalmente em cultivos de larga escala (Gómez-Serrano et al., 2015).

Intensidade luminosa e ciclos de luz

A luminosidade é um fator que desempenha grande importância nos sistemas de cultivo algal, fornecendo energia necessária para as células realizarem processos fotossintéticos, auxiliando na conversão de nutrientes inorgânicos e dissolvidos no sistema, em biomassa. Portanto, a luz é um fator essencial nestes sistemas colaborando para a obtenção de alta produtividade de biomassa (Sutherland et al., 2015). A intensidade luminosa necessária é específica a cada espécie cultivada e ao fornecê-la de forma homogênea no sistema de cultivo é possível obter melhores taxas de absorção da luminosidade e energia aumentando a eficiência do processo de fotossíntese (Sipaúba-Tavares et al. 2011).

A luz atua como fonte de energia em cultivos fototróficos e mixotróficos, e a intensidade a ser utilizada no cultivo é de grande importância pois pode aumentar ou reduzir a produtividade algal, além disso a faixa de luminosidade fotossinteticamente ativa nas microalgas está nos comprimentos de onda entre 400 a 750 nm (Wilhelm e Jakob, 2011). Nos sistemas de cultivo a luminosidade pode ser absorvida diretamente pelas células algais ou dispersa no sistema para evitar danos as células quando expostas a luminosidade acima da faixa requerida (Wágner et al., 2018).

As microalgas requerem pelo menos de 10-15 $\mu\text{mol m}^2 \text{s}$ de luminosidade para assimilação de determinados compostos como a glicose, não se desenvolvendo em condições completamente escuras (Subramanian et al., 2016). Apesar de ser um fator limitante na produtividade algal quando fornecida abaixo da intensidade necessária a cada microalga e tempo requerido, pode causar danos às células inibindo ou perdendo a cultura, este fenômeno é denominado fotoinibição (Mondal, 2017).

Uma solução para otimizar o cultivo de algumas espécies de microalgas é o uso de ciclos de luz, tais ciclos (claro/escuro) desempenham importante função e são diretamente ligados a síntese de compostos orgânicos e no consumo dos nutrientes, afetando diretamente a taxa de crescimento e produtividade de acordo com o tempo de fotoperíodo (Singh et al., 2015). Ciclos de luz claro/escuro apresentam interações diretas com o metabolismo celular, taxa de absorção e controle de fótons, interações com o aparato fotossintético e a dinâmica energética das microalgas (Takache et al., 2015).

Descrição das espécies estudadas

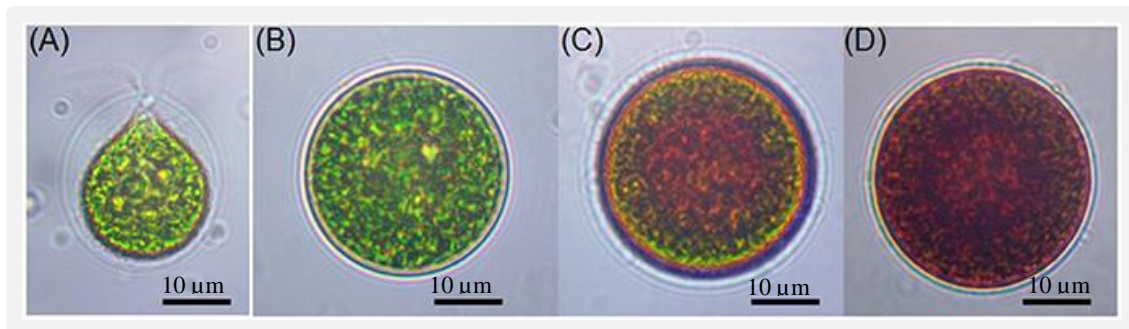
Haematococcus pluvialis

A *Haematococcus pluvialis* Flotow é uma microalga verde biflagelada unicelular pertencente a classe Chlorophyceae, ordem Volvocales (Hoek et al., 1995, Eom et al., 2006, Nakada e Ota, 2016) e é classificada da seguinte forma: Em relação as características dos membros pertencentes a esta ordem, é destacado a mobilidade, característica única que está presente tanto durante a fase reprodutiva quanto na fase vegetativa celular (Khondker et al., 2007). O gênero *Haematococcus* é representado por organismos bastante diversificados, diferenciando-se entre suas linhagens e espécies (Buchheim et al., 2013, Klochkova et al., 2013, Allewaert et al., 2015).

Esta espécie de microalga é descrita como uma espécie cosmopolita e comumente encontradas em poças rochosas naturais, pequenas lagoas e principalmente águas rasas onde apresentam elevadas concentrações de zinco (Pentecost, 2011). Outra principal característica desta espécie de microalga é o seu complexo ciclo de vida, que inclui células móveis/não móveis e células de resistência ou cistos (González et al., 2009).

Quando as células se encontram na fase vegetativa, ou seja, quando estão expostas a condições favoráveis de cultivo, crescem exponencialmente e iniciam o processo de reprodução onde a célula principal denominada é célula mãe ou Theca, podendo gerar até 32 novas células flageladas, que reiniciarão o ciclo. Em condições desfavoráveis as células têm sua divisão celular lenta, a

coloração das células começa a apresentar tonalidade avermelhada e iniciam a síntese de astaxantina, nesta etapa a parede celular fica mais espessa tornando as células cistos de resistência (encistamento) (Figura 5). A figura abaixo mostra os diferentes estágios das células da microalga *H. pluvialis*.



Fonte: Shah et al. (2016).

Figura 4. Imagem de microscopia de luz das células da microalga *H. pluvialis* durante seu ciclo de vida onde (A) são células flageladas ricas em clorofila (B) célula vegetativa; (C) início da fase de síntese de astaxantina; (D) célula rica em astaxantina.

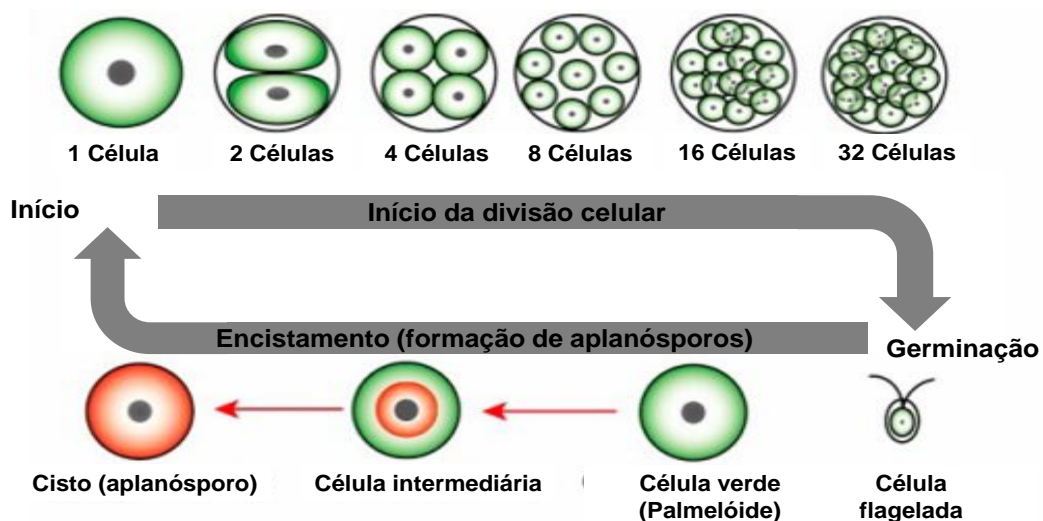


Figura 5. Ciclo de vida da microalga *Haematococcus pluvialis* (adaptado de Wayama et al. 2013).

Entre as espécies de microalgas comercialmente produzidas, a *Haematococcus pluvialis* destaca-se por produzir a maior quantidade de

astaxantina natural quando comparada a outros organismos. Sua coloração avermelhada durante a fase de encistamento é devido a síntese deste composto que é acumulado em elevadas concentrações no interior das reservas lipídicas no citoplasma (Ota et al., 2018). A astaxantina possui alto valor biológico e atividade antioxidante com diversas aplicações nas indústrias farmacológicas, nutracêuticas, cosméticos além dos setores alimentícios e aquícolas (Shah et al., 2016).

Durante a fase de desenvolvimento onde as células apresentam altas concentrações de clorofila (“green stage”), a maioria das cepas de *H. pluvialis* sintetizam alto teor de proteína (29-45% peso seco) (Gacheva et al., 2015). Em relação ao conteúdo lipídico, os teores variam de 20 a 25% do peso seco e aproximadamente 10% destes lipídios são compostos por ácidos graxos poli-insaturados de cadeia curta (C16 e C18) (Shah et al., 2016).

Quando as células de *H. pluvialis* são expostas a condições desfavoráveis de cultivo (estresse) podem acumular cerca de 3-5% de astaxantina em relação ao seu peso seco (Chekanov et al., 2014). Tais condições adversas estimulam mudanças morfológicas em suas células vegetativas verdes para células encistadas vermelhas (Sun et al., 2015). A síntese de astaxantina está diretamente ligada com as reservas lipídicas sob condições de estresse celular (Solovchenko, 2015). Alguns fatores são responsáveis por induzir o estresse em *H. pluvialis* como por exemplo, altas luminosidades (Sheng et al., 2018), elevada salinidade no cultivo (Gao et al., 2015), temperatura (Yoo et al., 2012), pH (Hata et al., 2001) e estresse nutricional (limitação de nitrogênio e fósforo) (Chekanov et al., 2014).

Apesar da alta produção de astaxantina por via sintética, devido ao mercado consumidor buscar por fontes mais “verdes”, a via de obtenção natural de astaxantina é mais favorável devido à sua forma estrutural, aplicação e segurança de uso quando comparada com a astaxantina sintética (Pérez-López et al., 2014). A produção de astaxantina obtida via *Haematococcus pluvialis* movimenta um mercado anual de aproximadamente U\$2,145 milhões de dólares (Kim et al., 2016), representando apenas 1% da quantidade de astaxantina comercializada (Panis e Carreon, 2016).

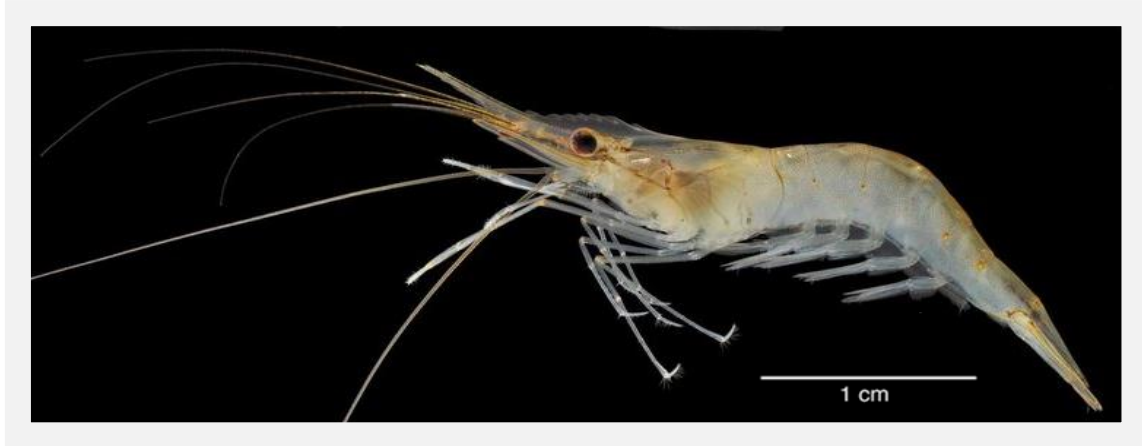
Diferentes estudos já foram desenvolvidos focando a obtenção da máxima densidade celular da microalga *Haematococcus pluvialis* sob diversas condições de cultivo (Cifuentes et al., 2003, Fabregas et al., 2000, Göksan et al., 2011, Kaewpintong et al., 2007, Sipaúba-Tavares et al., 2013, Sipaúba-Tavares et al., 2015, Scardoeli-Truzzi e Sipaúba-Tavares, 2017ab). O cultivo em escala comercial de *H. pluvialis* é desenvolvido utilizando duas estratégias de cultivo, onde a primeira etapa é denominada fase verde, obtendo-se o máximo crescimento celular durante menor tempo de cultivo; e a segunda etapa é denominada de etapa de indução, onde através de mudanças nas condições de cultivo estimulam a síntese e acúmulo de astaxantina. Durante esta etapa a divisão e formação de novas células é menor, no entanto as células podem acumular elevadas concentrações de astaxantina em relação ao seu peso seco (Sheng et al., 2018). Sendo assim, conhecer os principais fatores e características no desenvolvimento de determinada espécie de microalga é fundamental para aplicar ferramentas que possibilitem a otimização dos sistemas de cultivo.

Macrobrachium amazonicum

Dentre as espécies de camarões existentes no Brasil, grande parte são encontradas em ambientes aquáticos continentais e são representadas pela Infraordem Caridea, onde é composta pelas famílias Atyidae, Euryrhynchidae, Sergestidae e Palaemonidae que apresentam diversificadas morfologias e habitats (Pimentel e Magalhães, 2014). Cerca de 38 espécies de camarões de água doce já foram registradas no Brasil, onde 22 espécies são populares na bacia Amazônica e pertencentes a três gêneros, dentre eles *Pseudopalaemon*, *Palaemon* e *Macrobrachium* (De Grave e Ashelby, 2013).

Dentre o gênero *Macrobrachium*, o camarão-da-amazônia *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) é uma espécie nativa brasileira e amplamente distribuída em diversas regiões da América do Sul, onde é comumente encontrada no rio Amazonas, no Nordeste do Brasil, rio São Francisco e Paraguai habitando ambientes lacustres, inundáveis e lóticos das

planícies tropicais e subtropicais (Maciel e Valenti, 2009, Augusto e Valenti, 2016).



Fonte: Magalhães et al. (2018).

Figura 6. Imagem do camarão-da-Amazônia *Macrobrachium amazonicum*.

O camarão-da-Amazônia (*M. amazonicum*) apresenta elevada importância nutricional, uma vez que sua carne pode conter um teor proteico de até 21%, onde 7% são de aminoácidos essenciais e alto teor lipídico principalmente de ácidos graxos poli-insaturados e monoinsaturados (Montoya-Martinez et al., 2016). Esta espécie pode alcançar o tamanho de até 16 cm e pesar aproximadamente 30 gramas, sendo esses parâmetros considerados pequenos quando comparados a outras espécies comercializadas (Brown et al., 2010). No entanto, de acordo com Hayd e Anger (2013), os animais encontrados em águas costeiras tendem a tamanhos maiores do que os encontrados em ambientes continentais.

As regiões Norte e Nordeste do Brasil são as maiores responsáveis na captura de camarões dulcícolas em ambientes naturais devido à grande abundância e ampla distribuição geográfica, onde esta atividade é tradicionalmente praticada através da pesca artesanal (Bentes et al., 2011, Ramos et al., 2016). Sendo assim, o camarão da Amazônia é uma espécie de elevado valor econômico e social (Alcântara e Kato, 2016).

As principais vantagens do cultivo dessa espécie são devido a rusticidade comparado a outras espécies cultivadas, rápido crescimento, fácil manutenção dos sistemas de produção e maior resistência a doenças e predadores (Maciel e Valenti, 2009). Analisando o lado ecológico do cultivo do *Macrobrachium amazonicum*, por ser uma espécie nativa ela não apresenta riscos a natureza devido a escapes nas produções aquícolas, diferente de quando se cultiva espécies exóticas (Brown et al., 2010). O seu cultivo além de gerar menores impactos ambientais, requer baixa tecnologia e baixo custo de produção (Valenti et al., 2011).

Em relação as exigências nutricionais do camarão *Macrobrachium amazonicum*, poucas informações são descritas em literatura, e devido seu alto potencial e importância econômica para a aquicultura, o conhecimento destas exigências é fundamental para formular e desenvolver rações que proporcionem o máximo da produtividade desta espécie (New et al., 2010). Recentemente, algumas pesquisas com este enfoque nutricional de reprodutores, larvas, pós-larvas e juvenis foram descritas (Araujo e Valenti, 2005; Glencross et al., 2013). No entanto, ainda são necessárias maiores informações sobre as exigências nutricionais desta espécie principalmente em relação as exigências proteicas, energéticas e potencial genético (Pezzato et al., 2003, Glencross et al., 2013).

Hipóteses

- ❖ A hidrólise do melaço de cana de açúcar facilita a assimilação desta fonte de carbono orgânico, uma vez que reduz o tamanho da molécula de sacarose em moléculas de glicose e frutose necessitando que a microalga *H. pluvialis* tenha um menor gasto energético;
- ❖ O uso de melaço hidrolisado tem mais efetividade e melhores resultados no crescimento e desenvolvimento da microalga *H. pluvialis*;
- ❖ Sob condição mixotrófica, induzir ciclos de luz (claro/escuro) no cultivo da microalga *H. pluvialis* aumentaria a produção de células em curto espaço de tempo;
- ❖ A microalga *H. pluvialis* é uma espécie que pode crescer em condições mixotróficas e durante períodos de cultivo sem iluminação, utilizando o carbono como principal fonte de energia;
- ❖ A biomassa de *H. pluvialis* é uma fonte rica em proteína de alto valor biológico capaz de substituir outras fontes proteicas em formulações de dietas alimentares para o camarão *Macrobrachium amazonicum*.

Objetivos Gerais

Os objetivos gerais deste estudo foram desenvolver uma nova metodologia de cultivo da microalga *Haematococcus pluvialis* utilizando fontes alternativas e renováveis de nutrientes, carbono e ciclos de luz a fim de otimizar o cultivo e conseqüentemente aumentar a produção de biomassa algal, composição bioquímica em um curto espaço/tempo e implementando no cultivo um baixo custo de produção. Em relação a biomassa algal, objetivou-se a aplicação direta na formulação de uma dieta alimentar para a espécie nativa do camarão *Macrobrachium amazonicum*.

Objetivos Específicos

Etapa Experimental I: Nesta etapa experimental objetivou-se o uso do melaço de cana de açúcar como uma fonte alternativa de carbono no cultivo mixotrófico da microalga *H. pluvialis* sob duas condições: melaço *in natura* (bruto) e melaço hidrolisado cultivados em meio alternativo de fonte inorgânica e orgânica. Foram avaliadas as características de crescimento, morfológicas, bioquímicas e parâmetros do cultivo algal.

Etapa Experimental II: A segunda etapa experimental objetivou selecionar a melhor condição de uso do melaço de cana de açúcar obtida através da Etapa Experimental I e avaliar o cultivo da microalga *H. pluvialis* em condições mixotróficas sob diferentes ciclos de luz (claro/escuro), observando a influência de fases claro/escuro no desenvolvimento e metabolismo algal através da avaliação de crescimento, morfologia, composição bioquímica e parâmetros de cultivo em diferentes meios de cultura.

Etapa Experimental III: A terceira etapa objetivou desenvolver uma nova aplicação para o uso da biomassa de *H. pluvialis*, verificando se a biomassa desta microalga poderá ser uma fonte proteica adequada na inclusão de uma dieta para alimentação do camarão *Macrobrachium amazonicum*, uma vez que esta biomassa é rica em proteína, minerais e outros compostos que podem melhorar o desempenho zootécnico desta espécie.

Justificativa

O cultivo de microalgas é uma área de grande destaque, uma vez que estes microrganismos sintetizam diversos compostos de interesse para produção de fármacos, cosméticos, suplementos e principalmente alimento para o setor aquícola. Otimizar e reduzir os custos de produção são essenciais para a implementação de um cultivo algal. O uso de fontes alternativas como: fertilizantes inorgânicos, plantas aquáticas e melaço de cana-de-açúcar, são ferramentas que reduzem os custos de produção viabilizando o cultivo em larga escala. No entanto, alguns compostos necessitam estar disponibilizados em formas mais simples para serem assimilados. A hidrólise do melaço de cana de açúcar reduz a sacarose em moléculas de glicose e frutose possibilitando melhor aproveitamento desta fonte de carbono, devido menor gasto energético para sua assimilação.

Outro fator que colabora para elevada densidade celular é a luminosidade, tanto a intensidade quanto o fotoperíodo. Avaliar o efeito de ciclos de luz determinando o fotoperíodo ideal para o cultivo de *H. pluvialis* é essencial para alcançar altas taxas de produtividade e também é uma forma de comprovar que esta espécie pode crescer em condições mixotróficas, uma vez que na ausência de luminosidade, indicaria que a microalga utiliza o carbono como fonte de energia para realização de processos fisiológicos.

A aplicação de biomassa algal na formulação de dietas alimentares para organismos aquáticos é possível devido que as microalgas possuem alto valor nutricional, atividades antioxidantes e enzimáticas dentre outros benefícios. Estudos voltados para nutrição do camarão brasileiro *Macrobrachium amazonicum* são escassos e os resultados obtidos através deste estudo poderá fornecer ferramentas que ajudem a aumentar a produção e melhorar o desempenho zootécnico desta espécie nos sistemas de cultivo.

Material e Métodos Gerais

Locais de estudo

Este estudo foi desenvolvido em dois setores do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP), Jaboticabal, SP. Os ensaios com o cultivo da microalga foram conduzidos no setor do Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton (LLPP), onde é mantida a cepa da microalga *Haematococcus pluvialis*. A outra etapa experimental visando a aplicação da microalga *H. pluvialis* como dieta alimentar, foi conduzida no setor de Carcinicultura do Centro de Aquicultura (Figura 7).



Figura 7. Setores onde foram desenvolvidos a pesquisa onde (A) Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton e (B) Setor de Carcinicultura.

Cepa da alga e pós-larvas

A microalga *Haematococcus pluvialis* (CMEA 227 C1) foi obtida da coleção do Departamento de Biologia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro e, posteriormente, cultivada no Laboratório de Limnologia e Produção de Plâncton em sistema de cultivo estático não axênico, com aeração, iluminação e refrigeração constantes. As pós-larvas (PLs) recém metamorfoseadas do camarão-da-amazônia (*Macrobrachium amazonicum*) foram provenientes da larvicultura do setor de Carcinicultura do Centro de Aquicultura.

Etapa experimental I: Uso do melaço no cultivo algal

Nesta etapa foi avaliado os efeitos da adição de melaço (cultivo mixotrófico) sob duas formas: *in natura* e hidrolisado. Para avaliar os efeitos do melaço “in natura” e hidrolisado, a microalga *Haematococcus pluvialis* foi cultivada em dois meios de cultura: o meio a base de fertilizante inorgânico NPK 10:10:10 (fonte inorgânica) e o meio a base de macrófita *Eichhornia crassipes* (fonte orgânica). As culturas pré-cultivadas em frascos de 250 mL, em meio comercial WC ao atingirem a fase exponencial de crescimento (7 dias), cerca de 200 mL a uma densidade de $0,2 \times 10^5$ cels mL⁻¹ foram transferidas para frascos com volume de 2 L. Após 7-dias (fase exponencial de crescimento), 20% (v/v) das culturas algais foram inoculadas em frascos esterilizados com capacidade para 2 L contendo os meios de cultura, fertilizante inorgânico (NPK 10:10:10) e meio de macrófita (*E. crassipes*).

A duração dos experimentos foi de 28 dias e realizados em triplicata, sendo avaliado diariamente o crescimento algal, taxa de crescimento e tempo de duplicação. Durante o período experimental, foi monitorada a temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade da água com auxílio de uma sonda multiparâmetros YSI 556 MPS. Semanalmente nos dias 1, 7, 14, 21 e 28 de cultivo foram determinadas as concentrações de nutrientes disponíveis no cultivo (amônia, nitrito, nitrato e fósforo total), comprimento total das células algais, volume celular, carbono orgânico total, conteúdo de peso seco e teor de clorofila-a. No início e ao final de cada experimento, parte da biomassa foi coletada, centrifugada e liofilizada para posteriores análises da composição bioquímica (proteína, lipídio, carbono e nitrogênio intracelular).

Etapa experimental II: Uso de ciclos de luz no cultivo algal

Para estudar o efeito do fotoperíodo sobre o crescimento e composição bioquímica, *H. pluvialis* foi cultivada em condições mixotróficas (melaço de cana de açúcar como a fonte de carbono orgânico) com variações de ciclos de luz/escuro 24:0; 18:6; 12:12 e 6:18 h. O melaço de cana de açúcar foi utilizado

sob forma hidrolisada, uma vez que a microalga *H. pluvialis* apresentou melhor desempenho de cultivo da na Etapa experimental I.

A microalga *H. pluvialis* foi cultivada em três meios de cultura: o meio comercial WC, o meio de fertilizante inorgânico NPK (10-10-10) e o meio de macrófita (*E. crassipes*). Os inóculos foram pré-cultivados em frascos de 250 mL, em meio comercial WC e ao atingirem a fase exponencial de crescimento (7-dias), cerca de 200 mL a uma densidade de $0,2 \times 10^5$ cels mL⁻¹ foram transferidos para frascos com volume de 2 L. Após 7-dias (fase exponencial de crescimento), cerca de 20% (v/v) foi inoculado em cada respectivo meio de cultivo.

Os experimentos foram conduzidos em ambiente com temperatura mantida entre $23 \pm 2^\circ\text{C}$ em regime de luz D light a $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em 4 fotoperíodos (24:0; 18:6; 12:12 e 6:18 h), com duração de 14 dias e em triplicata. Diariamente foram avaliados o crescimento algal, taxa de crescimento e tempo de duplicação. Durante o período experimental, foi monitorada a temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade da água com auxílio de uma sonda multiparâmetros YSI 556 MPS. As concentrações de nutrientes disponíveis no cultivo (amônia, nitrito, nitrato e fósforo total) foram mensuradas ao início e final de cada ensaio e também determinado o comprimento total, volume celular, carbono orgânico total, conteúdo de peso seco e as concentrações de clorofila-a. A composição bioquímica (proteína, lipídio, carbono e nitrogênio) da microalga cultivada nos diferentes fotoperíodo foi avaliada no início e ao final de cada experimento, onde a biomassa foi coletada, centrifugada e liofilizada para posteriores análises.

Forma de preparo dos meios de cultura

❖ Meio comercial WC (Guillard e Lorenzen, 1972)

O meio de cultura WC é um meio comercial composto por diversos reagentes químicos, onde sua formulação fornece macro e micronutrientes além de vitaminas necessárias para o cultivo de diversas espécies de clorófitas. A tabela abaixo descreve a composição das soluções e forma de preparo do meio de cultura.

Tabela 3. Composição das soluções para preparo do meio de cultura WC (Guillard e Lorenzen, 1972).

Soluções	Reagentes
Solução A- diluir em 1 L de água destilada	CaCl ₂ 2H ₂ O - 18,36 g.
Solução B- diluir em 1 L de água destilada	MgSO ₄ 7H ₂ O - 18,47 g.
Solução C- diluir em 1L de água destilada	NaHCO ₃ - 6,30 g.
Solução D- diluir em 1 L de água destilada	H ₃ BO ₃ - 3,50 g.
Solução E	TRIS (Hydroximetil Amino-Metano) - 200 g. HCL (P.A) - 70 mL Água destilada - 930 mL
Solução F- Fosfato –diluir em 1 L de água destilada	KH ₂ PO ₄ - 67,8 g. Biotina – B6 ⁽¹⁾ - 1,0 mL** Tiamina ⁽¹⁾ - 1,0 mL**
Solução G- Nitrato- diluir em 1 L de água destilada	NaNO ₃ - 470,0 g. FeCl ₃ .6H ₂ O - 18,32 g. Na ₂ EDTA - 8,7 g. Traços de Metais-soluções estoque ⁽²⁾ - 1,0 mL
⁽¹⁾ solução estoque de Biotina e Tiamina xx/100 mL de água destilada. ^{**} Depende da quantidade de vitamina pesada. ⁽²⁾ Soluções estoque de traços de metais:	⁽²⁾ CoCl ₂ 6H ₂ O - 2,00 g. MnCl ₂ .4H ₂ O - 36,9 g. CuSO ₄ .5H ₂ O - 2,00 g. ZnCl ₂ - 2,00 g. Na ₂ Mo O ₄ .2H ₂ O - 1,20 g. Solução diluída para 100 ml.

Após o preparo das soluções descritas acima é necessário a correta diluição, seguindo a ordem e volume como indicado na tabela abaixo. Posteriormente, após a diluição, o meio de cultura deve ser autoclavado a 120°C durante 20 minutos.

Tabela 4. Preparo do meio de cultura WC (Guillard e Lorenzen, 1972).

Componentes	Volume (ml)
Água destilada	5.000
Solução A	10,0
Solução B	10,0
Solução C	10,0
Solução D	10,0
Solução E	25,0
Solução de Fosfato	2,5
Solução de Nitrato	2,5

❖ **Meio Inorgânico NPK (Sipaúba-Tavares et al., 1999)**

O meio de cultura inorgânico foi obtido a partir do fertilizante inorgânico NPK (10-10-10), sua formulação foi selecionada através de estudos anteriores onde determinaram que o balanço de N, P e K é o mais indicado para o cultivo de *Haematococcus plivalis* (Scardoeli-Truzzi e Sipaúba-Tavares, 2017a). Este fertilizante é composto por uréia (fonte de nitrogênio), superfosfato simples (fonte de fósforo) e sulfato de potássio (fonte de potássio).

Para o seu preparo, cerca de 50 g de fertilizante inorgânico foram pesados, posteriormente triturado, dissolvido em 1 litro de água destilada e autoclavado a 120°C durante 20 minutos. A partir do preparo desta solução, cerca de 40 mL foram inoculados em frascos com volume útil de 1400 mL como meio de cultura durante a etapa experimental.

❖ **Meio orgânico de macrófita aquática (Sipaúba-Tavares et al., 2009)**

O meio a base de macrófita foi obtido através do processamento da planta aquática *Eichhornia crassipes* comumente conhecida como aguapé. Esta planta foi selecionada devido à alta capacidade de absorção de compostos nitrogenados e fosfatados através de suas folhas e raízes, disponibilizando estes nutrientes diretamente no meio de cultura quando processada.

Para o preparo do meio de cultura, a planta aquática foi colhida nos tanques de piscicultura do Caunesp, levadas ao laboratório e higienizadas em água corrente. Após esse procedimento foram pesados cerca de 5 kg da planta ainda húmida e levada para secagem. Posteriormente, após a secagem o material foi moído com auxílio de um moinho transformando a biomassa seca da planta em pó. Através da obtenção deste pó, o mesmo foi diluído em água destilada, levado ao fogo durante 1 hora, filtrado com o auxílio de uma malha fina para obtenção apenas do extrato aquoso e o extrato obtido foi autoclavado a 120°C durante 20 minutos. A figura abaixo ilustra a planta *Eichhornia crassipes*, o pó obtido através da moagem, o extrato após fervido e a filtragem do extrato.

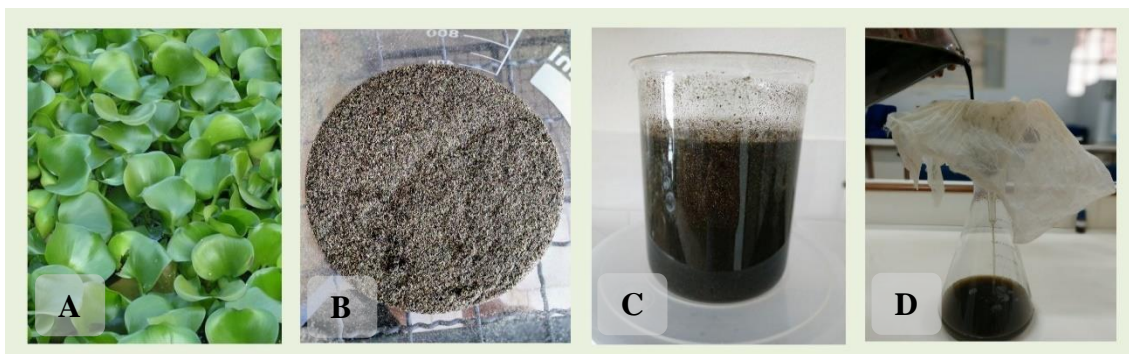


Figura 8. Processos de produção do meio de cultura de macrófita aquática *Eichhornia crassipes* onde: (A) planta aquática, (B) pó obtido após a secagem e moagem da planta aquática, (C) extrato líquido do pó após fervura do material e (D) processo de filtração do extrato.

Todos os meios de cultura utilizados foram previamente esterilizados em autoclave e estocados até o seu uso. A Figura 9 mostra cada meio de cultura utilizado e sua coloração característica.

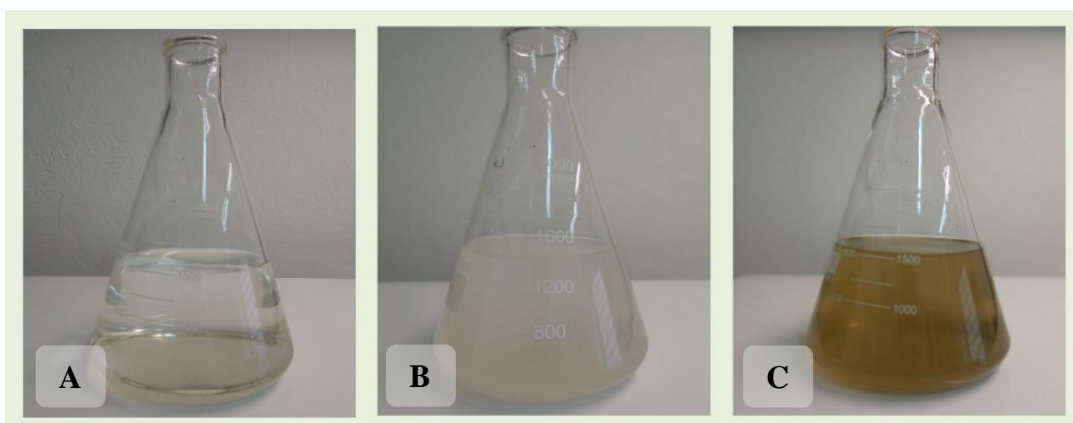


Figura 9. Meios de cultura preparados onde: (A) meio comercial WC, (B) meio de fertilizante inorgânico NPK 10-10-10 e (C) meio a base de macrófita aquática *Eichhornia crassipes*.

Melaço de cana de açúcar (*In natura* e hidrolisado)

O melaço de cana-de-açúcar utilizado nos experimentos foi obtido através da empresa Melaços Brasileiros LTDA (Brasil) com a seguinte composição descrita na Tabela 5. Para os experimentos utilizando apenas o melaço *in natura*

(melaço bruto), o produto foi diluído em concentração conhecida em água destilada e esterilizado em autoclave a 1atm durante 30 minutos.

Tabela 5. Composição e concentrações do melaço de cana de açúcar bruto.

Composição	Concentração
Água (% m/m)	20,48
Cálcio (mg/g)	11455
Cobre (mg/g)	0,004
Ferro (mg/g)	0,071
Fósforo Total (mg/mL)	0,863
Frutose (% m/m)	7,9
Glucose (% m/m)	6,98
Magnésio (mg/g)	3991
Manganês (mg/g)	0,029
Potássio (mg/g)	25572
Sacarose (% m/m)	39,9
Sódio (mg/g)	0,119
Sulfito (mg/g)	2114
Zinco (mg/g)	0,006

Fonte: Laudo obtido do fornecedor.

Para os experimentos utilizando o melaço hidrolisado, o melaço bruto passou por um processo de hidrólise ácida. Neste procedimento, foi adicionado ao melaço bruto 0,4% (m/m) de solução ácida (HCl 3 M) posteriormente, o melaço foi encubado durante 20 minutos a 80°C para que a sacarose tenha sido completamente hidrolisada em glicose e frutose. Após este processo, o melaço hidrolisado foi filtrado com auxílio de bomba a vácuo para retenção de possíveis impurezas e autoclavado a 1atm durante 30 minutos. A figura abaixo mostra o processo de hidrólise do melaço de cana de açúcar.

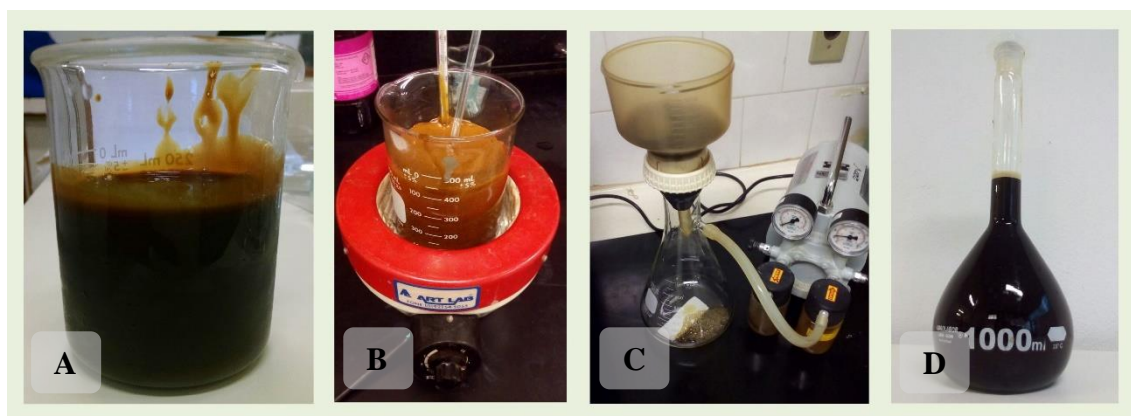


Figura 10. Processo de hidrólise ácida do melaço de cana de açúcar onde: (A) melaço *in natura*, (B) processo de hidrólise, (C) processo de remoção de impurezas e (D) solução de melaço hidrolisado.

Após estes processos e posterior resfriamento das soluções de melaço *in natura* e hidrolisado, as soluções foram adicionadas nos recipientes de cultivo na concentração de $0,75 \text{ g L}^{-1}$, esta concentração foi selecionada através de resultados obtidos em estudos anteriores (Scardoeli-Truzzi e Sipaúba-Tavares, 2017b).

Etapa experimental III: Aplicação da biomassa algal na alimentação de larvas de camarão

Nesta etapa experimental foi avaliado a inclusão da biomassa de *Haematococcus pluvialis* na formulação de uma dieta alimentar para o camarão-da-amazônia *Macrobrachium amazonicum*, substituindo a farinha de peixe pela biomassa algal. Foram estocadas pós-larvas (PLs) recém metamorfoseadas de camarão-da-amazônia (*M. amazonicum*), provenientes da larvicultura realizada no laboratório de Carcinicultura, com densidade de 2 PLs/L em cada ensaio, totalizando 120 PLs por réplica.

O experimento utilizando pós-larvas do camarão-da-amazônia foi conduzido em ambiente “indoor” utilizando tanques de polipropileno com volume útil de 60L, instalados no laboratório. Os tanques foram abastecidos com água previamente filtrada no sistema de recirculação com biofiltros individuais,

aeração constante e termostatos para que a temperatura seja mantida entre 28-30°C.



Figura 11. Montagem do experimento em ambiente “indoor” destacando as caixas de cultivo e sistema de recirculação de água.

Os animais foram alimentados duas vezes ao dia, com dieta formulada peletizada em pó e taxa de arraçoamento de 40% da biomassa, conforme preconizados por Araújo e Valenti, (2005). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) com 4 tratamentos e 4 repetições que divididos em:

- ❖ Tcontrole= Cultivo de PLs de camarão-da-amazônia, alimentadas com ração formulada sem a substituição da farinha de peixe/proteína animal pela biomassa algal de *Haematococcus pluvialis*.
- ❖ T25%= Cultivo de PLs de camarão-da-amazônia, alimentadas com ração formulada na substituição de 25% da farinha de peixe/proteína animal pela biomassa algal de *Haematococcus pluvialis*.
- ❖ T50%= Cultivo de PLs de camarão-da-amazônia alimentadas com ração formulada na substituição de 50% da farinha de peixe/proteína animal pela biomassa algal de *Haematococcus pluvialis*.

❖ T100%= Cultivo de PLs de camarão-da-amazônia alimentadas com ração formulada na substituição de 100% da farinha de peixe/proteína animal pela biomassa algal de *Haematococcus pluvialis*.

Amostras de 50 PLs de camarão-da-amazônia de cada ensaio foram coletadas e pesadas para determinar a massa total (g) com auxílio de balança analítica de precisão 0,1 µg. O comprimento total das PLs foi medido com auxílio de paquímetro digital e para avaliar o desempenho zootécnico do camarão-da-amazônia, foram calculados taxa de sobrevivência, ganho de peso médio, consumo médio de ração, conversão alimentar aparente, taxa de crescimento específico. Os parâmetros físicos e químicos da água (oxigênio dissolvido, temperatura, pH e condutividade) foram monitorados diariamente com auxílio de uma sonda multiparâmetros YSI 556 MPS. Semanalmente, foram mensuradas as concentrações de amônia, nitrito, nitrato e fósforo total dos sistemas de cultivo conforme metodologia descrita no item Métodos analíticos.

Preparo das dietas alimentares

As dietas alimentares foram formuladas isoenergéticas e isoprotéicas sendo produzidas no Departamento de Nutrição do Centro de Aquicultura da UNESP (CAUNESP). Todos os ingredientes que compõe a dieta foram pesados, incluso água e posteriormente, misturados para uniforme homogeneização dos ingredientes.



Figura 12. Ingredientes das dietas alimentares onde: (A) dieta controle, (B) T25%, (C) T50%, (D) T100%.

Após o preparo, as dietas alimentares foram peletizadas com auxílio de um moedor e secas em estufa com circulação de ar durante 24 horas a 50° C.

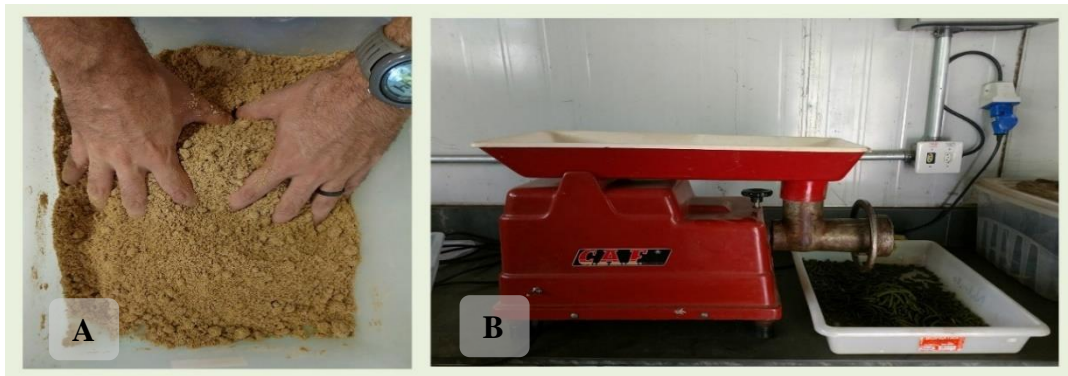


Figura 13. Mistura e homogeneização das dietas alimentares (A) e processo mecânico de peletização (B).

Posteriormente, após a secagem os peletes foram processados em um moedor e o material foi triturado e peneirado para reduzir o tamanho dos grânulos. A granulometria final das dietas alimentares foi de 0,5-1,0 mm.



Figura 14. Dietas alimentares peletizadas após secagem evidenciando as colorações, onde: (A) dieta controle, (B) T25%, (C) T50% e (D) T100%.



Figura 15. Dietas alimentares processadas na granulometria de 0,5-1,0 mm onde: (A) dieta controle, (B) T25%, (C) T50% e (D) T100%.

Métodos analíticos

Características algais

Para determinar o crescimento algal, alíquotas de 1 mL foram removidas diariamente, e, 2x1 µL de sub-amostras foram contadas em hemocitômetro de Neubauer. A taxa de crescimento (k) foi calculada através da fórmula: $k = (3.322/t_2 - t_1 \times \log N_2/N_1)$ (t = tempo; N = número de células; $t_2 - t_1$ = diferença entre o tempo) (Guillard, 1973). Tempo de duplicação (tempo de divisão celular ou tempo de geração) foi calculado a partir dos resultados obtidos da taxa de crescimento, através da fórmula: $T_d = 1/k$ (T_d = tempo de duplicação; $1/k$ = divisão por dia) (Guillard, 1973). Para determinar o peso seco, 10 mL de amostra foram filtrados em filtros previamente pesados (Whatman GF/C), os filtros contendo a biomassa serão secos a uma temperatura de 60°C segundo metodologia proposta por Vollenweider (1974). Para determinar a composição bioquímica, a biomassa da microalga foi concentrada em centrifuga, liofilizada e analisada seguindo a metodologia proposta por AOAC (1990). Clorofila-a foi extraída com álcool 90% e quantificada a 663 e 750nm (Nusch, 1980).

Variáveis da água

As análises de nutrientes realizadas nas etapas experimentais (amônia, nitrito, nitrato e fósforo total) foram quantificadas espectrofotometricamente de acordo com a metodologia descrita em Koroleff (1976) e Golterman et al. (1978). A temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade da água foram mensurados com o auxílio de uma sonda multiparâmetros YSI 556 MPS.

Desempenho zootécnico do camarão

Taxa de Sobrevivência: Porcentagem de indivíduos que sobreviveram até o final do cultivo dado pela equação:

$$S(\%) = \frac{\text{Número final de indivíduos}}{\text{Número inicial de indivíduos}} * 100$$

Ganho de peso médio:

GPM (g) = Peso médio final de cada parcela – peso médio inicial de cada parcela

Consumo médio de ração: quantidade média de ração consumida por cada indivíduo durante o período de cultivo dado pela equação:

$$\text{CRM (g/indivíduos)} = \frac{\text{Consumo médio de ração}}{\text{Número final de indivíduos}}$$

Conversão alimentar aparente: proporção entre o CMR e GPM em cada viveiro, dado pela equação:

$$\text{CAA} = \frac{\text{Quantidade de ração consumida}}{\text{Ganho de peso}}$$

Taxa de crescimento específico: percentual do crescimento diário, dado pela equação:

$$\text{TCE (\%)} = \frac{[\ln(\text{Peso final}) - \ln(\text{Peso inicial})]}{\text{Dias de cultivo}} * 100$$

Análises estatísticas

Os dados algais foram expressos como médias \pm desvio padrão e os experimentos avaliados em triplicata. ANOVA One-way foi aplicada para simples verificação entre as médias das variáveis dos meios de cultura e os fotoperíodos e para comparar diferenças entre a produção máxima de células em ambas etapas (Fowler et al., 1998). Na ocorrência de diferenças entre os resultados foi aplicado o teste de Tukey ao nível de 5% de significância ($p < 0,05$). As amostras do desempenho zootécnico do camarão-da-amazônia e qualidade de água foram submetidas aos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e homocedasticidade pelo teste de Levene. Após passarem por esses pressupostos, as amostras foram submetidas à análise paramétrica ou não-paramétrica pela ANOVA ou teste de Kruskal-Wallis entre os tratamentos. Diferenças entre as médias avaliadas foram submetidas ao teste de Tukey HSD (amostras paramétricas) ou testes de Wilcoxon pareado (amostras não paramétricas). Todas as análises estatísticas destas etapas foram realizadas com auxílio do software Statística 10.0 (StatSoft Inc.).

Referencias

A.O.A.C. Association of official analytical chemists. Official methods of analysis. 15TH. ED., Washington D.C., 1990.

Abdul, S., Duraiarasan, S., Shellomith, A.S.S. Statistical optimization of harvesting *Chlorella vulgaris* using a novel. Biotechnology Reports, v. 7, p. 150-156, 2015.

Abomohra, A.E-F., Jin, W., Tu, R., Han, S-F, Eid, M., Eladel, H. Microalgal biomass production as a sustainable feedstock for biodiesel: Current status and perspectives. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 64, p. 596-606, 2016.

Aburai, N., Ohkubo, S., Miyashita, H., Abe, K. Composition of carotenoids and identification of aerial microalgae isolated from the surface of rocks in mountainous districts of Japan. Algal Research, v. 2, p. 237-243, 2013.

Alcântara, G.L.C., Kato, H.C.A. Good handling practices of fresh shrimp sold in street fairs of Belém, PA, Brazil. Journal of Bioenergy and Food Science, v. 3, p. 139-148, 2016.

Alkhamis, Y., Qin, J.G. Comparison of N and P requirements of *Isochrysis galbana* under phototrophic and mixotrophic conditions. Journal Applied Phycology, v. 27, p. 2231–2238, 2015.

Allewaert, C.C., Vanormelingen, P., Pröschold, T., Gómez, P.I., González, M.A., Bilcke G., D'Hondt, S., Vyverman, W. Species diversity in European *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae, Volvocales). Phycologia, v. 54, p. 583–598, 2015.

Andersen, R.A. Biology and systematics of heterokont and haptophyte algae. American Journal of Botany, v. 91, p. 1508-1522, 2004.

Araujo, M.C., Valenti, W.C. Feeding habit of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* larvae. Aquaculture, v. 265, p.187-193, 2005.

Arbib, Z., Ruiz, J., Álvarez-Díaz, P., Garrido-Pérez, C., Perales, J.A. Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: wastewater tertiary treatment, CO₂ bio-fixation and low cost biofuels production. Water Research, New York, v. 49, p. 465-474, 2014.

Augusto, A., Valenti, W.C. Are there any physiological differences between the male morphotypes of the freshwater shrimp *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Caridea: Palaemonidae). Journal of Crustacean Biology, v. 36, p. 716-723, 2016.

Azma, M., Mohamed, M.S., Mohamad, R., Rahim, R.A., Ariff, A.B. Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, v. 53, p. 187-195, 2011.

Barsanti, L., Coltelli, P., Evangelista, V., Frassanito, A.M., Passarelli, V., Vesentini, N., Gualtieri, P. The world of algae. In: EVANGELISTA, V. et al. (Ed.). *Algal toxins: nature, occurrence, effect and detection*. Piza: Springer/NATO Public Diplomacy Division, p. 1-15, 2008.

Barsanti, L., Gualtieri, P. *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*, Second Edition. Taylor & F ed. Boca Raton: CRC Press, 2014.

Bechtold, T., Mussak, R. Chlorophylls, In:_____. (Ed.). *Handbook of natural colorants*: New Jersey: Jhon Wiley and Sons Ltd, p. 243-254, 2009.

Belettini, F., Derner, R.B., Arana, L.A.V. Utilização das microalgas *Thalassiosira weissflogii* e *Nannochloropsis oculata* no cultivo de *Litopenaeus vannamei* em sistemas de berçários, sem renovação de água. *Atlântica*, v. 33, p. 101-114, 2011.

Benavente-Valdes, J.R., Aguilar, C., Contreras-Esquivel, J.C., Méndez-Zavala, A., Montañez, J. Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in Chlorophyceae species. *Biotechnology Reports*, v. 10, p. 117-125, 2016.

Bentes, B.S., Martinelli, J.M., Souza, L.S., Cavalcante, D.V., Almeida, M.C., Isaac, V.J. Spatial distribution of the amazon river prawn *Macrobrachium Amazonicum* (Heller, 1862) (Decapoda, Caridea, Palaemonidae) in two perennial creeks of an estuary on the northern coast of Brazil (Guajará Bay, Belém, Pará). *Brazilian Journal of Biology*, v. 71, p. 925-935, 2011.

Berchielli-Morais, F.A., Fernandes, J.B.K., Sipaúba-Tavares, L.H. Diets supplemented with microalgal biomass: effects on growth, survival and colouration of ornamental fish *Hyphessobrycon eques* (Steindacher 1882) *Aquaculture Research*, v. 1, p. 3061–3069, 2016.

Borowitzka, M.A., Moheimani, N.R. *Algae for Biofuels and Energy*. 5. ed. London: Springer, 288 p., 2013.

Brennan, L., Owende, P. Biofuels from microalgae – A review of a technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 14, p. 557-577, 2010.

Brown, J.H., New, M.B., Ismael, D. Biology. In: New, M.B.; Valenti, W.C.; Tidwel, J.H., D’Abramo L.R.D., Kutty, M.N. *Freshwater Prawns – Biology and Farming*. Editora Wiley. p. 18-39, 2010.

Buchheim, M.A., Sutherland, D.M., Buchheim, J.A., Wolf, M. The blood alga: phylogeny of *Haematococcus* (Chlorophyceae) inferred from ribosomal RNA gene sequence data. *European Journal of Phycology*, v. 48, p. 318–329, 2013.

Bumbak, F., Cook, S., Zachleder, V., Hauser, S., Kovar, K. Best practices in heterotrophic high-cell density microalgal process: achievements, potential and possible limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 91, p. 31-46, 2011.

Campaña-Torres, A., Martínez-Córdova, L.R., Martínez-Porchas, M., López-Elías, J.A., Porchas-Cornejo, M.A. Productive response of *Nannochloropsis oculata*, cultured in different media and their efficiency as food for the rotifer *Brachionus rotundiformis*. *International Journal of Experimental Botany*, v. 81, p. 45-50, 2012.

Chapman, R.L. Algae: the world's most importante "plants"- na introduction. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 18, 5-12, 2013.

Cheah, W.Y., Show, P.L., Chang, J-S., Ling, T.C., Juan, J.C. Biosequestration of atmospheric CO₂ and flue gas-containing CO₂ by microalgae. *Bioresource Technology*, v.184, p. 190-201, 2015.

Cheirsilp, B., Torpee, S. Enhanced growth and lipid production of microalgae under mixotrophic culture condition: Effect of light intensity, glucose concentration and fed-batch cultivation. *Bioresource Technology*, v. 110, p. 510-516, 2012.

Chekanov, K., Lobakova, E., Selyakh, I., Semenova, L., Sidorov, R., Solovchenko, A. Accumulation of astaxanthin by a new *Haematococcus pluvialis* strain BM1 from the White Sea coastal rocks (Russia). *Marine Drugs*, v. 12, p. 4504–4520, 2014.

Chen, M., Tang, H., Ma, H., Holland, T.C., Ng, K.Y.S., Salley, S.O. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 1649–1655, 2011.

Chen, Y., Vaidyanathan, S. Simultaneous assay of pigments, carbohydrates, proteins and lipids in microalgae. *Analytica Chimica Acta*, v. 776, p. 31-40, 2013.

Chen, Z., Zhang, X., Jiang, Z., Chen, X., He, H., Zhang, X. Light/dark cycle of microalgae cells in raceway ponds: Effects of paddlewheel rotational speeds and baffles instalation. *Bioresource Technology*, v. 219, p. 387-391, 2016.

Cho, D.-H., Ramanan, R., Heo, J., Lee, J., Kim, B.-H., Oh, H.-M., Kim, H.-S. Enhancing microalgal biomass productivity by engineering a microalgal–bacterial community. *Bioresource Technology*, v. 175, p. 578-585, 2015.

Cifuentes, A.S., González, M.A., Vargas, S., Hoeneisen, M., González, N. Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biological Research*, v. 36, p. 343-357, 2003.

Cooper, M.B., Smith, A.G. Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age. *Current Opinion Plant Biology*, v. 26, p. 147-53, 2015.

Cooper, M.B., Smith, A.G. Exploring mutualistic interactions between microalgae and bacteria in the omics age. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 26, p. 147-153, 2015.

De Grave, S. *Macrobrachium amazonicum*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T197634A2494041. 2013. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T197634A2494041.en>. Acessado em janeiro de 2019.

De Grave, S., Ashelby, C. Re-appraisal of the systematic status of selected genera in Palaemoninae (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae). *Zootaxa*, v. 3734, p. 331-344, 2013.

Demirbas, A., Demirbas, M.F. Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Conversion and Management*, v. 52, p. 163-170, 2010.

Diaz, D., Li, Q., Dashwood, R. Caspase-8 and apoptosis-inducing factor mediate a cytochrome c-independent pathway of apoptosis in human colon cancer cells induced by the dietary phytochemical chlorophyllin. *Cancer Research*, v. 63, p. 1254-1261, 2003.

Doucha J., Straka F., Lívanský K., Utilization of flue gas for cultivation of microalgae (*Chlorella* sp.) in an outdoor open thin-layer photobioreactor. *Journal Applied Phycology*, v. 17, p. 403-412, 2005.

Edwards, P. Aquaculture environment interactions: Past, presente and likely future trends. *Aquaculture*, v. 447, p. 2-14, 2015.

Eom, H., Lee, C.G., Jin, E. Gene expression profile analysis in astaxanthin-induced *Haematococcus pluvialis* using a cDNA microarray. *Planta*, v. 223, p. 1231-42, 2006.

Epstein, E., Bloom, A.J. *Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas* 2ª Ed. Londrina, 2006.

Evans, L., Hennige, S.J., Willoughby, N., Adeloye, A.J., Skroblin, M., Gutierrez, T. Effect of organic carbon enrichment on the treatment efficiency of primary

settled wastewater by *Chlorella vulgaris*. *Algal Research*, v. 24, part A, p. 368-377, 2017.

Fábregas, J., Dominguez, A., Regueiro, M., Maseda, A., Otero, A. Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 53, p. 530–535, 2000.

Fahy, E., Cotter, D., Sud, M., Subramaniam, S. Lipid classification, structures and tool. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1811, p. 637-647, 2011.

Figueira, F.D.S., Crizel, T.D.M., Silva, C.R., Salas, M.M. Pão sem glúten enriquecido com a microalga *Spirulina platensis*. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 14, p. 308–316, 2011.

Fowler, J., Cohen, L., Jawis, P. *Practical statistics for field biology*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons. 259 p., 1998.

Gacheva G., Dimitrova P., Pilarski P. New strain *Haematococcus cf. pluvialis* Rozhen-12 - growth, biochemical characteristics and future perspectives. *Genetics and Plant Physiology*, v. 5, p. 29–38, 2015.

Gao, Z.Q., Meng, C.X., Chen, Y.C., Ahmed, F., Mangott, A., Schenk, P.M., Li, Y. Comparison of astaxanthin accumulation and biosynthesis gene expression of three *Haematococcus pluvialis* strains upon salinity stress. *Journal Applied Phycology*, v. 27, p. 1853–1860, 2015.

Glencross, B. Tabrett, S. Irvin, S., Wade, N., Anderson, M., Blyth, D., Smith, D., Coman, G., Preston, N. Analysis of the effect of diet and genotype on protein and energy utilization by the black tiger shrimp, *Penaeus monodon* – why do genetically select shrimp grow faster? *Aquaculture Nutrition*. v. 19, p.128-138, 2013.

Göksan, T., Ak, İ., Kiliç, C. Growth characteristics of the alga *Haematococcus pluvialis* Flotow as affected by nitrogen source, vitamin, light and aeration. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 11, p. 377-383, 2011.

Golterman, H.L., Clymo, R.S., Ohnstad, M.A.M. *Methods for physical and chemical analysis of fresh water*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publication. 213 p. IBP Handbook, no. 8, 1978.

Gómez-Serrano, C., Amaral, M.M.M., Acién, F.G., Escudero, R., Sevilla, J.M.F., Grima, E.M. Utilization of secondary-treated wastewater for the production. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 99, p. 6931–6944, 2015.

Gong, M., Bassi, A. Carotenoids from microalgae: A review of recente developments. *Biotechnology Advances*, v. 34, p. 1396-1412, 2016.

Gong, Y., Jiang, M. Biodiesel production with microalgae as feedstock: from strains to biodiesel. *Biotechnology Letters*, v. 33, p. 1269–1284, 2011.

González, M.A., Cifuentes, A.S., Gómez, P.I. Growth and total carotenoid content of Chilean strains of *Haematococcus pluvialis* Flotow, under laboratory conditions. *Gayana Botánica*, v. 66, p. 58-70, 2009.

Gouveia, L., Rema, P., Pereira, O., Empis, J. Colouring ornamental fish (*Cyprinus carpio* and *Carassius auratus*) with microalgal biomass. *Aquaculture Nutrition*, v. 9, p. 123-129, 2003.

Grobbelaar, J.U. Algal biotechnology: real opportunities for Africa. *South African Journal of Botany*, v. 70, p. 140-144, 2004.

Guillard, R.R.L. Division rates. In Stein JR. *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements*. London: Cambridge University Press. p. 289-311, 1973.

Guillard, R.R.L., Lorenzen, C.J. Yellow-green algae with chlorophyllide. *Journal of Phycology*, v. 8, p. 10-14, 1972.

Gupta, V., Ratha, S.K., Sood, A., Chaudhary, V., Prasanna, R. New insights into the biodiversity and applications of Cyanobacteria (blue-green algae) – Prospects and challenges. *Algal Research*, v. 2, p. 79-97, 2013.

Hata, N., Ogbonna, J. C., Hasegawa, Y., Taroda, H., Tanaka, H. Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture. *Journal Applied Phycology*, v. 13, p. 395–402, 2001.

Hayd, L., Anger, K. Reproductive and morphometric traits of *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda: Palaemonidae) from the Pantanal, Brazil, suggests initial speciation. *Revista de Biología Tropical*, v. 61, p. 39-57, 2013.

He, Q., Yang, H., Hu, C. Culture modes and financial evaluation of two oleaginous microalgae for biodiesel production in desert area with open raceway pond. *Bioresource Technology*, v. 218, p. 571-579, 2016.

Hernández, D., Riaño, B., Coca, M., García-González, M.C. Saccharification of carbohydrates in microalgal biomass by physical, chemical and enzymatic pre-treatments as a previous step for bioethanol production. *Chemical Engineering Journal*, v. 262, p. 939–945, 2015.

Hernandez-Perez, A., Labbe, J.I. Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, v. 49, p. 157-173, 2014.

Hoek, V.D., Mann, D.G., Jahns, H.M. *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 623 p., 1995.

Huang, G., Chen, F., Wei, D., Zhang, X., Chen, G. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*, v. 87, p. 38-46, 2010.

Jankowska, E., Sahu, A. K., Oleskowicz-Popiel, P. Biogas from microalgae: Review on microalgae's cultivation, harvesting and pretreatment for anaerobic digestion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 75, p. 692-709, 2017.

Jiang, Y., Kalodimos, C.G.N.M.R. Studies of large proteins. *Journal of Molecular Biology*, v. 429, p. 2667-2676, 2017.

Ju, Z.Y., Deng, D.F., Dominy, W.G. A defatted microalgae (*Haematococcus pluvialis*) meal as a protein ingredient to partially replace fishmeal in diets of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), Boone, 1931. *Aquaculture*, v. 354–355, p. 50–55, 2012.

Junying, Z., Junfeng, R., Baoning, Z. Factors in mass cultivation of microalgae for biodiesel. *Chinese Journal of Catalysis*, v. 34, p. 80–100, 2013

Kaewpintong, K., Shotipruk, A., Powtongsook, S., Pavasant, P. Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 288-295, 2007.

Khondker, M., Bhuiyan, R.A., Yeasmin, J., Alam, M., Sack, R.B., Huq, A., Colwell, R.R. New records of phytoplankton for Bangladesh. 2. Cryptophyceae, Xanthophyceae and Synurophyceae. *Bangladesh Journal of Botany*, v. 36, p. 53-59, 2007.

Kim, D.-Y., Vijayan, D., Praveenkumar, R., Han, J.-I., Lee, K., Park, J.-Y., Chang, W.-S., Lee, J.-S., Oh, Y.-K. Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*. *Bioresource Technology*, v. 199, p. 300–310, 2016.

Kim, S., Park, J.E., Cho, Y.B., Hwang, S.J. Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresource Technology*, v. 144, p. 8-13, 2013.

Klochkova, T.A., Kwak, M.S., Han, J.W., Motomura, T., Nagasato, C., Kim, G.H. Cold-tolerant strain of *Haematococcus pluvialis* (Haematococcaceae, Chlorophyta) from Blomstrandhalvøya (Svalbard). *Algae*, v. 28, p. 185-192, 2013.

Knuckey, R., Brown, M., Robert, R., Frampton, D. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. *Aquacultural Engineering*, v. 35, p. 200-313, 2006.

Kobayashi, M., Msangi, S., Batka, M., Vannuccini, S., Dey, M.M., Anderson, J.L. Fish to 2030: The role and opportunity for aquaculture. *Aquaculture Economics & Management*, v. 19, p. 282-300, 2015.

Koller, M., Muhr, A., Braunegg, G. Microalgae as versatile cellular factories for valued products. *Algal Research*, v. 6, p. 52-63, 2014.

Koroleff, F. Determination of ammonia. In: Grasshoff, K. (ed.) *Methods of seawater analysis*. German: Verlag Chemie Weinheim, p. 126-133, 1976.

Kumar, K., Dasgupta, C.N., Nayak, B., Lindblad, P., Das, D. Development of suitable photobioreactors for CO₂ sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 4945–4953, 2011.

Kumar, K., Mishra, S.K., Shrivastav, A., Park, M.S., Yang, J-W. Recent trends in the mass cultivation of algae in raceways ponds. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 51, p. 875-885, 2015.

Kuppusamy, P., Soundharajan, I., Srigopalram, S., Yusoff, M.M., Maniam, G.P., Govindan, N., Choi, K.C. Potential pharmaceutical and biomedical applications of Diatoms microalgae - An overview. *Indian Journal of Geo Marine Sciences*, v. 46, p. 663-667, 2017.

Kurd, F., Samavati, V. Water soluble polysaccharides from *Spirulina platensis*: Extraction and in vitro anti-cancer activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 74, p. 498-506, 2015.

Kwietniewska, E., Tys, J., Krzemińska, I., Koziel, W. Microalgae: Cultivation and application of biomass as a source of energy: a review. *Acta Agrophysica Monographiae*, n. 2, p. 1-108, 2012.

Lam, M.K., Lee, K.T. Microalgae biofuels: a critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology Advances*, v. 30, p. 673-690, 2012.

Lee Y.K. Heterotrophic carbon nutrition. In: *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* (ed A. Richmond), Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK, 116-124, 2004.

Lee, Y.K. *Microalgae Cultivation Fundamentals*. In: Bux, F.; Chisti, Y. (eds.) *Algae Biotechnology: Products and Processes*. Cham Switzerland: Springer, p. 1-19. 2016.

Lemes, A.C., Takeuchi, K.P., De Carvalho, J.C.M., Danesi, E.D.G. Fresh pasta production enriched with *Spirulina platensis* biomass. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 55, p. 741-750, 2012.

Lin, Q., Lin, J. Effects of nitrogen source and concentration on biomass and oil production of a *Scenedesmus rubescens* like microalga. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 1615-1621, 2011.

Liu, J., Song, Y., Qiu, W. Oleaginous microalgae *Nannochloropsis* as a new model for biofuel production: Review & analysis. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 72, p. 154-162, 2017.

Lourenço, S.O. Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, 606 p., 2006.

Macias-Sancho, J., Poersch, L.H., Bauer, W., Romano, L.A., Wasielesky, W., Tesser, M.B. Fishmeal substitution with *Arthrospira* (*Spirulina platensis*) in a practical diet for *Litopenaeus vannamei*: effects on growth and immunological parameters. *Aquaculture*, v. 426, p. 120-125, 2014.

Maciel, C.R., Valenti, W.C. Biology, fisheries and aquaculture of the Amazon River Prawn *Macrobrachium amazonicum*: a review. *Nauplius*, v. 17, p. 61-79, 2009.

Magalhães, C., Robles, R., Souza-Carvalho, E., Carvalho, F., Malta, J. C., Mantelatto, F. Annotated checklist of parasitic and decapod crustaceans from the middle and lower Xingu (Amazon Basin) above and below the Belo Monte dam complex, Pará State, Brazil. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia*, v. 166, p. 1-34, 2018.

Margulis, L., Schwartz, K.V. Cinco Reinos. Um Guia Ilustrado dos Filos da Vida na Terra. 3ª ed. Guanabara-Koogan, RJ, 497 p., 2001.

Mariano, A.B., Ramos, L.P., Vargas, J.V.C, Pullian, R., Balmant, W., Morais, K.C.C., Dzuman, M.J., Arantes, A.C.C. Comparação de meios de cultivo autotróficos, mixotróficos e heterotróficos para produção de biomassa de microalga com foco em biocombustíveis e coprodutos. In: 5º Congresso Internacional de Bioenergia, 2009, Curitiba. 5º Congresso Internacional de Bioenergia; 1º Congresso Brasileiro de Geração Distribuída e Energias Renováveis, 2010.

Masojídek, J., Koblížek, M., Torzillo, G. Photosynthesis in Microalgae. In: Richmond, A. (ed.) *Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science, p. 20-39, 2004.

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

Mazard, S., Penesyan, A., Ostrowski, M., Paulsen, I.T., Egan, S. Tiny microbes with a big impact: the role of Cyanobacteria and their metabolites in shaping our future. *Marine Drugs*, v. 14, p. 97-116, 2016.

Miao, M., Yao, X., Shu, L., Yan, Y., Wang, Z., Li, N., Cui, X., Lin, Y., Kong, Q. International biodeterioration & biodegradation Mixotrophic growth and

biochemical analysis of *Chlorella vulgaris* cultivated with synthetic domestic wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 113, p. 120-125, 2016.

Mitra, D., Leeuwen, J.H., Lamsal, B. Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. *Algal Research*, v. 1, p. 40-48, 2012.

Mondal, M., Ghosh, A., Tiwari, O.N., Gayen, K., Das, P., Mandal, M.K., Halder, G. Influence of carbon sources and light intensity on biomass and lipid production of *Chlorella sorokiniana* BTA 9031 isolated from coalfield under various nutritional modes. *Energy Conversion and Management*, v. 145, p. 247–254, 2017.

Montoya-Martínez, C., Nolasco-Soria, H., Carrillo-Farnés, O., Civera-Cerecedo, R., Álvarez-González, C., Vega-Villasante, F. Chemical score of different protein sources to four *Macrobrachium* species. *Latin American Journal of Aquatic Research*, v. 44, p. 835–844, 2016.

Munoz, R., Guieysse, B. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review. *Water Research*, v. 40, p. 2799–2815, 2006.

Mussgnug, J.H., Klassen, V., Schlüter, A., Kruse, O. Microalgae as substrates for fermentative biogas production in a combined biorefinery concept. *Journal of Biotechnology*, v. 150, n. 1, p. 51–56, 2010.

Nakada T, Ota S. What is the correct name for the type of *Haematococcus* Flot. (Volvocales, Chlorophyceae)? *Taxon*, v. 65, p. 343–348, 2016.

Nasir, T. Treatment of African catfish, *Clarias gariepinus* wastewater utilizing phytoremediation of microalgae, *Chlorella* sp. with *Aspergillus niger* bio-harvesting. *Bioresource Technology*, v. 190, p.492-498. 2015.

Neckel, A., Goellner, E., Bertoldi, T. The efficiency in the treatment of effluente bullets industry with sludge modification in anaerobic. *Reget*, v. 20, p. 427-437, 2016.

Neofotis, P., Huang, A., Sury, K., Chang, W., Joseph, F., Gabr, A., Twary, S., Qiu, W., Holguin, O., Polle, J.E.W. Characterization and classification of highly productive microalgae strains discovered for biofuel and bioproduct generation. *Algal Research*, v. 15, p. 164-178, 2016.

New, M.B., Valenti, W.C., Tidwel, J.H., D’Abramo L.R.D., Kutty, M.N. *Freshwater Prawns – Biology and Farming*. Editora Wiley, 544p, 2010.

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

Ota, S., Morita, A., Ohnuki, S., Hirata, A., Sekida, S., Okuda, K., Ohya, Y., Kawano, S. Carotenoid dynamics and lipid droplet containing astaxanthin in response to light in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Scientific Reports*, v. 8, p. 1-10, 2018.

Panis, G., Carreon, J.R. Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: a microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. *Algal Research*, v. 18, p. 175–190, 2016.

Pentecost, A. Phylum Chlorophyta. Order Volvocales. In: *The freshwater algal flora of the British Isles. An identification guide to freshwater and terrestrial algae*. Second edition. (John, D.M., Whitton, B.A. & Brook, A.J. Eds), pp. 381-409. Cambridge: Cambridge University Press, 2011.

Pérez-García, O., Escalante, F.M.E., De-Bashan, L.E., Bashan, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Research*, v. 45, p.11-36, 2011.

Pérez-López, P., González-García, S., Jeffryes, C., Agathos, S.N., McHugh, E., Walsh, D., Murray, P., Moane, S., Feijoo, G., Moreira, M.T. Life-cycle assessment of the production of the red antioxidant carotenoid astaxanthin by microalgae: from lab to pilot scale. *Journal of Cleaner Production*, v. 64, p. 332–344, 2014.

Pezzato, L.E., Barros, M.M., Sampaio, F.G., Falcon, D.R., Gonçalves, G.S., Hisano, H. Relação energia: proteína dietária para pós-larvas de *Macrobrachium amazonicum* (Crustacea, Decapoda). *Acta Scientiarum. Animal Sciences*. v. 25, p 235-241, 2003.

Pimentel, F.R., Magalhães, C. Palaemonidae, Euryrhynchidae, and Sergestidae (Crustacea: Decapoda): Records of native species from the states of Amapá and Pará, Brazil, with maps of geographic distribution. *Journal of species lists and distribution. Check List*, v. 10, p. 1300-1315, 2014.

Ponce, C.J.C., Pérez, O., Hernández, M.R., Torres, P.V., Juárez, M.A. Protective effects of *Spirulina maxima* on hyperlipidemia and oxidative-stress induced by lead acetate in the liver and kidney. *Lipids in Health and Disease*, v. 9, p. 35, 2010.

Pulz, O., Gross, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 65, p. 635-648, 2004.

Ramos, A.S., Pereira, L.J.G., Cintra, I.H.A., Bentes, B.S. Etnoconhecimento de pescadores artesanais de *Macrobrachium rosenbergii* em campos alagados de uma região Amazônica-Brasil. *Acta of Fisheries and Aquatic Resources*, v. 4, p. 93-105, 2016.

Rashid, N., Rehmanb, M.S.U., Sadiqd, M., Mahmood, T., Hanb, J. Current status, issues and developments in microalgae derived biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 40, p. 760-778, 2014.

Raven, J.A., Beardall, J. Dark respiration and organic carbon loss. In: Borowitzka, M.A., Beardall, J., Raven, J.A. (eds.) *The Physiology of Microalgae*. 1. ed. Cham Switzerland: Springer, p. 129-142, 2016.

Rawat, I., Kumar, R.R., Mutanda, T., Bux, F. Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production. *Applied Energy*, v. 103, p. 444-467, 2013.

Reviere, B. *Biologia e filogenia das algas*. Artmed. 280p. 2006.

Reviere, B. Natureza e posição das algas na árvore filogenética do mundo vivo. In: Franceschini, I.M (Ed.). *Algas: uma abordagem filogenética, taxonômica e ecológica*. Porto Alegre: Artmed, p.19-57, 2010.

Richards R.G., Mullins B.J. Using microalgae for combined lipid production and heavy metal removal from leachate. *Ecological Modelling*, v. 249, p. 59- 67, 2013.

Rodríguez de Marco, E., Steffolani, M.E., Martínez, C.S., León, A.E. Effects of *Spirulina* biomass on the technological and nutritional quality of bread wheat pasta. *LWT - Food Science and Technology*, v. 58, p. 102–108, 2014.

Roy, S.S, Pal, R. Microalgae in aquaculture: A review with special references to nutritional value and fish diets. *Zoological society*, v. 68, p. 1- 8. 2015.

Sahu, A., Sahoo, S.K., Giri, S.S. Efficacy of water hyacinth compost in nursery ponds for larval rearing of Indian mayar carp, *Labeo rohita*. *Bioresource of Technology*, v. 85, p. 309-311, 2002.

Salam, K.A., Velasquez-Orta, S.B., Harvey, A.P. A sustainable integrated in situ transesterification of microalgae for biodiesel production and associated co-products: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 65, p. 1179-1198, 2016.

Sankar, V., Daniel, D.K., Krastanov, A. Carbon dioxide fixation by *Chlorella minutissima* batch cultures in a stirred tank bioreactor. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, v. 25, p. 2468–2476, 2011.

Sarker, P.K., Kapuscinski, A.R., Lanois, A.J., Livesey, E.D., Bernhard, K.P., Coley, M.L. Towards sustainable aquafeeds: Complete substitution of fish oil with marine microalga *Schizochytrium* sp. improves growth and fatty acid deposition in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) *PLoS ONE*, v. 11, p. 1-17, 2016.

Scardoeli-Truzzi, B., Sipaúba-Tavares, L. H. Sources of inorganic fertilizer in the growth of *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae). *Journal of Algal Biomass Utilization*, v. 8, p. 1-10, 2017a.

Scardoeli-Truzzi, B., Sipaúba-Tavares, L.H. Response of microalga *Haematococcus pluvialis* growing in phototrophic and mixotrophic culture under alternative source of carbon and media. *PHYKOS*, v. 47, p. 39-46, 2017b.

Schmitz, R., Magro, C.D., Colla, L.M. Environmental applications of microalgae. *Revista Ciatic*, v. 4, p. 48-60, 2012.

Shah, M.M., Liang, Y., Cheng, J.J., Daroch, M. Astaxanthin producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, p. 1-28, 2016.

Shannon, E., Abu-Ghannam, N. Antibacterial derivatives of marine algae: An overview of pharmacological mechanisms and applications. *Marine Drugs*, v. 14, p. 1-23 2016.

Shen, X., Liu, J. Chauhan, A.S., Hu, H., Ma, L., Lam, P.K.S., Zeng, R.J. Combining nitrogen starvation with sufficient phosphorus supply for enhanced biodiesel productivity of *Chlorella vulgaris* fed on acetate. *Algal Research*, v. 17, p. 261-267, 2016.

Sheng, B. Fan, F., Huang, J., Bai, W., Wang, J., Li, S., Li, W., Wan, W., Li, Y. Investigation on models for light distribution of *Haematococcus pluvialis* During astaxanthin accumulation stage with an application case. *Algal Research*, v. 33, p. 182-182, 2018.

Shimamatsu H. Mass production of *Spirulina*, an edible microalga. *Hydrobiologia*, v. 512, p. 39–44, 2004.

Singh, N., Dhar, D. Microalgae as second generation biofuel. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, v. 31, n. 4, p. 605-629, 2011.

Singh, P., Gupta, S.K., Guldhe, A., Rawat, I. Bux, F. Chapter 4–Microalgae Isolation and Basic Culturing Techniques A2–Kim, Se-Kwon. *Handbook of Marine Microalgae*. Boston: Academic Press, 2015.

Sipaúba-Tavares, L.H., Pelicioni, L.C., Olivera, A. Use of inorganic (NPK) and the CHU₁₂ medium for cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) in laboratory. *Brazilian Journal of Ecology*, v. 1, p. 10-15, 1999.

Sipaúba-Tavares, L.H., Bachion, M.A., Braga, F.M.S. Effects of food quality on the growth and biochemical composition of calanoid copepod, *Argyrodiaptomus furcatus*, as a natural food source for two tropical fish larvae. *Hydrobiologia*, v. 453, p. 393-401, 2001.

Sipaúba-Tavares, L.H., Rocha, O. Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos. Rima, São Carlos, 106 p. 2001.

Sipaúba-Tavares, L.H., Bachion, M.A. Population growth and development of two species of cladocera, *Moina micrura* and *Diaphanosoma birgei*, in laboratory. Brazilian Journal of Biology, v. 62, p. 701-711, 2002.

Sipaúba-Tavares, L.H., Braga, F.M.S. Feeding activity of *Colossoma macropomum* larvae (tambaqui) in fish pond with water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) fertilizer. Brazilian Journal of Biology, v. 67, p. 454-466, 2007.

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

Sipaúba-Tavares, L.H., Ibarra, L.C., Fioresi, T.B. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (REISCH) Korsikov (Chlorophyceae) em laboratório utilizando meio CHU₁₂ e de macrófita com NPK. Boletim do Instituto de Pesca, v. 35, p.111-118, 2009.

Sipaúba-Tavares, L.H., Millan, R.N., Berchielli-Morais, F.A., Braga, F.M.S. Use of alternative media and different types of recipients in a laboratory culture of *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korsikov (Chlorophyceae). Acta Scientiarum Biological Sciences, v. 33, p. 427-253, 2011.

Sipaúba-Tavares, L.H., Millan, R.N., Berchielli-Moaris, F.A. Effects of some parameters in upscale culture of *Haematococcus pluvialis* Flotow. Brazilian Journal of Biology, v. 73, p. 585-591, 2013.

Sipaúba-Tavares, L. H., Scardoeli-Truzzi, B., Berchielli-Morais, F.A. Growth and development time of subtropical Cladocera *Diaphanosoma birgei* Korinek, 1981 fed with different microalgal diets. Brazilian Journal of Biology, v. 74, p. 464-471, 2014.

Sipaúba-Tavares, L.H., Berchielli-Morais, F.A., Scardoeli-Truzzi, B. Growth of *Haematococcus pluvialis* Flotow in alternative media. Brazilian Journal of Biology, v. 75, p. 796-803, 2015.

Sipaúba-Tavares, L.H., Segali, A.M.D.L., Berchielli-Morais, F.A., Scardoeli-Truzzi, B. Development of low-cost culture media for *Ankistrodesmus gracilis* based on inorganic fertilizer and macrophyte. Acta Limnológica Brasiliensia, v. 29, p. 1-9, 2017.

Sipaúba-Tavares, L.H., Florêncio, T., Scardoeli-Truzzi, B. Aquaculture biological waste as culture medium to cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* (Reinsch) Korshikov. Brazilian Journal Of Biology, v. 78, p. 579-587, 2018.

Solovchenko, A.E. Recent breakthroughs in the biology of astaxanthin accumulation by microalgal cell. *Photosynthesis Research*, v. 125, p. 437–449, 2015.

Su, Y., Song, K., Zhang, P., Su, Y, Cheng, J., Chen, X. Progress of microalgae biofuel's commercialization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 74, p. 402-411, 2017.

Subramanian, G., Yadav, G., Sen, R. Rationally leveraging mixotrophic growth of microalgae in different photobioreactor configurations for reducing the carbon footprint of an algal biorefinery: a techno-economic perspective. *RSC Adv.* 6, 72897, 2016.

Sun, H., Kong, Q., Geng, Z., Duan, L., Yang, M., Guan, B. Enhancement of cell biomass and cell activity of astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, v. 186, p. 67–73, 2015.

Sundarrajan, P., Gopinath, K.P., Greetham, D., Antonysamy, A.J. A review on cleaner production of biofuel feedstock from integrated CO₂ sequestration and wastewater treatment system. *Journal of Cleaner Production*, v. 210, p. 445-458, 2019.

Sutherland, D.L., Howard-Williams, C., Turnbull, M.H., Broady, P.A., Craggs, R.J. The effects of CO₂ addition along a pH gradient on wastewater microalgal photo-physiology, biomass production and nutrient removal. *Water research*, v. 70, p. 9-26, 2015.

Sydney, E.B., Da Silva, T.E., Tokarski, A., Novak, A.C., De Carvalho, J.C., Woiciechowski, A.L., Larroche, C., Soccol, C.R. Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. *Applied Energy*, v. 88, p.3291-3294, 2011.

Takache, H., Pruvost, J., Marec, H. Investigation of light/dark cycles effects on the photosynthetic growth of *Chlamydomonas reinhardtii* in conditions representative of photobioreactor cultivation. *Algal Res.* 8, 192–204, 2015.

Tripathi, R., Singh, J., Thakur, I.S. Characterization of microalga *Scenedesmus* sp. ISTGA1 for potential CO₂ sequestration and biodiesel production. *Renewable Energy*, v. 74, p. 774-781, 2015.

Valenti, W.C., Hayd, L.A., Vetorelli, M.P., Martins, M.I.E.G. Economic Analysis Of Amazon River Prawn Farming To The Markets For Live Bait And Juveniles In Pantanal, Brazil. *Boletim do Instituto de Pesca*, v. 37, p. 165 – 176, 2011.

Varfolomeev, S.D., Wasserman, L.A. Microalgae as source of biofuel, food, fodder and medicines. *Applied Biochemistry and Microbiology*, Oxford, v. 47, p. 789-807, 2011.

Velasquez-Orta, S.B., Lee, J.G.M., Harvey, A.P. Evaluation of FAME production from wet marine and freshwater microalgae by in situ transesterification. *Biochemical Engineering Journal*, v. 76, p. 83–89, 2013.

Viegas, C.V., Hachemi, I., Maki-Arvela, P., Smeds, A., Aho, A., Freitas, S.P., Gorgonio, C.M.D., Carbonetti, G., Peurla, M., Paranko, J., Kumar, N., Aranda, D.A.G., Murzin, D.Y. Algal products beyond lipids: Comprehensive characterization of different products in direct saponification of green alga *Chlorella* sp. *Algal research*, 11, 156-164, 2015.

Vollenweider, R.A. A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 225 p. IBP, Handbook no. 12, 1974.

Wágner, D.S., Valverde-Pérez, B., Plósz, B.G., 2018. Light attenuation in photobioreactors and algal pigmentation under different growth conditions – Model identification and complexity assessment. *Algal Research*, v. 35, p. 488-499.

Walker, D.A. Biofuels, facts, fantasy, and feasibility. *Journal Applied Phycology*, v. 21, p. 509-517, 2009.

Wayama M., Ota S., Matsuura H., Nango N., Hirata A., Kawano S. Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *PLoS ONE*, v. 8, e53618, 2013.

Wilhelm, C., Jakob, T. From photons to biomass and biofuels: evaluation of different strategies for the improvement of algal biotechnology based on comparative energy balances. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 92, p. 909–919, 2011.

Willows, R.D., Li, Y., Scheer, H., Chen, M. Structure of chlorophyll f. *Organic Letters*, v. 15, p.1588-1590, 2013.

Wojciechowski, J., Straube, A., Cavalcante, K.P., Miranda, F.E. Isolamento e cultivo de microalgas. [S.l.: s.n.], 2013.

Wu, Z., Shi, X. Optimization for high-density cultivation of heterotrophic *Chlorella* based on a hybrid neural network model. *Letters in Applied Microbiology*, v. 44, p. 13-18, 2007.

Xia, L., Ge, H., Zhou, X., Zhang, D., Hu, C. Photoautotrophic outdoor two-stage cultivation for oleaginous microalgae *Scenedesmus obtusus* XJ-15. *Bioresource Technology*, v. 144, p. 261-267, 2013.

Yoo, C., Jun, S.Y., Lee, J.Y., Ahn, C.Y., Oh, H.M. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 71-74, 2010.

Yoo, J.J., Choi, S.P., Kim, B.W., Sim, S.J. Optimal design of scalable photobioreactor for phototropic culturing of *Haematococcus pluvialis*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 35, p. 309–315, 2012.

Zamalloa, C., Vulsteke, E., Albrecht, J., Verstraete, W. The techno-economic potential of renewable energy through the anaerobic digestion of microalgae. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 1149-1158, 2011.

Zeller, M.A., Hunt, R., Jones, A., Sharma, S. Bioplastics and their thermoplastic blends from *Spirulina* and *Chlorella* microalgae. *Journal Of Applied Polymer Science*, v. 130, n. 5, p.3263 -3275, 14 jun. 2013

Zeng, X., Danquah, M.K., Chena, X.D., Lu, Y. Microalgae bioengineering: from CO₂ fixation to biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 15, p. 3252– 3260, 2011.

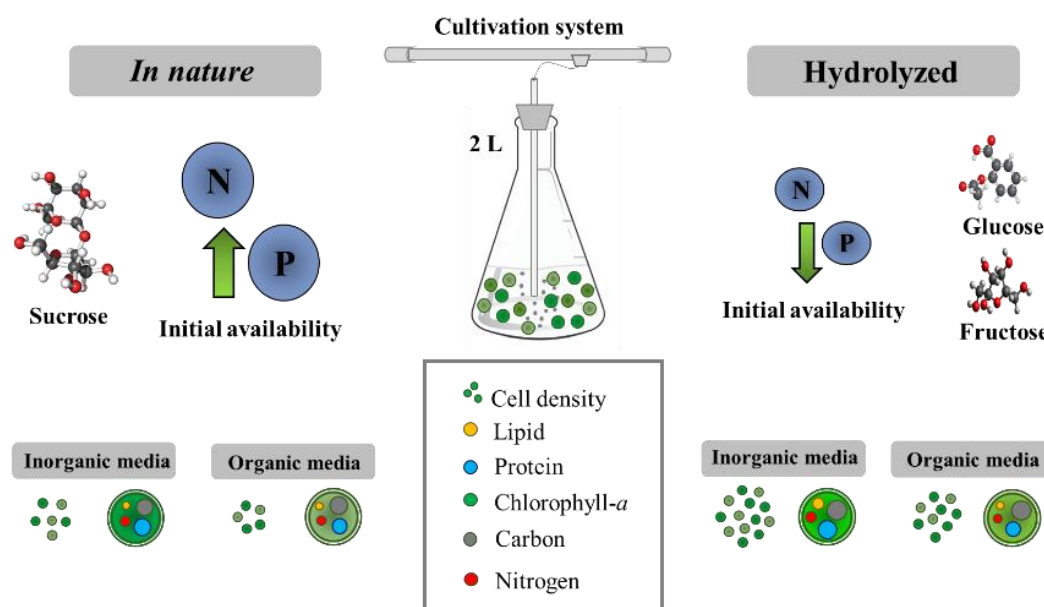
Zhao, B., Zhang, Y., Xiong, K., Zhang, Z., Hao, X., Liu, T. Effect of cultivation mode on microalgal growth and CO₂ Fixation. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 89, p. 1758-1762, 2011.

Capítulo II

*Artigo formatado nas normas da revista *Biorresource Technology*

Effects of hydrolyzed molasses on the performance of microalgae *Haematococcus pluvialis* in inorganic and organic culture medium

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

Current study discusses whether hydrolysis of sugarcane molasses increases growth while maintaining biomass quality. Sugarcane molasses was used as a carbon source for cell growth and for the production of high value compounds of *Haematococcus pluvialis*. Hydrolysis converts sucrose into sugar, such as glucose and fructose, making its availability easier. When hydrolyzed molasses are compared to molasses *in natura*, they increase by approximately 67% and 36% maximum cell density in inorganic and organic medium, respectively. Hydrolysis of molasses slightly reduced the initial availability of phosphorus and nitrogen in the culture system, albeit maintained at levels necessary for the development of *H. pluvialis*. Chemical composition showed that proteins and carbon comprise the major fractions of the biomass of the *H. pluvialis* strain. The mixotrophic culture mode with molasses is a viable alternative in the development of *H. pluvialis* and the hydrolysis of molasses provides highest cell density for microalgae.

Keywords: Alternative carbon source, mixotrophic culture, biomass

Introduction

Although several microalgae species may naturally grow in a mixotrophic culture mode, few species adapt themselves to this culture mode in the laboratory. The species *Nannochloropsis* sp., *C. protothecoides*, *Chlorella vulgaris* and microalga *Haematococcus pluvialis* may be underscored (Abreu et al., 2012; Liang et al., 2009; Pang and Chen, 2017). The freshwater green microalga *Haematococcus pluvialis* has relevant biotechnological interest since it is the greatest natural producer of astaxanthin. The carotenoid is the product with the highest value derived from microalgae (Panis and Carreon, 2016).

When cultivated in the photoautotrophic mode, the growth of several microalga species is limited. Consequently, the mixotrophic mode is suggested since it employs light and chemical energy to increase biomass concentration (Mondal et al., 2017). Mixotrophic culture is a type of culture in which the microalga develops simultaneously within the heterotrophic and autotrophic modes. Inorganic carbon is fixed through photosynthetic processes in light, whilst organic carbon is assimilated for the production of energy and metabolites (Subhash et al., 2017).

Glycerol and glucose are normally added as organic carbon sources since they are highly efficient in production increase in cultures under mixotrophic conditions. However, they are very expensive, with approximately 80% of total costs of culture medium (Abreu et al., 2012, Yee, 2015). Several recent studies have focused on low-cost carbon sources, such as industrial dairy waste (Abreu et al., 2012), sugarcane vinasse (Santana et al., 2017), beet molasses (Piasecka et al., 2017) and others.

The use of molasses *in natura* as carbon source is actually low cost in the cultivation of microalgae in mixotrophic conditions (Mondal et al., 2017). However, several methods that may increase the availability of the substrate and making easier its assimilation may enhance algae growth and development (Liu et al., 2013). The hydrolysis of molasses increases reducing sugar concentrations by converting sucrose in glucose and fructose (Yan et al., 2011). Several studies have shown that pretreatment of molasses increases the efficiency of the compound and it is an adequate carbon source for the development of several microorganisms (Jiang et al., 2009; Liu et al., 2008).

This work aims to evaluate acid hydrolysis in sugarcane molasses as pretreatment, reducing impurities, increasing the availability of reducing sugars, making easier their assimilation, improving the growth of microalgae *H. pluvialis* and confirm the efficiency of molasses hydrolysis. Current study may also be used to decrease the costs of carbon conventional sources in mixotrophic culture and to obtain commercially interesting compounds.

2. Materials and Methods

2.1. Microalga strain and culture conditions

Green microalgae *Haematococcus pluvialis* (CMEA 227 C1) was obtained from the culture collection of the Biology Department of the Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. The microalga strain was cultivated in phototrophic conditions in WC medium (Guillard and Lorenzen, 1972) in a batch-cultured system at $22\pm 1^\circ\text{C}$, with continuous light intensity of about $30\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ from daylight fluorescent tubes. Alga strain was pre-cultured in 250 mL flasks at a microalga density of $1 \times 10^5\ \text{cells.mL}^{-1}$ in WC media. Approximately 280 mL of the culture was transferred to 2 L flasks. When cultures reached the exponential phase (14 days), the algae were used for inoculation, with approximately 20% of total volume in each experiment. Only green cells were used as inoculums for the experiment.

2.2. Experiment design

Microalgae was cultivated in mixotrophic conditions during 28 days in 2 L flasks, with continuous air bubbling. All experiments were conducted in triplicate. Two culture media were used, or rather, an inorganic source (inorganic fertilizer NPK) (Sipaúba-Tavares et al., 1999) and an organic source (macrophyte medium) (Sipaúba-Tavares et al., 2009). The choice of NPK culture medium at 10:10:10 was based on previous studies on highest cell densities (Scardoeli-Truzzi and Sipaúba-Tavares, 2017). Approximately $50\ \text{g L}^{-1}$ of inorganic fertilizer were dissolved and added to 1L of distilled water to produce the inorganic medium, with 40 mL of the medium in each flask. The organic medium was retrieved from the aquatic plant *Eichhornia crassipes*. Approximately 5 kg of the plant's biomass were ground and boiled in distilled water for one hour; the hot

extract was filtered and 70 mL of the medium were used in each flask. All media were autoclaved prior to use and transferred to Erlenmeyer flasks under aseptic conditions. Sugarcane molasses were used as a carbon source for mixotrophic conditions, in *in natura* and in hydrolyzed forms. Approximately 0.75g L⁻¹ of molasses were added to each culture flask, coupled to vitamin B₁₂ complex at 0.02 g L⁻¹, plus biotin (0.01 mg L⁻¹).

2.3. Composition and hydrolysis of molasses

Sugarcane molasses, 82.62°BX and pH 5.9, were obtained from Brazilian Molasses Ltda (Brazil). Sugarcane molasses contain 20% water, 8% fructose, 7% glucose and metal ions, such as calcium, potassium, sodium, iron, magnesium, copper, and others. In experiments with molasses *in natura*, crude molasses were diluted in distilled water. In the case of experiments with hydrolyzed molasses, 0.4% (w/w) of acid solution (3M HCl) were added to the crude molasses, incubated for 20 minutes at 80°C so that sucrose may be completely hydrolyzed to glucose and fructose. Subsequently, the hydrolyzed molasses were filtered in Whatman filter paper (diam. 47mm and 0.5 mm pore) using a vacuum pump to retain impurities. All molasses were autoclaved at 1 atm, for 30 minutes, and the solutions was subsequently used in assays for mixotrophic culture.

2.4. Cell growth, biochemical and chemical parameters

Cell density was monitored during 28 days and 1 mL aliquots were daily removed from the microalga culture in triplicate. A minimum of 2 x 1 μL⁻¹ sub-sample was used for cell quantification with a Neubauer hemocytometer. Specific growth rate and doubling time were obtained according to Guillard (1973), where specific growth rate (k, divisions per day) was calculated as follows:

$$k = (3.322/t_2-t_1 \times \log N_2/N_1) \quad (1)$$

where, N₂ and N₁ are the number of cells on days t₂ and t₁, respectively. Doubling time (cell division time or generation time) was calculated from results obtained from specific growth rate, with the formula:

$$Dt = 1k^{-1} \quad (2)$$

Dry cell weight was measured weekly by sample filtration using 0.45- μm glass fiber filters, following Vollenweider (1974). Chlorophyll-*a* was collected weekly and extracted with alcohol 90% and quantified at 663 and 750 nm (Nusch, 1980). Dissolved oxygen, pH and conductivity were measured with a multiparameter probe YSI 556 MPS. Lipid contents, intracellular protein, nitrogen and carbon sample of microalga culture were collected at the beginning and end of each experiment for the analysis of the nutrients in the aquatic medium. Total phosphorous (TP) and total nitrogen (TN) were quantified by spectrophotometer, following Golterman et al. (1978) and Koroleff (1976). Total lipid contents were extracted with petroleum ether and quantified by a gravimeter (AOAC, 2012). Intracellular protein contents of the microalgae were measured according to intracellular total nitrogen content and intracellular carbon by Dumas combustion method, supplied by Leco (CN628).

2.5. Statistical analysis

All experiments were done in triplicate. Average rates and standard deviations (SD) were calculated and the results were shown in mean \pm SD. Significant differences were determined by analysis of variance (One-way ANOVA), with Statistica 10. Tukey's test was applied when differences ($p < 0.05$) between conditions occurred.

3. Results and discussion

3.1. Effects of hydrolyzed molasses on the physiological response of *H. pluvialis* and culture conditions

Mixotrophic cultures of *Haematococcus pluvialis* were compared by employing *in natura* and hydrolyzed molasses as organic carbon sources to confirm the necessity of molasses hydrolysis. Hydrolysis of molasses significantly affected the growth of *H. pluvialis* under culture in inorganic and organic media. Cell density of *H. pluvialis* grown in hydrolyzed molasses was significantly higher than in *in natura* molasses (Fig. 1). Maximum cell density reached 4.06×10^5 cells mL^{-1} obtained on the 21th day of culture and 2.40×10^5 cells mL^{-1} obtained on the 17th day of culture in inorganic and organic media, respectively (Table 2). Results in hydrolyzed molasses suggest that decrease of sucrose in glucose and fructose

makes easier the assimilation of these carbon sources. Organic carbon and light act as energy sources and may be simultaneously assimilated for ATP and NADPH production, increasing algal growth (Pang and Chen, 2017). Further, high fructose concentrations in the hydrolysis of molasses may have affected high cell density since the carbon source is also adequate for algal growth (Gao et al., 2010).

Hydrolysis increased maximum cell density by 67% and 36% when cultivated respectively in inorganic and organic media when compared to molasses *in natura*. Liu et al. (2013) doubled biomass productivity by pretreating molasses prior to its use in *Chlorella zofingiensis* culture. In fact, *in natura* molasses contains amounts of metal ions, salt and impurities that contribute towards growth inhibition (Jiang et al., 2009). Consequently, molasses pre-treatment is required to make available the carbon source by reducing impurities and foregrounding optimal growth.

Growth rate and doubling time are related to species and nutrient availability. The choice of a specific culture medium may increase or reduce these rates (SundarRajan et al., 2019). Table 2 shows specific growth rate and doubling time of *H. pluvialis*. Hydrolyzed molasses had no significant effect on these parameters, since 0.17 (k) and 5.6 - 5.9 days were required for culture conditions and medium. Results were higher than rates by Nahidian et al. (2018) who obtained 0.13 – 0.15 growth rate in culture media rich in phosphorus and nitrogen during autotrophic culture of *H. pluvialis*. High growth rates were due to the flexibility of mixotrophic culture in which microalga growth increases in the presence of the two energy sources (organic carbon and light) (Subhash et al., 2017). Further, high availability of N and P also affected how growth rates since compounds were crucial for productivity increase of *H. pluvialis* (Nahidian et al., 2018).

Dry weight of *H. pluvialis* did not reveal any significant difference between the two types of molasses and culture medium. In media with *in natura* molasses, mean cell dry weight was 2913 pg cell⁻¹ for inorganic medium and 2932 pg cell⁻¹ for organic medium, in inorganic and organic media. In the case of hydrolyzed molasses, cell dry weight was 3182 and 3004 pg cell⁻¹, respectively (Table 2).

The hue of molasses solution was dark, with an increase of turbidity in the culture medium. There was no further change of color after hydrolysis. However,

high turbidity in mixotrophic cultures enhances the growth of microalgae (Pittman et al., 2011). During the experiment, hydrolyzed molasses failed to affect culture conditions when compared to *in natura* molasses. Temperature, dissolved oxygen, pH and conductivity were similar for the two tested culture media (Table 2). Temperature and oxygen levels were close to 21°C and 7 mg L⁻¹ in the two types of molasses and culture media. Further, pH remained alkaline throughout the culture period and varied between 7 and 7.9 in inorganic medium and between 8.2 and 8.6 in organic medium. Conductivity was high, above 650 µS cm⁻¹, due to high nutrient availability. The hydrolysis of molasses improved *H. pluvialis* performance without changing culture parameters, since great variations in parameters, especially pH and temperature, are factors that affect the growth of *H. pluvialis* (Nagaraj et al., 2012; Sarada et al., 2002).

3.2. Effects of hydrolyzed molasses on nutrient availability during the cultivation of *H. pluvialis*

High cell density of *H. pluvialis* was affected by high nutrient availability since cell density may be limited by the availability of macronutrient content and significantly affected by micronutrient availability (Nahidian et al., 2018). Extracellular metabolites are also a limiting factor on the green growth phase of *H. pluvialis* (Sun et al. 2017). Culture conditions showed high initial concentrations of phosphorus and nitrogen. Concentrations were slightly reduced in culture when hydrolyzed molasses were employed in the two culture media (Fig. 2). The initial concentration of phosphorus was 3.2 mg L⁻¹ for inorganic medium and 0.7 mg L⁻¹ for organic medium, whereas it was respectively reduced to 2.9 and 0.5 mg L⁻¹ in hydrolyzed molasses culture. Nitrogen concentrations reached 3.2 mg L⁻¹ for inorganic medium and 0.4 mg L⁻¹ for organic medium, whereas it was reduced to 1 and 0.3 mg L⁻¹ in hydrolyzed molasses culture. Although slightly reduced in hydrolyzed molasses culture, P and N kept concentrations as required by microalga *H. pluvialis* to support the green stage (Sipaúba-Tavares et al., 2015; Tocquin et al., 2012).

Molasses hydrolysis also affected the consumption of P and N, the consumption of these nutrients under culture using molasses *in natura* was higher at the end of the experiment than in the culture using hydrolyzed molasses.

Increase in the final concentrations of P and N in the two culture media has been reported in this culture (Fig. 2). Increase in final concentration of N and P may be related to long cultivation period. Long cultivation periods may trigger the accumulation of extracellular metabolites such as polysaccharides, proteins, nucleic acids and lipids, naturally excreted in physiological processes, coupled to exopolysaccharides (Xiao and Zheng, 2016). Exopolysaccharides (EPS) are biopolymers with high molecular weight tied to the cell wall or excreted into the medium during cultivation (Trabelsi et al., 2016)

3.3. Effects of hydrolyzed molasses on the chemical composition of *H. pluvialis*

Changes in culture conditions and in nutrient availability in culture medium directly affect the intracellular contents of chlorophyll (da Silva Ferreira and Sant'Anna, 2017). Chlorophyll concentration was significantly different in response to hydrolyzed molasses and was significantly high in inorganic medium with highest chlorophyll concentration $1.8 \pm 0.7 \text{ mg L}^{-1}$ in treatment using hydrolyzed molasses (Table 2). High chlorophyll concentration in inorganic medium may be attributed to high N availability inducing the greatest synthesis of the compound (Peng et al., 2016). However, low concentrations in organic medium may be attributed to high iron availability in the culture medium, approximately 2.130 mg L^{-1} (Table 1). When *Haematococcus pluvialis* is cultivated with high iron availability, oxidative processes increase and trigger a greater synthesis of carotenoids rather than of chlorophyll (Hong et al., 2016).

The chemical composition of microalgae *H. pluvialis* depends on photosynthetically fixed carbon and carbon molecules for the synthesis of lipids, and proteins (Ding et al., 2018). The highest final protein content (47.4%) was obtained with hydrolyzed molasses in the inorganic medium. Contrastingly, lipids content decreased significantly in molasses and medium on the last day (Fig. 3). Nitrogen does not merely increase cell division. Chlorophyll synthesis and growth also directly affect protein synthesis and increase it when available in large amounts (Piasecka et al., 2017). However, high N and P availability keeps *H. pluvialis* in favorable culture conditions (green stage), reducing lipid synthesis and increasing protein synthesis (Scardoeli-Truzzi and Sipaúba-Tavares, 2017).

The final intracellular nitrogen was slightly higher in hydrolyzed molasses, with the highest levels above 7% in inorganic medium. However, despite a lower effect on cell growth when compared to that of inorganic medium, the organic medium had the highest intracellular carbon accumulation at end of the assay, or rather, approximately 50% for the two molasses.

4. Conclusion

Haematococcus pluvialis was affected by the hydrolysis of sugarcane molasses and nutrient source. Molasses acid hydrolysis increased the cell density of *H. pluvialis* and improved the development in inorganic medium, with greater density, dry weight, chlorophyll-*a* and intracellular protein and lipids content, due to greater N and P availability. Hydrolyzed sugarcane does not affect culture parameters and maintains the best pH, conductivity and oxygen conditions. Results suggest that sugarcane molasses is a promising carbon source for *H. pluvialis* at low-cost production and the hydrolysis treatment is a good strategy to increase cell growth.

Acknowledgements

Current research was funded by FAPESP (14/24697-3) and a scholarship grant by CAPES-DS was awarded to the first author.

References

- Abreu, A.P., Fernandes, B., Vicente, A.A., Teixeira, J., Dragone, G., 2012. Mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* using industrial dairy waste as organic carbon source. *Bioresour. Technol.* 118, 61–6.
- AOAC, Official Method. Fatty acids in oils and fats. Preparation of methyl esters. Boron trifluoride method, in: *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 19th ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, 2012.

- da Silva Ferreira, V., Sant'Anna C., 2017. Impact of culture conditions on the chlorophyll content of microalgae for biotechnological applications. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33, 20.
- Ding, W., Zhao, P., Peng, J., Zhao, Y., Xu, J-W., Li, T., Reiter, R.J., Ma, H., Yu, X., 2018. Melatonin enhances astaxanthin accumulation in the green microalga *Haematococcus pluvialis* by mechanisms possibly related to abiotic stress tolerance. *Algal Res.* 33, 256–265.
- Gao, C.F., Zhai, Y., Ding, Y., Wu, Q.Y., 2010. Application of sweet sorghum for biodiesel production by heterotrophic microalga *Chlorella protothecoides*. *Appl. Energy* 87, 756–761.
- Golterman, H.L., Clymo, R.S., Ohnstad, M.A.M. Methods for physical and chemical analysis of fresh water. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publication. 213 p. IBP Handbook, no. 8, 1978.
- Guillard, R.R.L. Division rates. In Stein JR. Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements. London: Cambridge University Press. p. 289-311, 1973.
- Guillard, R.R.L., Lorenzen, C.J. 2012. Yellow-green algae with chlorophyllide. *J. Phycol.* 8, 10-14.
- Hong, M-E., Choi, Y.Y., Sim, S.J. 2016. Effect of red cyst cell inoculation and iron (II) supplementation on autotrophic astaxanthin production by *Haematococcus pluvialis* under outdoor summer conditions. *J. Biotechnol.* 218, 25-33.
- Jiang, L., Wang, J., Liang, S., Wang, X., Cen, P., Xu, Z., 2009. Butyric acid fermentation in a fibrous bed bioreactor with immobilized *Clostridium tyrobutyricum* from cane molasses. *Bioresour. Technol.* 100, 3403–3409.
- Koroleff, F. Determination of ammonia. In: Grasshoff, K. (ed.) Methods of seawater analysis. German: Verlag Chemie Weinheinn, p. 126-133, 1976.

- Liang, Y., Sarkany, N., Cui, Y., 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol. Lett.* 31,1043-1049.
- Liu, J., Sun, Z., Zhong, Y., Gerken, H., Huang, J., Chen, F., 2013. Utilization of cane molasses towards cost-saving astaxanthin production by a *Chlorella zofingiensis* mutant. *J. Appl. Phycol.* 25, 1447-1456.
- Liu, Y-P., Zheng, P., Sun, Z-H., Ni, Y., Dong, J-J., Zhu, L-L., 2008. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresour. Technol.* 99, 1736–1742.
- Mondal, M., Ghosh, A., Tiwari, O.N., Gayen, K., Das, P., Mandal, M.K., Halder, G., 2017. Influence of carbon sources and light intensity on biomass and lipid production of *Chlorella sorokiniana* BTA 9031 isolated from coalfield under various nutritional modes. *Energy Convers. Manag.* 145, 247–254.
- Nagaraj, S., Arulmurugan, P., Rajaram, M.G., Sundararaj, R., Rengasamy, R., 2012. Enhanced production of astaxanthin at different physico-chemical parameters in the green alga *Haematococcus pluvialis* flotow. *Phykos* 42, 59–71.
- Nahidian, B., Ghanati, F., Shahbazi, M., Soltani, N., 2018. Effect of nutrients on the growth and physiological features of newly isolated *Haematococcus pluvialis* TMU1. *Bioresour. Technol.* 255, 229-237.
- Nusch, E.A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. *Archiv für Hydrobiologie*, v. 14, p. 14-36, 1980.
- Pang, N., Chen, S., 2017. Effects of C5 organic carbon and light on growth and cell activity of *Haematococcus pluvialis* under mixotrophic conditions. *Algal Res.* 21, 227–235.
- Panis, G., Carreon, J.R., 2016. Commercial astaxanthin production derived by green alga *Haematococcus pluvialis*: A microalgae process model and a techno-economic assessment all through production line. *Algal Res.* 18, 175–190.

- Peng, G., Fan, Z., Wang, X., Chen, C., 2016. Photosynthetic response to nitrogen source and different ratios of nitrogen and phosphorus in toxic cyanobacteria, *Microcystis aeruginosa* FACHB-905. *J. Limnol.* 75, 560 – 570.
- Piasecka, A., Krzemińska, I., Tys, J., 2017. Enrichment of *Parachlorella kessleri* biomass with bioproducts: oil and protein by utilization of beet molasses. *J. Appl. Phycol.* 29, 1735–1743.
- Pittman, J.K., Dean, A.P., Osundeko, O., 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresour. Technol.* 102, 17-25.
- Santana, H., Cereijo, C.R., Teles, V.C., Nascimento, R.C., Fernandes, M.S., Brunale, P., Campanha, R.C., Soares, I.P., Silva, F.C.P., Sabaini, P.S., Siqueira, F.G., Brasil, B.S.A.F., 2017. Microalgae cultivation in sugarcane vinasse: Selection, growth and biochemical characterization. *Bioresour. Technol.* 228, 133–140.
- Sarada, R., Bhattacharya, S., Ravishankar, G.A., 2002. Optimization of culture conditions for growth of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 517–521.
- Scardoeli-Truzzi, B., Sipaúba-Tavares, L. H., 2017a. Sources of inorganic fertilizer in the growth of *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae). *Journal of Algal Biomass Utilization* 8, 1-10.
- Scardoeli-Truzzi, B., Sipaúba-Tavares, L.H., 2017b. Response of microalga *Haematococcus pluvialis* growing in phototrophic and mixotrophic culture under alternative source of carbon and media. *PHYKOS* 47, 39-46.
- Sipaúba-Tavares, L.H., Pelicioni, L.C., Olivera, A., 1999. Use of inorganic (NPK) and the CHU₁₂ medium for cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) in laboratory. *Brazilian Journal of Ecology* 1, 10-15.
- Sipaúba-Tavares, L.H., Ibarra, L.C., Fioresi, T.B., 2009. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (REISCH) Korsikov (Chlorophyceae) em laboratório utilizando meio CHU₁₂ e de macrófita com NPK. *Boletim do Instituto de Pesca* 35, 111-118.

- Sipaúba-Tavares, L.H., Berchielli-Morais, F.A., Scardoeli-Truzzi, B., 2015. Growth of *Haematococcus pluvialis* Flotow in alternative media. *Brazilian Journal of Biology* 75, 796-803.
- Subhash, G.V., Rajvanshi, M., Kumar, B.N., Govindachary, S., Prasad, V., Dasgupta, S., 2017. Carbon streaming in microalgae: extraction and analysis methods for high value compounds. *Bioresour. Technol.* 244, 1304–1316.
- Sun, H., Liu, B., Lu, X., Cheng, K-W., Chen, F., 2017. Staged cultivation enhances biomass accumulation in the green growth phase of *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology* 233, 326-331.
- Sundarrajan, P., Gopinath, K.P., Greetham, D., Antonyamy, A.J., 2019. A review on cleaner production of biofuel feedstock from integrated CO₂ sequestration and wastewater treatment system. *J. Clean. Prod.* 210, 445-458.
- Tocquin, P., Fratamico, A., Franck, F., 2012. Screening for a low-cost *Haematococcus pluvialis* medium reveals an unexpected impact of a low N:P ratio on vegetative growth. *J. Appl. Phycol.* 24, 365-373.
- Trabelsi, L., Chaieb, O., Amira, M.B., Abid, S., 2016. Partial characterization and antioxidant and antiproliferative activities of the aqueous extracellular polysaccharides from the thermophilic microalgae *Graesiella* sp. *BMC Complement. Altern. Med.* 16, 210.
- Vollenweider RA (1974) A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications. 225 p. IBP, Handbook no. 12
- Xiao, R., Zheng, Y., 2016. Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnol. Adv.* 34, 1225–1244.
- Yan, D., Lu, Y., Chen, Y-F, Wu, Q., 2011. Waste molasses alone displaces glucose-based medium for microalgal fermentation towards cost-saving biodiesel production. *Biores. Technol.* 102, 6487-6493.

Yee, W., 2015. Feasibility of various carbon sources and plant materials in enhancing the growth and biomass productivity of the freshwater microalgae *Monoraphidium griffithii* NS16. *Bioresour. Technol.* 196, 1–8.

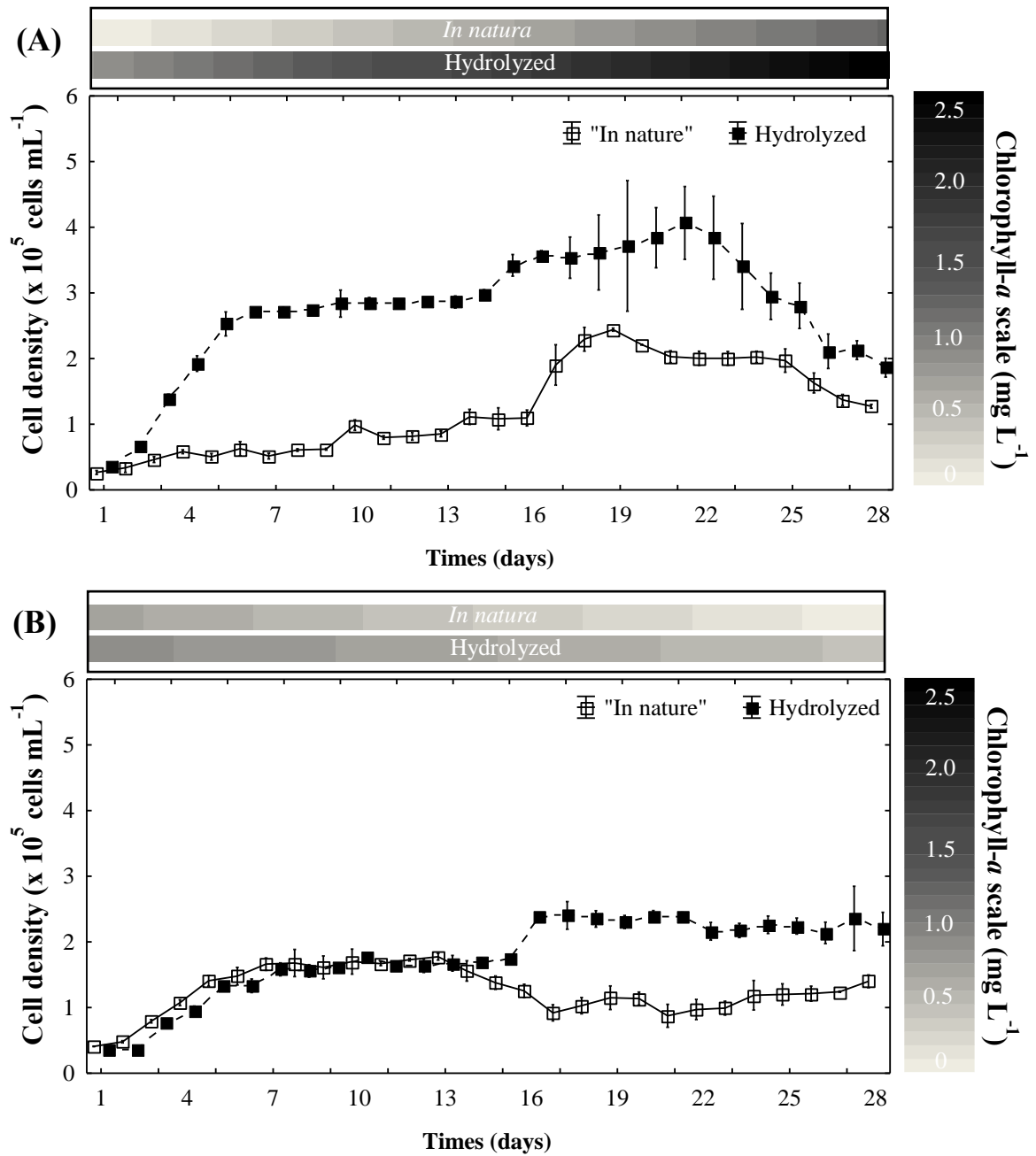


Fig. 1. Growth of *H. pluvialis* and Chlorophyll-a concentration during 28 days cultivation in (A) Inorganic medium and (B) Organic medium in molasses *in natura* and hydrolyzed.

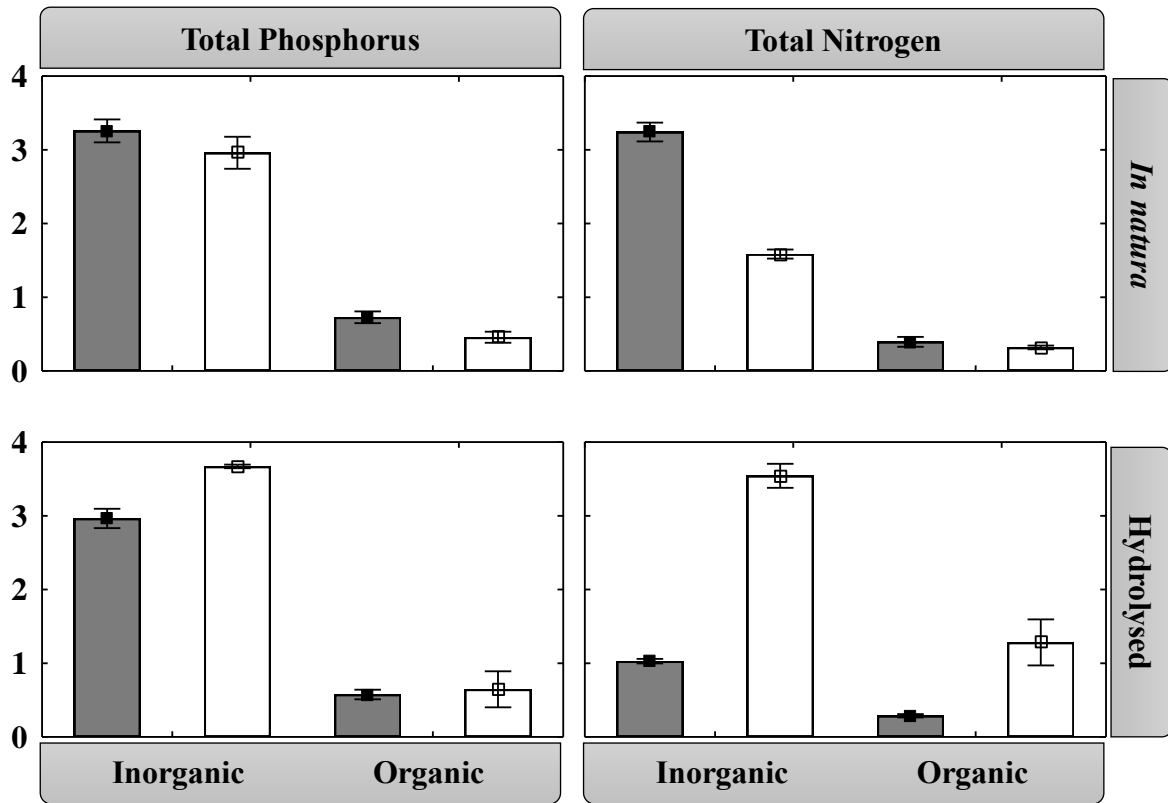


Fig. 2. Concentration of nutrients during cultivation of *H. pluvialis* - Black box means initial concentrations of nutrients (mg L⁻¹), white box means final concentration (mg L⁻¹).

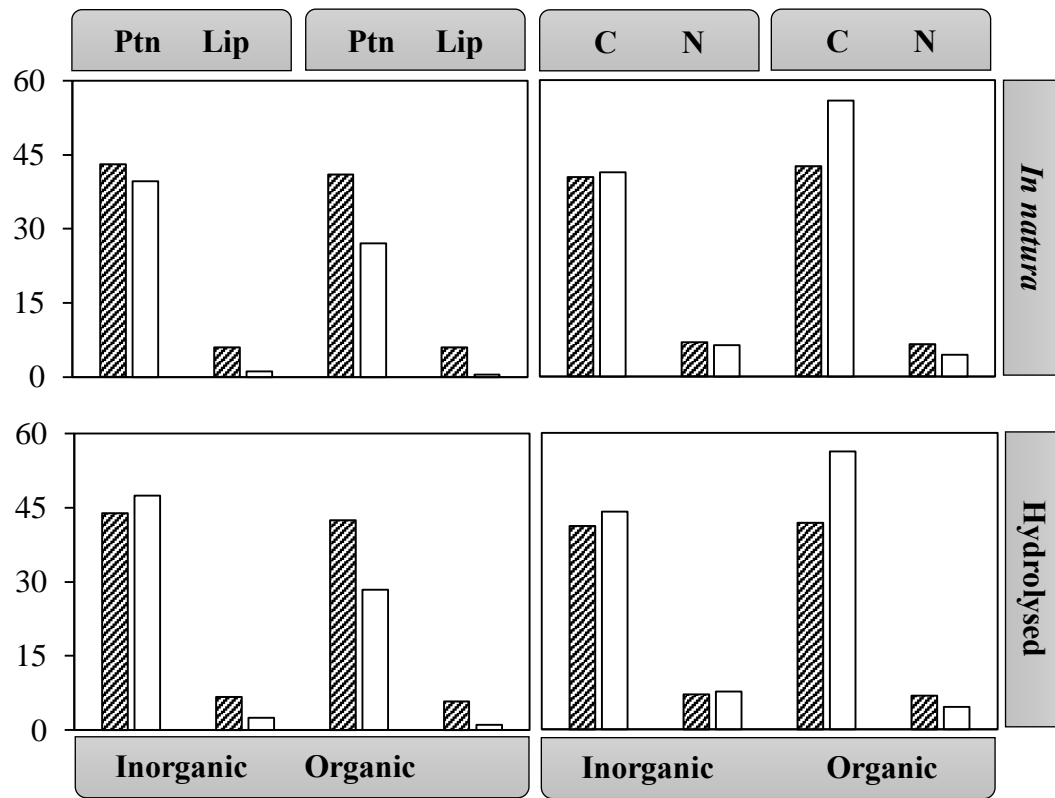


Fig. 3. Chemical composition during cultivation of *H. pluvialis* - Black box means initial concentrations (%), white box means final concentrations (%).

Table 1

The nutrient concentrations and chemical composition of the culture media.

Components	Nutrient concentrations (mg L ⁻¹)	
	Inorganic medium	Organic medium
Nitrogen	105	95
Phosphorus	107	91
Potassium	107	56
Magnesium	0.008	3
Iron	0.0006	2130
Calcium	0.135	1
Copper	0.0001	0.05
Thiamine (B ₁)	7	7
Vit B ₂	7	7
Vit B ₆	5	5
Vit B ₁₂	33 ug	33 ug
Vit H	10	10

*The Composition of Inorganic medium and Organic medium was based according Scardoeli-Truzzi and Sipaúba-Tavares (2017) and Sipaúba-Tavares et al. (2009), respectively.

Table 2

Parameters of microalgae *H. pluvialis* cultivated in sugar cane molasses (*in natura* and hydrolyzed) and culture media conditions.

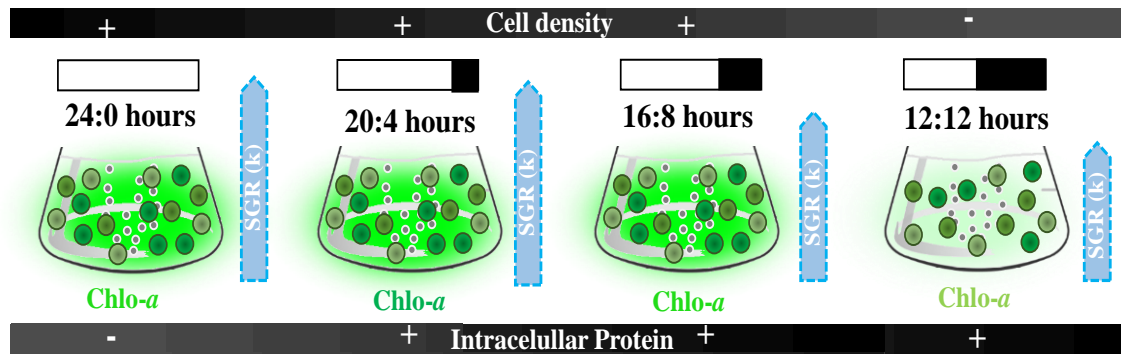
Parameter	Inorganic medium		Organic medium	
	<i>In natura</i>	Hydrolyzed	<i>In natura</i>	Hydrolyzed
Microalgae				
Max. cell density (cell mL ⁻¹)	2.44 x10 ^{5b}	4.06 x10 ^{5a}	1.77 x10 ^{5b}	2.40 x10 ^{5a}
Specific growth rate (k)	0.17 ± 0.01 ^a	0.17 ± 0.01 ^a	0.17 ± 0.005 ^a	0.17 ± 0.008 ^a
Doubling time (days)	5.63 ± 0.5 ^a	5.85 ± 0.5 ^a	5.66 ± 0.1 ^a	5.95 ± 0.2 ^a
Dry cell weight (pg cell ⁻¹)	2913 ± 737 ^a	3182 ± 970 ^a	2932 ± 598 ^a	3004 ± 1006 ^a
Chlorophyll-a (mg L ⁻¹)	0.9 ± 0.6 ^b	1.8 ± 0.7 ^a	0.4 ± 0.2 ^b	0.6 ± 0.1 ^a
Culture media				
Dissolved oxygen (mg L ⁻¹)	7.2 ± 0.1 ^a	7.4 ± 0.1 ^a	7.2 ± 0.1 ^a	7.4 ± 0.2 ^a
pH	7.4 ± 0.2 ^a	7.7 ± 0.2 ^a	8.5 ± 0.1 ^a	8.5 ± 0.1 ^a
Conductivity (µS cm ⁻¹)	844 ± 90 ^a	812 ± 109 ^a	762 ± 32 ^a	717 ± 34 ^a

Capítulo III

*Artigo formatado nas normas da revista *Biorresource Technology Reports*

Effects of light cycle on the growth of microalga *Haematococcus pluvialis* on alternative mixotrophic culture

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

Light interaction is essential for the optimal growth of microalgae. The growth of *Haematococcus pluvialis* under different light cycles (24:0, 20:4, 16:8, 12:12h light/dark) was investigated. Optimum light/dark cycle for obtaining a maximum cell density depends on the culture medium used. Highest cell density was reported in the light cycle 20:4 and 16:8 hours light/dark, ranging between 2.1 and 3.7 x10⁵ cell mL⁻¹. *H. pluvialis* chemical composition was affected by light cycles when exposed to continuous illumination (24:0 h light). Although intracellular carbon is predominant in the composition, when cells are exposed to light/dark cycles, the intracellular protein synthesis is higher and lipid levels are slightly higher than cultivation with continuous illumination. The use of light cycles may increase cell density and synthesis of compounds, with economic benefits by saving light energy.

Keywords: Biomass, growth optimization, high-valuable compounds, intracellular protein

Introduction

Microalgae are photosynthetic microorganisms that synthesize lipids, carbohydrates, proteins, pigments and vitamins (Chew et al., 2018). In recent years, these products, retrieved by microalga cultivation, provided relevant academic and industrial interest due to their different applications, comprising manufacturing of drugs, nutraceuticals, cosmetics, functional food, coupled to agricultural use (Oh et al., 2018). Among the cultured species, *Haematococcus pluvialis* is a freshwater microalga with high commercial value due to its ability to accumulate astaxanthin, a natural pigment with high biological activity and several types of employment (Pan-utai et al., 2017).

One of the main limitations in the large-scale commercial cultivation of *H. pluvialis* is its slow growth rate. In fact, in-depth studies are required for the enhancement of *H. pluvialis* growth within an efficient astaxanthin induction phase (Kim et al, 2018). Studies on maximum cell density at the green stage are scarce. In fact, long incubation periods of at least 9–20 days are required to guarantee high cell density (Sun et al., 2017). Besides requiring the consumption of macronutrients and micronutrients to obtain high cell density, culture also requires adequate light availability in intensity and photoperiod. However, this is a limiting factor in culture time reduction and in maximum cell density (Pan-utai et al., 2017).

Light availability is a crucial factor that may affect microalgae growth, metabolic pathways and photosynthesis (Luo et al., 2017). Alga cells, cultivated under continuous light, have different biomass characteristics and cell components than those cultivated under a light/dark cycle (Han et al., 2013). In mixotrophic culture, it is possible to employ supplementation with carbon sources such as glucose, fructose and others, and alternate light availability employing light/dark cycles. In fact, these carbon sources are energy sources during the dark phase (Zheng et al. 2015). Under these conditions, algae cells simultaneously absorb carbon sources (organic and inorganic) for photosynthesis and respiration mediated by carbon capture (via ATP generation) respectively. They thus increase biomass production in less culture time (Subramanian et al., 2016).

The present study investigates the influence of light cycle to increase cell density during the green growth stage in different sources of culture medium and the effects on culture and cell composition of *H. pluvialis*. Results may be fundamentally important for the development of biotechnological applications of *H. pluvialis*.

2. Materials and Methods

2.1. Culture and growth conditions

The green microalga *Haematococcus pluvialis* (CMEA 227 C1) was obtained from the culture collection of the Biology Department of the Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. Microalga strain was cultivated in WC medium (Guillard and Lorenzen, 1972) in batch-cultured system at $22\pm 1^\circ\text{C}$ with continuous light intensity of approximately $30\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ from daylight fluorescent tubes. Alga strain was pre-cultured in 250 mL flasks at a microalgae density of $1 \times 10^5\ \text{cells.mL}^{-1}$ in WC media. Approximately 280 mL of the culture were transferred to 2 L flasks. When cultures reached exponential phase (14 days), the algae were used for inoculation at approximately 20% of the total volume in each experiment. Only green cells were used as inoculums for the experiment.

2.2. Experimental growth conditions

Microalgae were cultivated in mixotrophic conditions during 14 days in 2 L flasks and continuous air bubbling. All experiments were conducted in triplicate. Illumination was provided by means of cool white fluorescent lights programmed with an automatic on / off system to simulate light period. Four conditions were used to test the effects of light cycles, namely, 24:0; 20:4; 16:8 and 12:12 hours light/dark. During the light hours, light intensity was maintained at $30\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$. Three culture media were used, or rather, commercial WC medium (Guillard and Lorenzen 1972), the inorganic fertilizer NPK (10:10:10) (Sipaúba-Tavares et al., 1999) and Macrophyte medium (Sipaúba-Tavares et al., 2009). The choice of NPK culture medium at 10:10:10 was based on previous studies on highest cell densities (Scardoeli-Truzzi and Sipaúba-Tavares, 2017a). For the production of inorganic medium, approximately $50\ \text{g L}^{-1}$ of inorganic fertilizer were dissolved

and added to 1L of distilled water. Each flask contained 40 mL of the medium. Organic medium was retrieved from the aquatic plant *Eichhornia crassipes*, as follows: approximately 5 kg of plant biomass was ground and boiled in distilled water for one hour; the hot extract was filtered; each flask contained 70 mL of the medium. All media were autoclaved prior to use and transferred to Erlenmeyer flasks under aseptic conditions. Sugarcane molasses were used as carbon source for mixotrophic conditions, in the hydrolyzed form. About 0.75g L⁻¹ of sugarcane molasses (Scardoeli-Truzzi and Sipaúba-Tavares, 2017b), vitamin B₁₂ complex at 0.02 g L⁻¹ and biotin (0.01 mg L⁻¹) were added to each culture flask,

2.4. Cell growth, biochemical and chemical parameters

Cell density was monitored during 14 days and 1 mL aliquots were daily removed from the microalga culture in triplicate. A minimum of 2 x 1 µL⁻¹ subsample was used for cell quantification, with a Neubauer hemocytometer. Specific growth rate and doubling time were obtained according to Guillard (1973), where specific growth rate (k, divisions per day) was calculated as follows:

$$k=(3.322/t_2-t_1 \times \log N_2/N_1) \quad (1)$$

where, N₂ and N₁ are the number of cells on days t₂ and t₁, respectively. Doubling time (cell division time or generation time) was calculated from results obtained from specific growth rate by the formula:

$$Dt=1k^{-1} \quad (2)$$

Chlorophyll-a was measured at the end of the experiment and extracted with alcohol 90% and quantified at 663 and 750 nm (Nusch, 1980). Dissolved oxygen, pH and conductivity were measured with a multiparameter probe YSI 556 MPS. A sample of the culture was collected at the beginning of each experiment to analyze nutrients in the aquatic medium. Samples were quantified by spectrophotometer, following Golterman et al., (1978) and Koroleff (1976) to evaluate total phosphorous (TP) and total nitrogen (TN). Lipid contents, intracellular protein, nitrogen and carbon of microalga culture samples were collected at the end of each experiment. Total lipid contents were extracted with

petroleum ether and quantified by gravimeter (AOAC, 2012). Microalgae's intracellular protein contents were measured according to the intracellular total nitrogen content and intracellular carbon, following Dumas combustion method, and supplied by Leco (CN628).

2.5. Statistical analysis

All experiments were done in triplicate. Mean rates and standard deviations (SD) were calculated. Results are shown in mean \pm SD. Significant differences were determined with analysis of variance (One-way ANOVA) with Statistica 10. Tukey's test was applied when differences ($p < 0.05$) between conditions occurred.

3. Results and discussion

3.1. Effect of light cycles on the growth of *H. pluvialis*

Fig. 1 shows cell density for different light cycles and media. The highest cell density was reported at light cycles 20:4 and 16:8 h light/dark, except in the macrophyte medium with maximum cell density in the light cycles 16:8 and 20:4 h light/dark, with 2.63 and 2.15 $\times 10^5$ cells mL⁻¹, respectively. The above may be related to macrophyte medium composed of high organic carbon concentrations, with lower light period, due to a greater external carbon source in energy provision. Light is a limiting factor for microalgae growth. If the illumination period was greater than required, a photo-inhibition process occurs in photosystem II, producing free radicals and resulting in photo-oxidative damage. However, if light is insufficient, cell respiration consumes high carbon compounds at a higher rate than that produced in photosynthesis, with a decrease in cell density (Lehmuskero et al., 2018).

A decrease in cell density has been reported in all media when cultures were exposed to a light cycle of 12:12 h light/dark. Several authors suggest that light/dark cycles are beneficial to photosynthetic efficiency. However, the light requirement of each cycle may vary and some species do not tolerate long dark

cycle periods, with the consequent reduction of photosynthetic efficiency and cell density (Grobbelaar, 2010; Vejrazka et al., 2013).

A similar pattern was found in cell density between WC and NPK media during the experimental period. The highest cell density was 3.71×10^5 and 3.68×10^5 cells mL^{-1} in 20:4 light/dark cycle, on day 12 for each medium, respectively (Table 1). Under these conditions, the highest specific growth rates and doubling time were also registered, featuring 0.23 (k) and 4.41 days for WC medium and 0.24 (k) and 4.08 days for NPK medium (Table 1). The combination of light/dark cycles and the addition of a source carbon in *H. pluvialis* culture medium results in a specific growth rate increase (Orosa et al., 2005).

As reported in cell density, 12:12 light/dark cycle impacted negatively on specific growth rate and doubling time. Specific growth rate ranged between 0.05 and 0.12 (k) and doubling time between 20.7 and 8.5 days under the above light cycle. Similar results were also observed in other studies showing a negative impact of light cycles on photosynthesis and specific growth rates (Kaiser et al., 2018; Yarnold et al., 2016). Most microalgae require light for glucose uptake and fail to grow in total dark conditions or during long periods in dark conditions (Subramanian et al., 2016).

3.2. Culture conditions in different light cycles

Table 1 shows culture conditions of *Haematococcus pluvialis* in different light cycles and media. Oxygen concentrations were higher in light cycles 20:4 and 16:8 in which cell densities were higher, with a mean rate between 7.8 and 8.2 mg L^{-1} (Table 1). High cell densities increased algae photosynthesis activity, with an increase in oxygen concentrations within the culture system (Zhao et al., 2011). However, oxygen concentrations in a 12:12 light/dark cycle decreased slightly. Yen et al. (2004) also registered a similar behavior when they induced *Synechococcus* sp. in 12:12 light/dark cycles. This is due to the period during which cells receive light and oxygen production is greater. However, photosynthesis ceases fast and oxygen concentrations decrease in dark periods (Meier et al., 2017).

In the case of the light period 16:8, pH was higher, ranging between 8.7 and 9 in all culture media, with a slight decrease in the 12:12 light cycle, ranging

between 7.6 and 7.9 (Table 1). In fact, high carbon concentration and low light periods in microalgae culture decrease the medium pH and inhibit the activity of carbonic anhydrase, triggering a decrease in growth rate and cell density (Tang et al., 2011).

Conductivity is commonly associated with nutrient availability in the culture medium (Gent, 2003). Conductivity revealed this characteristic in all culture media, with a high rate in NPK medium where phosphorus availability was greater, varying between 967 and 1135 $\mu\text{S cm}^{-1}$ in the 12:12 and 24:0 light/dark cycles (Table 1).

High cell density of *H. pluvialis* is due to availability of initial nitrogen and phosphorus. The compounds were consumed by the cells and nutrient deficiency decreased (Pan-utai et al., 2017). Total nitrogen varied between 0.16 and 1.17 mg L^{-1} , the compounds highest rates in WC and NPK media. Consequently, highest cell densities were obtained.

3.3. Effect of light cycles on the chemical composition of *H. pluvialis*

The biochemical composition of *H. pluvialis* was affected by light cycles, in which periods without light showed a positive effect on intracellular protein (Fig. 2). In continuous illumination (24: 0 hours light), the intracellular carbon was predominant in the cell composition of *H. pluvialis* in all media, ranging between 48 and 56.2%. However, when cells are exposed to light cycles (20:4; 16:8; 12:12 hours light/dark), the intracellular protein synthesis proves to be higher than intracellular carbon, ranging between 59 and 63% for WC medium; between 49 and 56% for NPK medium; between 48 and 54% for macrophyte medium. Intracellular protein rates were higher than those obtained by Colusse et al. (2019), with *H. pluvialis* maximum protein at 41% biomass dry weight. High intracellular proteins content indicates high intracellular availability of nitrogen in *H. pluvialis* cells, ranging between 5 and 10% (Fig. 1.).

Figure 2 shows that intracellular lipids were affected by light cycles and nutrient availability. Biomass from *H. pluvialis* strain presented low lipid content in all light cycles and in culture media tested, probably attributed to the strain's intrinsic characteristic. When *H. pluvialis* is cultivated under continuous light (24:0 hours light/dark), it had a 2.4% maximum lipid content. However, under a

light/dark cycle, the compounds synthesis increased up to 5.8% (Fig. 2). Increase in intracellular lipid in *H. pluvialis* cultivation may be due to physiological changes in microalga cells caused by cellular stress during the dark period (Damiani et al., 2010). However, rates are lower than those reported by Kim et al. (2015), or rather, 22.2% of total lipid.

Table 1 shows chlorophyll-a concentration under different light cycles. Maximum chlorophyll-a concentration for different light cycles was registered in cycle 20:4 light/dark for WC and macrophyte medium, respectively, 3234 ± 662 and $1.416 \pm 196 \mu\text{g L}^{-1}$. Maximum chlorophyll-a concentration in NPK medium has been reported in the 24:0 light/dark cycle, with $2315 \pm 125 \mu\text{g L}^{-1}$. High chlorophyll concentrations were reported during cycles with the highest light rates (24:0 and 20:4 h light/dark) and high cell density. On the other hand, chlorophyll-a concentration decreased when the culture was exposed to greater dark periods (16:8 and 12:12). The photo-respiratory pathway is affected by light cycles and dark reactions of photosynthesis, causing a decrease of chlorophyll accumulation in *H. pluvialis* (Zhang et al., 2016).

4. Conclusion

Growth performance of *Haematococcus pluvialis* was affected by light cycles. In the case of continuous light culture, light/dark cycles may be a feasible alternative to increase cell density and specific growth rate. However, long dark cycle periods (12:12 hours) may reduce photosynthesis efficiency by decreasing cell density and specific growth rate. Besides providing greater cell densities and high specific growth rates, light/dark cycles may increase intracellular synthesis of certain compounds, such as the intracellular production of protein which increased when culture was exposed in light/dark cycles. The use of light cycles provides an increase in cell density, synthesis of compounds and was also beneficial in light energy saving.

Acknowledgements

Current research was funded by FAPESP (14/24697-3); the scholarship grant to the first author was awarded by CAPES- DS.

References

- AOAC, Official Method. Fatty acids in oils and fats. Preparation of methyl esters. Boron trifluoride method, in: Official Methods of Analysis of AOAC International, 19th ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, USA, 2012.
- Chew, K.W., Chia, S.R., Show, P.L., Ling, T.C., Arya, S.S., Chang, J.-S., 2018. Food waste compost as an organic nutrient source for the cultivation of *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* 267, 356–362.
- Colusse, G.A., Duarte, M.E.R., Carvalho, J.C., Nosedá, M.D., 2019. Media effects on laboratory scale production costs of *Haematococcus pluvialis* biomass. *Bioresour. Technol. Reports* 7, 100236.
- Damiani, M.C., Popovich, C.A., Constenla, D., Leonardi, P.I., 2010. Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. *Bioresour. Technol.* 101, 3801–3807.
- Gent, M., 2003. Solution electrical conductivity and ratio of nitrate to other nutrients affect accumulation of nitrate in hydroponic lettuce. *Hortic. Sci.* 38, 222–227.
- Golterman, H.L., Clymo, R.S., Ohnstad, M.A.M. Methods for physical and chemical analysis of fresh water. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publication. 213 p. IBP Handbook, no. 8, 1978.
- Grobbelaar, J.U., 2010 Microalgal biomass production: challenges and realities. *Photosynth. Res.* 106, 135–144.
- Guillard, R.R.L. Division rates. In Stein JR. Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements. London: Cambridge University Press. p. 289-311, 1973.
- Guillard, R.R.L., Lorenzen, C.J., 1972. Yellow-green algae with chlorophyllide. *Journal of Phycology* 8, 10-14.
- Han, F., Wang, W., Li, Y., Shen, G., Wan, M., Wang, J., 2013. Changes of biomass, lipid content and fatty acids composition under a light–dark cyclic

- culture of *Chlorella pyrenoidosa* in response to different temperature. *Bioresour. Technol.* 132, 182–189.
- Kaiser, E., Morales, A., Harbinson, J., 2018. Fluctuating Light Takes Crop Photosynthesis on a Rollercoaster Ride. *Plant Physiology* 176, 977–989.
- Kim, J.H., Affan, M.A., Jang, J., Kang, M.H., Ko, A.R., Jeon, S.M., Oh C, Heo, S.J, Lee, Y.H., Ju, S.J., Kang, D.H., 2015. Morphological, molecular, and biochemical characterization of astaxanthinproducing green microalga *Haematococcus* sp. KORDI03 Haematococcaceae, (Chlorophyta) isolated from Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 238–246.
- Kim, J.Y., Lee, C., Jeon, M.S., Park, J., Choi, Y-E., 2018. Enhancement of microalga *Haematococcus pluvialis* growth and astaxanthin production by electrical treatment. *Bioresour. Technol.* 268, 815-819.
- Koroleff, F. Determination of ammonia. In: Grasshoff, K. (ed.) *Methods of seawater analysis*. German: Verlag Chemie Weinheim, p. 126-133, 1976.
- Lehmuskero, A., Chauton, M.S., Boström, T., 2018. Light and photosynthetic microalgae: A review of cellular- and molecularscale optical processes. *Progress in Oceanography* 168, 43–56.
- Luo, S., Berges, J.A., He, Z., Young, E.B., 2017. Algal-microbial community collaboration or energy recovery and nutrient remediation from wastewater in integrated photobioelectrochemical systems. *Algal Res.* 24 (Part B), 527–539.
- Meier, L., Barros, P., Torres, A., Vilchez, C, Jeison, D., 2017. Photosynthetic biogas upgrading using microalgae: Effect of light/dark photoperiod. *Renewable Energy* 106, 17e23.
- Nusch, E.A., 1980. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. *Archiv für Hydrobiologie* 14, 14-36.
- Oh, Y.-K., Hwang, K.-R., Kim, C., Kim, J.R., Lee, J.-S., 2018. Recent developments and key barriers to advanced biofuels: a short review. *Bioresour. Technol.* 257, 320–333.

- Orosa, M., Franqueira, D., Cid, A., Abalde, J., 2005. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour. Technol.* 96, 373–378.
- Pan-utaia, W., Parakulsuksatid, P., Phomkaivon, N., 2017. Effect of inducing agents on growth and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis*: Organic and inorganic. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 12, 152–158.
- Scardoeli-Truzzi, B., Sipaúba-Tavares, L. H., 2017a. Sources of inorganic fertilizer in the growth of *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae). *Journal of Algal Biomass Utilization* 8, 1-10.
- Scardoeli-Truzzi, B., Sipaúba-Tavares, L.H., 2017b. Response of microalga *Haematococcus pluvialis* growing in phototrophic and mixotrophic culture under alternative source of carbon and media. *PHYKOS* 47, 39-46.
- Sipaúba-Tavares, L.H., Pelicioni, L.C., Olivera, A., 1999. Use of inorganic (NPK) and the CHU₁₂ medium for cultivation of *Ankistrodesmus gracilis* (Reisch) Korsikov (Chlorophyta) in laboratory. *Brazilian Journal of Ecology* 1, 10-15.
- Sipaúba-Tavares, L.H., Ibarra, L.C., Fioresi, T.B., 2009. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (REISCH) Korsikov (Chlorophyceae) em laboratório utilizando meio CHU₁₂ e de macrófita com NPK. *Boletim do Instituto de Pesca* 35, 111-118.
- Subramanian, G., Yadav, G., Sen, R., 2016. Rationally leveraging mixotrophic growth of microalgae in different photobioreactor configurations for reducing the carbon footprint of an algal biorefinery: a techno-economic perspective. *RSC Adv.* 6, 72897.
- Sun, H., Liu, B., Lu, X., Cheng, K-W., Chen, F., 2017. Staged cultivation enhances biomass accumulation in the green growth phase of *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour. Technol.* 233, 326-331.
- Tang, D., Han, W., Li, P., Miao, X., Zhong, J., 2011. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. *Bioresour. Technol.* 102, 3071–3076.

- Vejrazka, C., Janssen, M., Benvenuti, G., Streefland, M., Wijffels, R.H., 2013. Photosynthetic efficiency and oxygen evolution of *Chlamydomonas reinhardtii* under continuous and flashing light. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 1523–1532.
- Yarnold, J., Ross, I.L., Hankamer, B., 2016. Photoacclimation and productivity of *Chlamydomonas reinhardtii* grown in fluctuating light regimes which simulate outdoor algal culture conditions. *Algal Research* 13, 182–194.
- Yen, U.-C., Huang, T.-C., Yen, T.-C., 2004. Observation of the circadian photosynthetic rhythm in cyanobacteria with a dissolved-oxygen meter, *Plant Sci.* 66, 949e952.
- Zhang, C., Zhang, L., Liu, J., 2016. The role of photorespiration during astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Plant Physiol. Biochem.* 107, 75–81.
- Zhao, B., Zhang, Y., Xiong, K., Zhang, Z., Hao, X., Liu, T., 2011. Effect of cultivation mode on microalgal growth and CO₂ Fixation. *Chemical Engineering Research and Design* 89, 1758-1762.
- Zheng H., Ma, X., Gao, Z., Wan, Y., Min, M., Zhou, W., Li, Y., Liu, Y., Huang, H., Chen, P, Ruan, R., 2015. Lipid production of heterotrophic *Chlorella* sp. from hydrolysate mixtures of lipid-extracted microalgal biomass residues and molasses. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 77, 662-74.

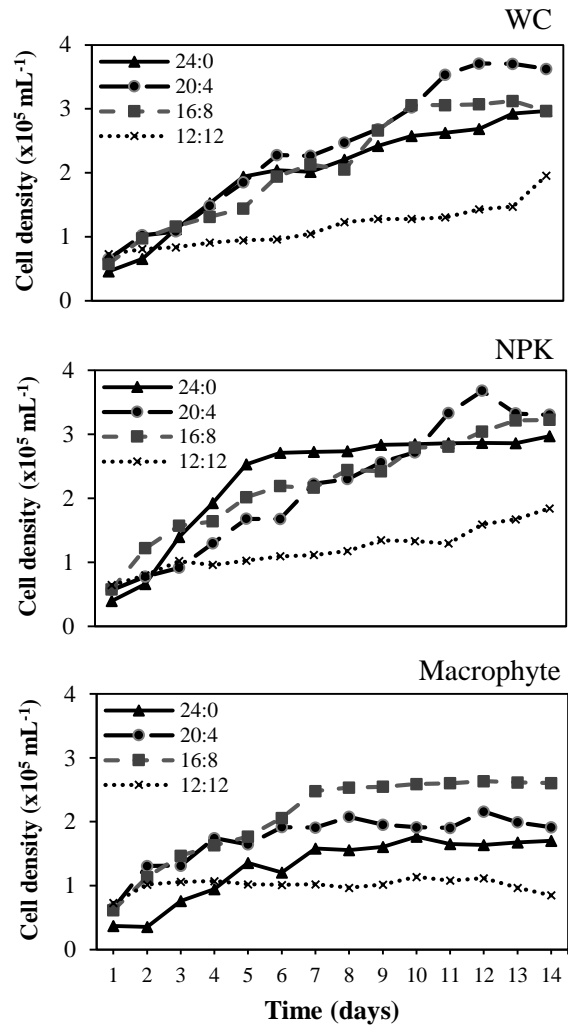


Fig. 1. Growth performance of *Haematococcus pluvialis* in different light/dark cycles and culture media.

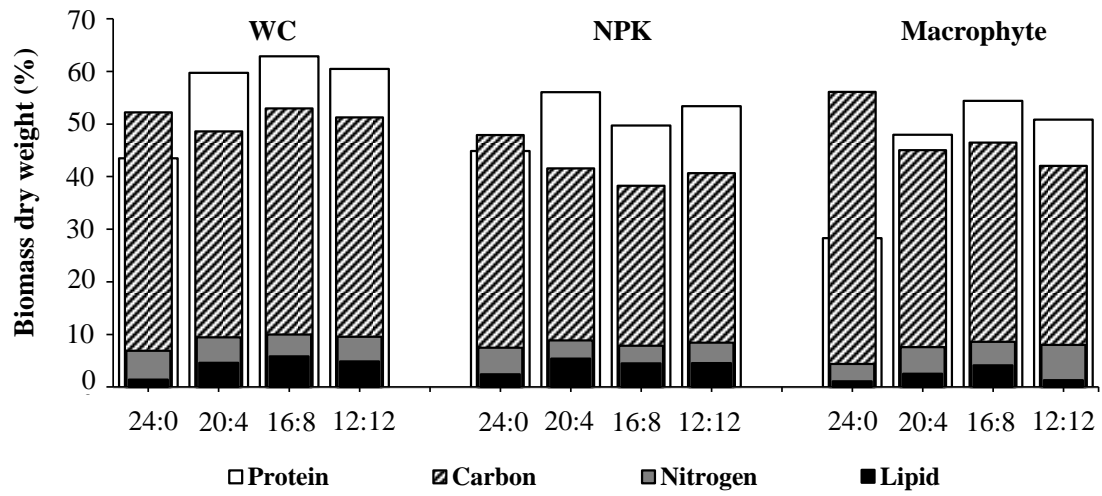


Fig. 2. Chemical composition of *Haematococcus pluvialis* in different lighth/dark cycles and culture media.

Table 1Growth parameters and culture conditions of *Haematococcus pluvialis* in different lighth/dark cycles and culture media.

	Microalgae*				Culture conditions**				
	MCD	SGR	DT	Chlo-a	DO	pH	Cond	TN	TP
WC									
24:0	2.96 x10 ⁵ ^a	0.20 ± 0.01 ^a	4.87 ± 0.4 ^a	1,646 ± 74 ^b	7.6 ± 0.2 ^a	8.8 ± 0.1 ^b	850 ± 11 ^a	0.78 ± 0.0 ^b	1.02 ± 0.2 ^{ab}
20:4	3.71 x10 ⁵ ^a	0.23 ± 0.03 ^a	4.41 ± 0.4 ^a	3,234 ± 662 ^a	7.7 ± 0.3 ^a	8.1 ± 0.1 ^b	854 ± 11 ^a	1.06 ± 0.1 ^{ab}	1.20 ± 0.1 ^a
16:8	3.12 x10 ⁵ ^a	0.20 ± 0.03 ^a	4.95 ± 0.7 ^a	2,176 ± 374 ^b	8.2 ± 0.1 ^a	9.0 ± 0.1 ^a	836 ± 8 ^a	1.17 ± 0.1 ^a	0.77 ± 0.1 ^b
12:12	1.95 x10 ⁵ ^b	0.10 ± 0.01 ^b	9.26 ± 1.3 ^b	1537 ± 128 ^b	7.3 ± 0.3 ^b	7.6 ± 0.6 ^b	804 ± 7 ^b	0.94 ± 0.2 ^{ab}	0.81 ± 0.1 ^b
NPK									
24:0	2.97 x10 ⁵ ^b	0.23 ± 0.04 ^a	4.41 ± 0.8 ^a	2315 ± 125 ^a	7.3 ± 0.2 ^b	8.5 ± 0.1 ^a	1135 ± 102 ^a	1.02 ± 0.1 ^a	2.96 ± 0.1 ^b
20:4	3.68 x10 ⁵ ^a	0.24 ± 0.02 ^a	4.08 ± 0.4 ^a	1736 ± 197 ^b	8.2 ± 0.1 ^a	8.1 ± 0.1 ^b	1041 ± 54 ^{ab}	0.43 ± 0.1 ^b	3.60 ± 0.3 ^a
16:8	3.22 x10 ⁵ ^b	0.19 ± 0.02 ^a	5.29 ± 0.6 ^a	1302 ± 358 ^{bc}	7.2 ± 0.1 ^b	8.7 ± 0.1 ^a	1128 ± 14 ^a	0.51 ± 0.1 ^b	3.88 ± 0.3 ^a
12:12	1.84 x10 ⁵ ^c	0.12 ± 0.01 ^b	8.54 ± 0.1 ^b	942 ± 112 ^c	7.0 ± 0.1 ^b	7.9 ± 0.1 ^b	967 ± 13 ^b	1.15 ± 0.3 ^a	3.38 ± 0.1 ^{ab}
Macrophyte									
24:0	1.76 x10 ⁵ ^b	0.25 ± 0.02 ^a	4.00 ± 0.4 ^a	476 ± 54 ^b	7.5 ± 0.2 ^a	8.3 ± 0.1 ^b	756 ± 14 ^a	0.28 ± 0.0 ^b	0.57 ± 0.1 ^c
20:4	2.15 x10 ⁵ ^{ab}	0.15 ± 0.01 ^b	6.45 ± 0.1 ^b	1416 ± 196 ^a	7.8 ± 0.5 ^a	8.1 ± 0.1 ^b	370 ± 88 ^c	0.16 ± 0.0 ^c	1.3 ± 0.2 ^b
16:8	2.63 x10 ⁵ ^a	0.19 ± 0.02 ^b	5.3 ± 0.1 ^a	1283 ± 251 ^a	7.0 ± 0.1 ^a	8.8 ± 0.1 ^a	573 ± 11 ^b	0.28 ± 0.0 ^b	1.64 ± 0.1 ^b
12:12	1.13 x10 ⁵ ^c	0.05 ± 0.02 ^c	20.74 ± 10 ^c	518 ± 103 ^b	5.9 ± 0.2 ^b	7.6 ± 0.1 ^b	831 ± 7 ^a	0.55 ± 0.0 ^a	2.2 ± 0.2 ^a

*MCD: Maximum cell density (cells mL⁻¹); SGR: Specific growth rate (k); DT: Doubling time (days); Chlo-a: Chlorophyll-a (µg L⁻¹).** DO: Dissolved oxygen (mg L⁻¹); Cond: Conductivity (µS cm⁻¹); TN: Total nitrogen (mg L⁻¹); TP: Total phosphorus (mg L⁻¹).

Capítulo IV

*Artigo formatado nas normas da revista *Aquaculture*

**Post-larvae *Macrobrachium amazonicum* prawn feeding with microalgae
Haematococcus pluvialis biomass as replacement for fishmeal**

A B S T R A C T

This study evaluated the effects of the use of the microalga *Haematococcus pluvialis* replacing fish meal in diet treatments tested in post-larval of river prawn *Macrobrachium amazonicum*. Three levels of substitution of fish meal were tested 25%, 50% and 100% and a control diet. Growth performance, food performance and survival were influenced by the replacement of fish meal by microalgae *H. pluvialis* biomass. The weight gain, specific growth rate and survival rate were higher than those of the control, but not significantly different. The replacing of fish meal by *H. pluvialis* biomass in post-larvae feeding demonstrated higher utilization of dietary protein, being 2.4 ± 0.5 for T25%, 2.7 ± 0.5 for T50% and 3.0 ± 0.2 for T100%. Higher efficiency of crude protein retention was observed in T100% dietary treatment ($68.2 \pm 3 \%$) of efficiency and control dietary treatment showed lower efficiency ($52.6 \pm 9 \%$). These results demonstrated that total replacement of fish meal to *H. pluvialis* biomass had beneficial effects on growth performance and survival of post-larval *M. amazonicum* and the use of *H. pluvialis* biomass was a good protein functional aquafeed source.

Keywords: Crustacean, Growth performance, microalgae biomass, plant sources protein.

1. Introduction

The freshwater prawn farming is a modern and appealing aquaculture activity that has been based on a profitable production with environmental concerns, which also acts on social development (Shakerian et al., 2018). However, the exotic species production have risen great concern, since open production systems may cause accidental introduction of other species. There is a lack of research assessing the harmful impacts that the introduction of these organisms may cause to the environment (Barbieri et al., 2016). In order to avoid such harmful effects native species should be employed. The Amazon River prawn *Macrobrachium*

amazonicum is a Brazilian native prawn with recognized potential for use in aquaculture and is being intensively exploited by artisanal fisheries, however, nutritional requirements, diet and feeding of this specie is very scarce and is important for aquaculture strategies (Moraes-Valenti and Valenti, 2010; Marques and Moraes-Valenti, 2012; Ribeiro et al., 2016).

The Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum* occurs in rivers, floodplains, lakes, and reservoirs in the tropical and subtropical regions of South America. The distribution of this species includes the basins of the Amazon, Orinoco, São Francisco, and the Prata rivers, and the rivers of the northeast and the midwest of Brazil (Maciel and Valenti 2009). The wide distribution of this species allowed the evolution of local populations with variation in physiology (Anger and Hayd 2009), ecology, morphology (Maciel & Valenti 2009), and genetics (Pileggi and Mantelatto 2010; Vergamini et al., 2011). Such intraspecific variation makes this species a model organism for various studies. The Amazon river prawn plays an important role in the aquatic ecosystems food chain, contributing to the flow of energy and nutrients. Larvae are planktonic and feed on zooplankton and inert particles (Maciel and Valenti 2009), whereas juveniles and adults show epibenthic habit and feed on detritus, algae, macro- and microinvertebrates, and fish (Kensley and Walker 1982). This prawn represents 80% of the macrocrustacean biomass in some biotopes (Odinetz-Collart 1988; Odinetz-Collart and Moreira 1993).

The use of natural constituents feed has attracted considerable attention to prawn culturing due to their advantages of rich nutritional content, good palatability and ease of acquisition (Shan et al., 2019). Its use provides a various supplementary source of nutrients for prawn, increasing zootechnical performance in growth gain and feed conversion rates (Becerril-Cortés et al., 2018; Reis et al., 2019).

Fish meal is an important source of protein employed in feed composition for many aquatic organisms due to its nutritional quality and palatability (Dantas et al., 2016). However, the use of fish meal in feed diets is limited, because of the high demand have driven up prices and consumption of fishery resources (Yan et al., 2014). The replacement of an animal-origin protein for a vegetal one has become an attractive alternative which lowers the production cost, provided that the organisms maintain a satisfactory growth and adequate feeding efficiency (Banerjee and Khemundu, 2019).

Due to microalgae can be growth using technologically controlled processes, some species are suggested an environmentally sustainable alternative to fish meal (Perez-Velazquez et al., 2018). The microalgae species must have high protein, amino acids and minerals content to be considered an adequate protein source, in order to improve the development and metabolism of aquatic organisms. The green algae *Haematococcus pluvialis* has a great commercial value due to the production of high amounts of astaxanthin, an important natural antioxidant (Ota et al., 2018), with high amino acids and protein content with high biologic value (Kim et al., 2015). The present study is thus an attempt to evaluate the potetial use of *H. pluvialis* biomass as partial and total replacement of fish meal in post-larval of *Macrobrachium amazonicum* feed.

2. Materials and methods

2.1. Microalgae strain and culture conditions

The strain of green microalga *Haematococcus pluvialis* (CMEA 227 C1) was obtained from the culture collection of the Biology Department of the Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. These microalgae were cultivated in inorganic fertilizer medium (NPK 10-10-10) (Scardoeli-Truzzi and Sipaúba-Tavares, 2017) in a batch-cultured system at $22\pm 1^\circ\text{C}$, with a continuous light intensity of about $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ from daylight fluorescent tubes. To obtain the algal biomass, the microalgae *H. pluvialis* was cultivated for 28 days, after the growth, the biomass was harvested and lyophilized. Dry cell weight was measured for the determination of biomass obtained per liter cultivated by sample filtration using $0.45\text{-}\mu\text{m}$ glass fiber filters, following Vollenweider (1974). Biochemical composition was also evaluated for the formulation of dietary diets. Protein contents were measured according to intracellular nitrogen content by Dumas combustion method, supplied by Leco (CN628) and gross energy was calculated by oxygen bomb calorimeter and lipid contents were extracted with petroleum ether and quantified by a gravimeter (AOAC, 2012),

2.2. Formulation and preparation of experimental diets

The ingredients and proximate composition of the experimental diets are shown in Table 1. Four isoenergetic and isoprotein diets were formulated, one control and another three with different levels of *H. pluvialis* (T25%, T50% and T100%), replacing fish meal. All the dry ingredients were weighed and mixed manually, deionized water was added until complete homogenization. Diet ingredients were pelletized and dried for 24 hours at 50° C, after drying, the diets were in-ground and sieved in 0.5 mm with metal sieves.

2.3. Experimental design

The feeding trial was conducted indoor in polypropylene tanks with the individual water recirculation system, constant aeration and thermostats with a useful volume of 60 L. The experimental design was completely randomized with four dietary treatments, three with 25%, 50% and 100% *H. pluvialis* biomass and one control without microalgae. The experiment was conducted in four replicates each. Photoperiod was 12/12 hours, light/darkness. The post-larvae of *M. amazonicum* used in the present study were 5 days after metamorphosed, obtained from larviculture of the Laboratory of Carciniculture (São Paulo State University (Unesp), Aquaculture Center of Unesp Jaboticabal, Brazil). The stocking density was 2 post-larval per liter with a total of 120 post-larval in each dietary treatment and the experiment was conducted for 30 days. Post-larvae were fed twice daily with feed rate of 40% of biomass as determined according to Araújo and Valenti (2005).

2.4. Water quality analysis

The sampling for water quality parameters were performed weekly at 8:00h, during 30 days in each dietary treatment. Water Temperature, dissolved oxygen (DO), conductivity and pH were measured weekly with a multiparameter probe YSI 556 MPS. Ammonia, nitrate, nitrite and total phosphorus were quantified by spectrophotometer according Koroleff (1976) and Golterman et al. (1978). All experiments were made in four replicates. Only water temperature was monitored daily.

2.5. Sampling and growth performance

The post-larvae of each dietary treatment were weighted individually on a digital balance ($\pm 0.1\mu\text{g}$ Mettler Toledo) and their length gain was determined with a digital vernier caliper ($\pm 0.001\text{ mm}$ Mitutoyo, model - CD-6 CS). Growth performance parameters of each dietary treatment was evaluated by the weight gain (WG), length gain (LG), specific growth rate (SGR %) feed conversion rate (FCR), food consumption (FC), protein efficiency ratio (PER), protein productive value (PPV), crude protein weight gain (CP_{WG}) and survival rate (SR), according to the following equations:

$$\text{WG} = (\text{mean final weight} - \text{mean initial weight})$$

$$\text{LG} = (\text{mean final length} - \text{mean initial length})$$

$$\text{SGR (\%)} = \frac{[\ln(\text{final mean weight}) - \ln(\text{initial mean weight})]}{\text{time (days)}}$$

$$\text{FCR} = \frac{\text{mean feed intake}}{\text{mean weight gain}}$$

$$\text{FC} = \frac{\text{mean feed consumption}}{\text{final number of individuals}}$$

$$\text{SR (\%)} = \frac{\text{final number of individuals}}{\text{initial number of individuals}} \times 100$$

$$\text{PER} = \frac{\text{mean weight gain}}{\text{mean crude protein intake}}$$

$$\text{PPV (\%)} = \frac{[(\text{CPf} \times \text{Wf}) - (\text{CPI} \times \text{Wi})]}{\text{crude protein intake}} \times 100$$

$$\text{CPWG (\%)} = \frac{[(\text{CPf} \times \text{Wf}) - (\text{CPI} \times \text{Wi})]}{(\text{final weight} - \text{inicial weight})} \times 100$$

where:

CPf: final crude protein, in the body prawns; CPI: initial crude protein in body prawns;
Wi, Wf: initial and final body weight.

2.6. *Statistical analysis*

Results are presented as means \pm standard deviation (SD) from four replicates groups. The effect of different dietary treatments on growth performance and water parameters was analysed by the method of analysis of variance (one-way ANOVA) with Statistica 10 software (StatSoft, USA). Tukey's test was applied when differences ($p < 0.05$) between dietary treatments occurred.

3. Results and Discussion

3.1. *Haematococcus pluvialis* biomass composition

To be considered a reliable alternate protein source for feed composition, the ingredient has to contain a certain nutrient amount, such as protein, essential amino acids and highly unsaturated fatty acids to support the growth or survival (Gatlin et al., 2007). The biochemical composition of microalgae *H. pluvialis* and amount of biomass obtained in the culture was demonstrated in Fig.1.

After cultivation period (28 days), was obtained about 1.0 g of dry microalgae biomass per liter, with high gross energy potential (3,991 kcal Kg). The predominant composition of these strain for these growth conditions was based in high protein content, about 34.12 % dry biomass. These strains are recognized for accumulating high amount of protein with high biological value, due to the high concentrations of amino acids (Scardoeli-Truzzi and Sipaúba-Tavares, 2017). In contrast, the lipid contents were lower, about 4% of dry biomass. However, the lipid of this species of microalgae is adequate in the formulation of diets due to highly unsaturated fatty acids (Damiani et al., 2010). The employment of this species is recommended, since it presents high protein, amino acids, pigments and fatty acids content, which improves the zootechnical performance, biological activities and prawn pigmentation (Ju et al., 2012).

3.2. Water quality parameters

The water quality parameters for treatments and control are presented in Table 3. Temperatures in the experimental tanks was maintained about 26°C in all

treatments, and dissolved oxygen was kept above 7 mg L⁻¹. The pH of the systems varied from 7.1 ± 0.1 to 7.2 ± 0.1. According to Henry-Silva et al. (2015), maintaining the pH inside such interval is recommended for prawn farming in order to avoid the decrease in metabolism and productive losses.

During the experimental period, the concentration of nitrogen compounds was lower, ammonia was in range of 3.5 ± 0.11 to 12.6 ± 6 µg L⁻¹, nitrite ranged from 6.1 ± 4 to 22.4 ± 3 µg L⁻¹ and nitrate concentrations was kept below 30 µg L⁻¹. Total phosphorus ranged from 124 ± 35 to 241 ± 20 µg L⁻¹. No significant differences in water quality parameters among experimental treatments were revealed, with exception to nitrite concentrations. All variables of water were within the range acceptable for the specie in study and thus probably caused no influence in performance growth (Araujo and Valenti, 2011; Soeiro et al., 2016; Dutra et al., 2016).

3.3. Growth performance

The results obtained of growth performance of post-larval *Macrobrachium amazonicum* after the end of 30-days feeding in different dietary treatments is shown in Table 3. The growth performance was increased by the replacement of fish meal by *Haematococcus pluvialis* biomass. The lowest weight gain value was observed in control treatment (42.1 ± 6 mg) and a progressive increase was observed when fish meal was replaced by *H. pluvialis* biomass, being of 43.4 ± 9 mg for T25%, 47.1 ± 8 mg for T50% and 58.8 ± 3 mg for T100%. Xie et al. (2018) evaluated the dietary *H. pluvialis* supplementation (red cyst cells) effect on weight gain of post-larval white prawn and had no significant effect. The different results may mainly be due to the differential stages of use of the microalga *H. pluvialis*, when cultivated at green stage exhibits a higher protein composition (Kim et al., 2015), improving the biomass nutritional quality.

The *H. pluvialis* biomass used in this study had a high amino acid profile compared to the fish meal, so this could be the reason for similar results in growth performance of post-larvae *M. amazonicum* in dietary treatments. Cummins Jr. et al. (2017) described the reduced growth of white prawn by to the deficiency of essential amino acids. Palatability can be a good indicator that this protein source

is well accepted by this species. Growth performance of some species of aquatic organisms may reduce due to the decreased feed intake as a result of reduced diet palatability Ji et al. (2015).

Compared with the control treatment, the length gain were significantly higher, the highest length gain was observed in T100%, about 9.9 ± 0.6 mm. In crustaceans the growth and length are a discontinuous process and are affected by frequency of molting and gain body size after molt (Gao et al., 2015). The specific growth rate was similar in all dietary treatments, highest rate was observed in T100% (6.01 ± 0.2 %) and the control treatment the lowest rate (5.37 ± 0.4 %).

The highest feed conversion ratio was produced by the treatment T100% (2.7 ± 0.2 mg/mg) with the maximum replacement of fish meal by *H. pluvialis* biomass, this can be attributed because in this treatment exhibited lowest food consumption. Further comparisons revealed that there was no significant difference in the food consumption between the control and others treatments, but these values were reduced when the replacement for *H. pluvialis* biomass in the diets increased.

In the present study, the control treatment diet promoted the lowest protein efficiency ratio (PER) mean (2.4 ± 0.3). The gradual increase of replacing of fish meal by *H. pluvialis* biomass, post-larvae showed PER mean with higher utilization of dietary protein, being 2.4 ± 0.5 for T25%, 2.7 ± 0.5 for T50% and 3.0 ± 0.2 for T100%. (Table 3). The same was observed in protein productive value (PPV), that showed higher efficiency of crude protein retention in T100% dietary treatment, with 68.2 ± 3 % of efficiency, in contrast the control dietary treatment showed lower efficiency, being 52.6 ± 9 %. All dietary treatments showed similar influence of crude protein on weight gain (CP_{WG}) (Table 3). *Haematococcus pluvialis* contain high levels of protein with high concentrations of essential amino acids (Scardoeli-Truzzi and Sipaúba-Tavares, 2017) and compounds with high biological activity (Shah et al., 2016), indicating that higher availability of this amino acids and compounds contributed significantly to increase the efficiency of the use of proteins in the diets used.

The highest survival rate (87.1 ± 8 %) was observed in the T100% dietary treatment and the lowest (75.4 ± 7 %) was observed in diet control. Macias-Sancho et al. (2014) evaluating the replacing fish meal by algal biomass (up to 75%

inclusion) in a diet formulated for prawn feeding, observed survival and growth similar to the basal diet, however there was a significant improvement in the immune response. The values of survival rate in the T100% was about 12% higher as many as those in the control, T25% and T50%, although no significant difference was observed. The use of *H. pluvialis* in a dietary supplementation may increase the resistance of prawn against the environment stresses, enhance the survival rate of these organisms (Xie et al., 2018). Diets with a proportion of natural feed improve the growth performance of prawn, since it provides highly digestible macronutrients, vitamins and minerals (Gamboa-Delgado, 2014).

4. Conclusions

The replacement of fish meal and inclusion of *Haematococcus pluvialis* biomass had good effects on weight gain, length gain, specific growth rate and survival of post-larval *Macrobrachium amazonicum*. All dietary treatments with *H. pluvialis* biomass have shown a comparatively better growth performance than dietary treatment control. All diets showed similar advantages in the use of this biomass source in relation on crude protein on weight gain. This study suggests that *H. pluvialis* biomass in different dietary treatments does not influence water parameters, only in performance of post-larvae. The use *H. pluvialis* biomass as ingredient constitution in diets for *M. amazonicum* is an adequate alternative for animal protein replacement, due to its high nutritional value.

Acknowledgements

Current research was funded by FAPESP (14/24697-3); the scholarship grant to the first author was awarded by CAPES- DS.

References

- Anger, K, HAYD, L. 2009. From lecithotrophy to planktotrophy: ontogeny of larval feeding in the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Aquatic Biol*, 7:19-30.
- AOAC, Official Method, 2012. Fatty acids in oils and fats. Preparation of methyl esters. Boron trifluoride method, in: Official Methods of Analysis of AOAC International, 19th ed., AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- Araujo, M. C., Valenti, W. C. 2011. Efeito da intensidade luminosa no desenvolvimento larval do camarão-da-amazônia, *Macrobrachium amazonicum*. *Bol Inst Pesca (São Paulo)*, 37:155–164.
- Araujo, M. C., Valenti, W. C., 2005. Manejo alimentar de pós-larvas de camarão-da-amazônia, *Macrobrachium amazonicum* em berçário I. *Acta Scientiarum. Zootechny* 27, 67-72.
- Banerjee, K., Khemundu, G.R., 2019. Total replacement of fish meal with indigenously available ingredients from plant sources for culturing *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 512, 734277.
- Barbieri, E., Coa, F., Rezende, K.F.O., 2016. The exotic species *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) occurrence in Cananeia, Iguape and Ilha Comprida lagoon estuary complex. *Boletim do Instituto da Pesca* 42, 479-485.
- Becerril-cortés, D., Monroy-dosta, M.D.C., Emerenciano, G.C., Castro-mejía, G., Sofia, B., Bermúdez, S., Correa, G.V., 2018. Effect on nutritional composition of produced bioflocs with different carbon sources (molasses, coffee waste and rice bran) in biofloc System. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies* 6, 541–547.
- Cummins Jr., V.C., Rawles, S.D., Thompson, K.R., Velasquez, A., Kobayashi, Y., Hager, J., Webster, C.D., 2017. Evaluation of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal as partial or total replacement of marine fish meal in practical diets for Pacific White shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 473, 337–344.

- Damiani, M.C., Popovich, C.A., Constenla, D., Leonardi, P.I., 2010. Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. *Bioresource Technology* 101, 3801–3807.
- Dantas, E.M., Valle, B.C.S., Brito, C.M.S., Calazans, N.K.F., Peixoto, S.R.M., Soares, R.B., 2016. Partial replacement of fish meal with biofloc meal in the diet of postlarvae of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquac. Nutr.* 22, 335–342.
- Dutra, F. M., Forneck, S. C., Brazão, C. C., Freire, C. A., Ballester, E. L. C. 2016. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the Amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum*, Heller, 1862. *Aquaculture*, 453:104–109.
- Gamboa-Delgado, J., 2014. Nutritional role of natural productivity and formulated feed in semi-intensive shrimp farming as indicated by natural stable isotopes. *Rev. Aquacult.* 6, 36–47.
- Gao, Y., Zhang, X., Wei, J., Sun, X., Yuan, J., Li, F., Xiang, J., 2015. Whole transcriptome analysis provides insights into molecular mechanisms for molting in *Litopenaeus vannamei*. *PLoS One* 10, e0144350.
- Gatlin, D.M.I.I.I., Barrows, F.T., Brown, P., Dabrowski, K., Gaylord, T.G., Hardy, R.W., Herman, E., Hu, G., Kroghdahl, Å., Nelson, R., Overturf, K., Rust, M., Sealey, W., Skonberg, D., Souza, E.J., Stone, D., Wilson, R., Wurtele, E., 2007. Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquac. Res.* 38, 551–579.
- Golterman, H.L., Clymo, R.S., Ohnstad, M.A.M., 1978. Methods for physical and chemical analysis of fresh water. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publication. IBP Handbook, no. 8, 213 p
- Henry-Silva, G.G., Maia, C.S.P., Moura, R.S.T., Bessa-Junior, A.P., Valenti, W.C., 2015. Integrated multi-trophic culture of *Nile tilapia* (*Oreochromis niloticus*) and *Amazon river prawn* (*Macrobrachium amazonicum*) in brackish water. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 67, 265-273.
- Ji, H., Zhang, J.L., Huang, J.Q., Cheng, X.F., Liu, C., 2015. Effect of replacement of dietary fish meal with silkworm pupae meal on growth performance, body

- composition, intestinal protease activity and health status in juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquac. Res.* 46, 1209–1221.
- Ju, Z.Y., Deng, D.F., Dominy, W.G., 2012. A defatted microalgae (*Haematococcus pluvialis*) meal as a protein ingredient to partially replace fishmeal in diets of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*), Boone, 1931. *Aquaculture*, 354–355, 50–55.
- Kensley, B., Walker, I. 1982. Palaemonid Shrimps from the Amazon Basin, Brazil (Crustacea: Decapoda: Natantia). *Smithsonian Contributions to Zoology*, 362:1–27.
- Kim, J. H., Affan, M. A., Jang, J., Kang, M. H., Ko, A. R., Jeon, S. M., Oh, C., Heo, S. J., Lee, Y. H., Ju, S. J., Kang, D. H., 2015. Morphological, molecular, and biochemical characterization of astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus* sp. KORDI03 (Haematococcaceae, Chlorophyta) isolated from Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 238–246.
- Koroleff, F., 1976. Determination of ammonia. In: Grasshoff, K. (ed.) *Methods of seawater analysis*. German: Verlag Chemie Weinheinn, 126-133 p.
- Macias-Sancho, J., Poersch, L.H., Bauer, W., Romano, L.A., Wasielesky, W., Tesser, M.B., 2014. Fishmeal substitution with *Arthrospira* (*Spirulina platensis*) in a practical diet for *Litopenaeus vannamei*: effects on growth and immunological parameters. *Aquaculture* 426, 120-125.
- Maciel, C. R., Valenti, W. C. 2009. Biology, fisheries and aquaculture of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*: a review. *Nauplius*, 17:61–79.
- Marques H.L.D.A., Moraes-Valenti P.M.C., 2012. Current status and prospects of farming the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii* (De Man 1879) and the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum* (Heller 1862) in Brazil. *Aquaculture Research* 43, 984–992.
- Marques, H. L. A., Barros, H. P., Mallasen, M., Boock, M. V., Moraes-Valenti, P. M. C. 2012. Influence of stocking densities in the nursery phase on the growth of *Macrobrachium amazonicum* reared in net pens. *Aquaculture*, 358–359:240–245.

- Moraes-Valenti P., Valenti W.C., 2010. Culture of the Amazon River Prawn *Macrobrachium amazonicum*. In: Freshwater Prawns: Biology and Farming (ed. by M.B. New, W.C. Valenti, J.H. Tidwell, L.R. D'Abramo & M.N. Kutty), Wiley Blackwell, Oxford, England, pp. 485–501.
- Moraes-Valenti, P., Morais, P. A., Preto, B. L., Valenti, W. C. 2010. Effect of density on population development in the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Aquatic Biology*, 9: 291-301.
- Odinetz-Collart, O. 1987. La pêche crevettière de *Macrobrachium amazonicum* (Palaemonidae) dans le Bas- Tocantins après la fermeture du barrage de Tucuruí (Brésil). *Rev Hydrobiol Trop* 20:131–144.
- Odinetz-Collart, O., Moreira, L. C. 1993. Potencial pesqueiro do camarão *Macrobrachium amazonicum* na Amazônia Central (Ilha do Careiro). *Amazoniana* 12: 399-4 13.
- Ota, S., Morita, A., Ohnuki, S., Hirata, A., Sekida, S., Okuda, K., Ohya, Y., Kawano, S., 2018. Carotenoid dynamics and lipid droplet containing astaxanthin in response to light in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Scientific Reports* 8, 1-10.
- Perez-Velazquez, M., Gatlin III, D.M., González-Félix, M.L., García-Ortega, A., 2018. Partial replacement of fish meal and fish oil by algal meals in diets of red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture* 487, 41–50.
- Pileggi, L. G., Mantelatto, F. L. 2010. Molecular phylogeny of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* (Decapoda, Palaemonidae), with emphasis on the relationships among selected American species. *Invertebr Syst*, 24: 194-208.
- Reis, W.G. Wasielesky Jr, W., Abreu, P.C., Brandão, H., Krummenauer, D., 2019. Rearing of the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in BFT system with different photoperiods: Effects on the microbial community, water quality and zootechnical performance. *Aquaculture* 508, 19–29.
- Ribeiro, K., Papa, L.P., Vicentini, C.A., Franceschini-Vicentini, I.B, 2016. The ultrastructural evaluation of digestive cells in the hepatopancreas of the Amazon

- River prawn, *Macrobrachium amazonicum*. *Aquaculture Research* 47, 1251–1259.
- Scardoeli-Truzzi, B., Sipaúba-Tavares, L.H., 2017. Sources of inorganic fertilizer in the growth of *Haematococcus pluvialis* Flotow (Chlorophyceae). *Journal of Algal Biomass Utilization* 8, 1-10.
- Shah, M.R. Liang, Y., Cheng, J.J., Daroch, M., 2016. Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: From single cell to high value commercial products. *Front. Plant Sci.* 7, 531.
- Shakerian, A., Barton, M.D, Akinbowale, O.L., Khamesipour, F., 2018. Antimicrobial resistance profile and resistance genes of *Vibrio* species isolated from giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) raised in Iran. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 68, 79-88.
- Shan, H., Wang, T., Dong, Y., Ma, S., 2019. Effects of dietary *Ampithoe* sp. supplementation on the growth, energy status, antioxidant capacity, and ammonia-N tolerance of the shrimp *Litopenaeus vannamei*: Continuous versus interval feeding. *Aquaculture* 509, 32–39.
- Soeiro, R. K. S., Rocha, C. P., Maciel, M., Abrunhosa, F. A., Maciel, C. R. 2016. Relação entre a origem costeira de *Macrobrachium amazonicum* e o nível de salinidade na larvicultura. *Bol Inst Pesca (São Paulo)*, 42:691-703.
- Vergamini, F. G., Pileggi, L. G., Mantelatto, F. L. 2011. Genetic variability of the Amazon River prawn *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Caridea, Palaemonidae). *Contributions to Zoology* v. 80, p. 67-83.
- Vollenweider, R.A., 1974. A manual on methods for measuring primary production in aquatic environments. 2nd ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications. IBP, Handbook no. 12, 225 p.
- Xie, S., Fang, W., Wei, D., Liu, Y., Yin, P., Niu, J., Tian, L., 2018. Dietary supplementation of *Haematococcus pluvialis* improved the immune capacity and low salinity tolerance ability of post-larval white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology* 80, 452–457.

Yan, Q., Zhu, X., Yang, Y., Han, D., Xie, S., 2014. Feasibility of partial replacement of fish meal with proteins from different sources in diets of Korean rockfish (*Sebastes schlegelii*). J. Ocean Univ. China 13, 1054–1060.

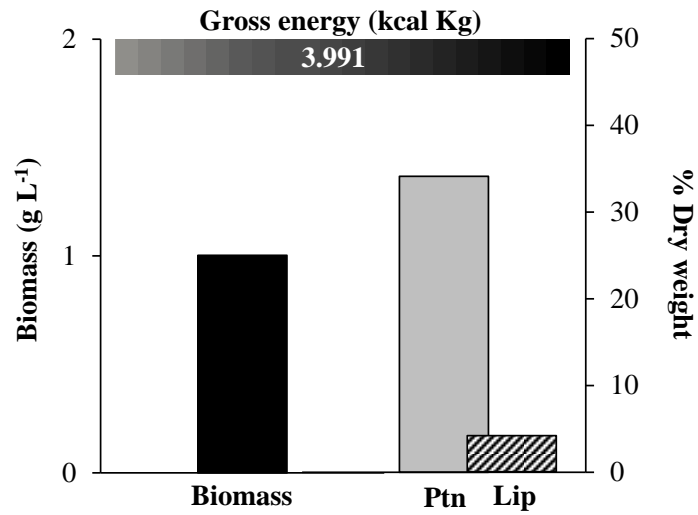


Fig. 1. Biomass concentration of *Haematococcus pluvialis* in inorganic medium (NPK 10-10-10), biochemical composition (protein/lipid contents) and gross energy obtained after 28 days cultivation.

Table 1

Ingredients and proximate composition (% as feed basis) of experimental diets replacement of fishmeal for *Haematococcus pluvialis* biomass (T25%, T50% and T100%) and control.

Ingredients	Diets			
	Control	T25%	T50%	T100%
Microalgae ^a	0	5	10	20
Fish meal ^b	20	15	10	0
Soybean meal ^c	30	28	27.5	30
Meat and bone meal	6.4	6.4	7.5	10
Corn ^d	15.8	13.8	10.5	0.23
Wheat flour ^e	16.8	16.8	16.8	16.8
Poultry by-product meal ^f	5	8.5	10.2	11.5
Rice bran ^g	1	1	1	1
Cellulose	1.1	1.2	1.5	1.8
Lysine	0.4	0.4	0.4	0.6
Methionine	0.2	0.25	0.25	0.5
Threonine	0.5	0.5	0.5	0.8
Soybean oil ^h	1.7	1.7	1.7	2.6
Dicalcium phosphate	0	0.3	1	3
Salt	0.5	0.5	0.5	0.5
Mineral-vitamin mix ⁱ	0.5	0.5	0.5	0.5
Antifungal (Phylax [®]) ^j	0.15	0.15	0.15	0.15
BHT ^k	0.02	0.02	0.02	0.02
Proximate composition				
Dry matter	94.09	94.01	93.44	94.23
Crude protein	35.03	35.45	34.82	35.71
Ether extract	6.67	7.35	7.08	7.39
Total ash	11.97	11.85	11.39	10.49
Gross energy (kcal/Kg)	3936.06	3955.77	3880.41	3971.39

^a Microalgae obtained locally. Biochemical composition of *Haematococcus pluvialis*: 34.1% protein, 4.1% lipid.

^b Nutreco Brasil Pitangueiras - SP, Protein = 541.4; Ether extract = 105.7; Crude energy (Mj Kg⁻¹) = 17.06.

^c Agromix, Jaboticabal – SP, Protein = 452.7; Ether extract = 18.4; Nitrogen-free extract = 292.6; Crude energy (Mj Kg⁻¹) = 17.45.

^d FCAV/UNESP, Jaboticabal – SP, Protein = 77.9; Ether extract = 48.1; Nitrogen-free extract = 726.3 Crude energy(Mj Kg⁻¹) = 16.76.

^e Agromix, Jaboticabal – SP, Protein = 157.0; Ether extract = 40.4; Nitrogen-free extract = 571.0 Crude energy (Mj Kg⁻¹) = 17.14.

^f Nutreco Brasil Pitangueiras - SP, Protein = 635.1; Ether extract = 137.9; Crude energy (Mj Kg⁻¹) = 20.24.

^g Agromix, Jaboticabal – SP, Protein = 116.8; Ether extract = 157.2; Nitrogen-free extract = 421.2 Crude energy (Mj Kg⁻¹) = 18.72.

^h Agromix, Jaboticabal – SP, Ether extract = 1000.0; Crude energy (Mj Kg⁻¹) = 39.06.

ⁱ Each 1% contains: folic acid (1 mg); pantothenic acid (20 mg); antioxidant (125 mg); choline (150 mg); copper (10 mg); iron (100 mg); iodine (5 mg); manganese (70 mg); selenium (0.15 mg); vitamin A (3,000 IU kg⁻¹); vitamin B (16 mg); vitamin B12 (20 mg); vitamin B2 (8 mg); vitamin B6 (3 mg); vitamin C (350 mg); vitamin D3 (3000 IU kg⁻¹); vitamin E (200 IU kg⁻¹); vitamin K (6 mg); zinc (150 mg); niacin (100 mg); biotin (0.10 mg).

^j Nutreco Brasil Pitangueiras – SP.

^k BHT: butyl-hydroxytoluene or butylated hydroxytoluene, is a lipophilic organic compound, antioxidant properties.

Table 2

Water parameters for different diet treatments of post-larvae *Macrobrachium amazonicum*, replacement of fishmeal for *Haematococcus pluvialis* biomass (T25%, T50% and T100%) and control.

Parameters	Diets			
	Control	T25%	T50%	T100%
Temperature (°C)	26.6 ± 0.2 ^a	26.7 ± 0.2 ^a	26.6 ± 0.1 ^a	26.6 ± 0.1 ^a
DO (mg L ⁻¹)	7.2 ± 0.02 ^a	7.2 ± 0.05 ^a	7.2 ± 0.1 ^a	7.1 ± 0.1 ^a
Conductivity (µS cm ⁻¹)	306 ± 15 ^a	305 ± 13 ^a	309 ± 10 ^a	301 ± 27 ^a
pH	8.4 ± 0.06 ^a	8.5 ± 0.01 ^a	8.4 ± 0.04 ^a	8.3 ± 0.2 ^a
Ammonia (µg L ⁻¹)	3.5 ± 2 ^a	9.4 ± 7 ^a	12.6 ± 6 ^a	12.2 ± 4 ^a
Nitrite (µg L ⁻¹)	6.1 ± 4 ^b	8.4 ± 5 ^b	22.4 ± 3 ^a	6.5 ± 5 ^b
Nitrate (µg L ⁻¹)	16.9 ± 15 ^a	23.8 ± 20 ^a	15.3 ± 13 ^a	29.6 ± 27 ^a
Total Phosphorus (µg L ⁻¹)	124 ± 35 ^c	129 ± 15 ^c	184 ± 22 ^b	241 ± 20 ^a

Values are means ± Standard Deviation from replicate groups. Means in each row with different letters are significantly different (P < 0.05) between treatments.

Table 3

Growth performance of post-larval *Macrobrachium amazonicum* fed the experimental diets with different replacement of fishmeal for *Haematococcus pluvialis* biomass (T25%, T50% and T100%) and control.

Growth Performance	Diets			
	Control	T25%	T50%	T100%
Weight gain (mg)	42.1 ± 6 ^a	43.4 ± 9 ^a	47.1 ± 8 ^a	52.8 ± 3 ^a
Length gain (mm)	7.5 ± 0.9 ^b	8.0 ± 1.4 ^{ab}	8.6 ± 0.8 ^{ab}	9.9 ± 0.6 ^a
Specific growth rate (SGR %)	5.37 ± 0.4 ^a	5.44 ± 0.5 ^a	5.7 ± 0.5 ^a	6.01 ± 0.2 ^a
Feed conversion ratio (mg/mg)	4.0 ± 0.8 ^a	3.9 ± 0.9 ^a	3.4 ± 0.6 ^a	2.7 ± 0.2 ^a
Food consumption (mg ind.)	167 ± 17.7 ^a	165 ± 17.2 ^a	160 ± 9.9 ^a	144 ± 14 ^a
Protein efficiency ratio (PER)	2.4 ± 0.3 ^a	2.4 ± 0.5 ^a	2.7 ± 0.5 ^a	3.0 ± 0.2 ^a
Protein productive value (PPV)	52.6 ± 9 ^a	55.6 ± 5 ^a	60.7 ± 10 ^a	68.2 ± 3 ^a
Crude protein weight gain (CP _{WG})	11.9 ± 0.7 ^a	12.3 ± 0.5 ^a	11.8 ± 1.2 ^a	11.9 ± 0.3 ^a
Survival rate (%)	75.4 ± 7 ^a	76.5 ± 8 ^a	78.3 ± 5 ^a	87.1 ± 8 ^a

Values are means ± Standard Deviation from replicate groups. Means in each row with different letters are significantly different (P < 0.05) between treatments.